

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina
veterinarska medicina

UDK 636.7.09:616-006:57.08:612.111:577.352:537.533.35(043.3)

Metka Šimundić, dr. vet. med.

**MORFOLOŠKE SPREMEMBE MEMBRANE KRVNIH CELIC
POD VPLIVOM ANORGANSKIH NANODELCEV IN
MASTOCITOMA PRI PSIH**

Doktorska disertacija

**THE MORPHOLOGIC CHANGES OF BLOOD CELL
MEMBRANES DUE TO THE EFFECT OF INORGANIC
NANOPARTICLES AND CANINE MAST CELL TUMOUR**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2017

Metka Šimundić

Morfološke spremembe membrane krvnih celic pod vplivom anorganskih nanodelcev in mastocitoma pri psih

Delo je bilo opravljeno:

- na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
- v Laboratoriju za klinično biofiziko Katedre za ortopedijo Medicinske fakultete.

Ker je bila tematika dela kompleksna, smo sodelovali še z naslednjimi ustanovami doma in v tujini:

- Center za biotehnologijo, Oddelek za biologijo v Biocity, Åbo Akademi University, v Åbo/Turku na Finskem,
- Laboratorij za biofiziko Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani,
- Skupina za nanobiologijo in nanotoksikologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani,
- Odsek za sintezo materialov Inštituta J. Stefan,
- Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen: _____

Mentorica: prof. dr. Nataša Tozon

Somentorica: prof. dr. Veronika Kralj - Igljč

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Milka Vrecl Fazarinc

Članica: prof. dr. Damjana Drobne

Član: prof. dr. Primož Ziherl

MORFOLOŠKE SPREMEMBE MEMBRANE KRVNIH CELIC POD VPLIVOM ANORGANSKIH NANODELCEV IN MASTOCITOMA PRI PSIH

Izvleček

Ključne besede: Celična membrana – patofiziologija; neoplazme; mastocitom; celični mikrodelci – metabolizem; nanodelci – analize; sistemi za dajanje zdravil – metode; eritrocitna membrana – učinki zdravil; plazma, bogata s trombociti – učinki zdravil; cinkov oksid – kemija; titanium – kemija; fosfolipidi; mikroskopija elektronska, vrstična; psi

V doktorski nalogi smo proučevali vpliv anorganskih nanodelcev (ND) in prisotnosti najpogostejšega kožnega tumorskega obolenja, mastocitoma (MCT) pri psih na morfološke spremembe membrane celic. Proučevali smo učinek ND titanijevega dioksida (TiO_2) in cinkovega oksida (ZnO) na obliko pasjih eritrocitov, trombocitov in orjaških fosfolipidnih mehurčkov (OFM). Ugotovili smo, da ND ZnO po 1 uri inkubacije aktivirajo trombocite in povzročijo pokanje OFM, ne vplivajo pa na obliko eritrocitov, medtem ko ND TiO_2 po 1 uri inkubacije nimajo učinka na obliko eritrocitov, trombocitov in OFM. Rezultati kažejo, da bi lahko bili ND ZnO potencialno protrombogeni in bi celo lahko povzročali pokanje celične membrane. Različna patološka stanja vplivajo na morfološke spremembe celične membrane, kar se odraža tudi v njenem brstenju in odcepljanju veziklov (mikrovezikulaciji) v okolno raztopino. Zato smo proučevali vpliv MCT pri 13 psih na številsko koncentracijo mikroveziklov (MV) v izolatih periferne krvi. Osem zdravih psov smo vključili v kontrolno skupino. Ugotovili smo, da je bila povprečna številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi psov z MCT statistično značilno višja kot pri zdravih psih. Višja številska koncentracija MV je bila povezana z višjo histološko oceno malignosti, višjim proliferacijskim indeksom Ki-67 in citoplazemskim vzorcem KIT-barvanja. Številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi med in po zdravljenju se je pri večini bolnikov znižala v primerjavi s koncentracijo pred zdravljenjem ne glede na izbrani način zdravljenja. Številska koncentracija trombocitov ni korelirala s stopnjo malignosti in rezultati zdravljenja. Dobljeni rezultati potrjujejo vpliv novotvorb na morfološke spremembe membrane celic in posledično večjo vezikulabilnost in višjo koncentracijo MV.

THE MORPHOLOGIC CHANGES OF BLOOD CELL MEMBRANES DUE TO THE EFFECT OF INORGANIC NANOPARTICLES AND CANINE MAST CELL TUMOUR

Abstract

Key words: Cell membrane – physiopathology; neoplasms; mastocytoma; cell-derived microparticles – metabolism; nanoparticles – analysis; drug delivery systems – methods; erythrocyte membrane – drug effects; platelet-rich plasma – drug effects; zinc oxide – chemistry; titanium – chemistry; phospholipids; microscopy, electron, scanning; dogs

The objective of this thesis was to evaluate the influence of inorganic nanoparticles (NPs) and the presence of the most common malignant skin tumour, mast cell tumour (MCT) in dogs on the morphological changes of cell membranes. We studied the effect of titanium dioxide (TiO₂) and zinc oxide (ZnO) NPs on the shape of canine red blood cells, platelets and giant phospholipid vesicles (GPVs). We found that ZnO NPs activated platelets and caused bursting of GPVs after 1 hour of incubation, but did not affect the shape of red blood cells, while TiO₂ NPs had no effect on the shape of red blood cells, platelets or GPVs after 1 hour of incubation. The results show that ZnO NPs are potentially prothrombogenic and may cause bursting of cell membranes. Various pathological conditions elicit morphological changes of cell membranes, which also reflects in budding of the cell membranes and the release of vesicles (microvesiculation) into the surrounding solution. Therefore, we studied the effect of MCT in 13 dogs on the concentration of microvesicles (MVs) in isolates from peripheral blood. Eight healthy dogs were used as the control group. We found that the average concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs with MCT was significantly higher than in healthy dogs. A higher concentration of MVs was associated with a higher histological grade of malignancy, a higher proliferative index Ki-67 and a cytoplasmic KIT-staining pattern. In most patients, the concentration of MVs in isolates from peripheral blood decreased during and after treatment compared to the concentrations before treatment, regardless of the selected type of treatment. The concentration of platelets did not correlate with the grade of malignancy and the treatment results. The obtained results confirm the impact of neoplasms on the morphological changes of cell membranes, which results in greater vesiculability and a higher concentration of MV.

KAZALO VSEBINE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | UVOD | 16 |
| 1.1 | NAMEN RAZISKAVE IN HIPOTEZE | 19 |
| 2 | PREGLED LITERATURE | 20 |
| 2.1 | ANORGANSKI NANODELCI | 20 |
| 2.1.1 | Lastnosti in uporaba nanodelcev | 20 |
| 2.1.2 | Biološka reaktivnost nanodelcev | 21 |
| 2.1.2.1 | Interakcija nanodelcev in celične membrane <i>in vitro</i> | 21 |
| 2.1.2.2 | Nanodelci in proteinska korona | 21 |
| 2.1.2.3 | Nanotoksičnost | 22 |
| 2.1.3 | Vpliv nanodelcev na eritrocite in trombocite | 23 |
| 2.1.4 | Anorganski nanodelci, uporabljeni v doktorski nalogi | 24 |
| 2.1.4.1 | Nanodelci titanijevega dioksida | 24 |
| 2.1.4.2 | Nanodelci cinkovega oksida | 24 |
| 2.2 | MASTOCITOM | 25 |
| 2.2.1 | Mastociti | 25 |
| 2.2.2 | Pojavnost mastocitoma | 25 |
| 2.2.3 | Klinična slika | 26 |
| 2.2.4 | Diagnostika in klasifikacija mastocitoma | 27 |
| 2.2.4.1 | Citološka diagnostika | 27 |
| 2.2.4.2 | Patohistološka diagnostika | 27 |
| 2.2.4.3 | Imunohistokemične metode za napoved poteka bolezni | 28 |
| 2.2.4.4 | Določanje kliničnega stadija bolezni | 29 |
| 2.2.5 | Zdravljenje | 30 |
| 2.2.5.1 | Kirurško zdravljenje | 30 |
| 2.2.5.2 | Radioterapija | 31 |
| 2.2.5.3 | Kemoterapija | 31 |
| 2.2.5.4 | Inhibitorji tirozin kinaze | 32 |
| 2.2.5.5 | Elektrokemoterapija | 33 |
| 2.2.5.6 | Elektrogensko zdravljenje | 33 |
| 2.2.5.7 | Druge metode zdravljenja, ki so bile glede na literaturne vire uporabljene redko | 34 |
| 2.2.6 | Geni, signalni proteini in encimi, pomembni za prognozo mastocitoma | 34 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3 | MIKROVEZIKLI | 35 |
| 2.3.1 | Nastanek mikroveziklov..... | 35 |
| 2.3.2 | Interakcija mikroveziklov s ciljno celico | 37 |
| 2.3.3 | Mikrovezikli, nastali iz tumorskih celic..... | 38 |
| 2.3.4 | Prenos medceličnih informacij iz mikroveziklov, nastalih iz tumorjev do tumorskega mikrokolja..... | 39 |
| 2.3.5 | Nukleinske kisline v mikroveziklih, nastalih iz tumorjev | 40 |
| 2.3.6 | Vpliv mikroveziklov, nastalih iz tumorskih celic na imunski sistem | 40 |
| 2.3.7 | Mikrovezikli, nastali iz tumorjev in tromboembolizem | 41 |
| 2.3.8 | Mikrovezikli v izolatih krvi kot biomarkerji in napovedni dejavnik poteka bolezni | 41 |
| 2.4 | MODELNI SISTEMI | 42 |
| 2.4.1 | Krvne celice..... | 42 |
| 2.4.1.1 | Eritrociti..... | 42 |
| 2.4.1.2 | Trombociti | 42 |
| 2.4.2 | Orjaški fosfolipidni mehurčki | 42 |
| 3 | MATERIALI IN METODE | 44 |
| 3.1 | NANODELCI TITANIJEVEGA IN CINKOVEGA DIOKSIDA | 44 |
| 3.1.1 | Priprava suspenzij titanijevega dioksida in cinkovega oksida za poskuse z orjaškimi fosfolipidnimi mehurčki in krvnimi celicami..... | 44 |
| 3.1.2 | Karakterizacija suspenzij titanijevega dioksida in cinkovega oksida | 44 |
| 3.2 | PRIPRAVA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV | 45 |
| 3.3 | PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV SUSPENZIJE ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV IN NANODELCEV TITANIJEVEGA DIOKSIDA IN CINKOVEGA OKSIDA TER ZAJEM IN ANALIZA MIKROSKOPSKIH VIDEOPOSNETKOV | 45 |
| 3.4 | POSKUSI Z ANORGANSKIMI NANODELCI IN KRVNIMI CELICAMI | 46 |
| 3.4.1 | Mikroskopiranje | 47 |
| 3.5 | ŽIVALI..... | 47 |
| 3.6 | PRIPRAVA VZORCEV MASTOCITOMOV ZA PATOHISTOLOŠKO IN IMUNOHISTOKEMIČNO PREISKAVO..... | 49 |
| 3.6.1 | Obdelava vzorcev za citološko diagnostiko | 49 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6.2 | Obdelava vzorcev tumorjev za patohistološko in imunohistokemično preiskavo | 49 |
| 3.6.3 | Barvanje s hematoksilinom in eozinom ter toluidinskim modrilom | 49 |
| 3.6.4 | Imunohistokemično označevanje | 50 |
| 3.6.4.1 | Postopek imunohistokemičnega označevanja | 50 |
| 3.6.4.2 | Kontrole pri imunohistokemičnem označevanju | 51 |
| 3.7 | KRITERIJI ZA OCENJEVANJE STOPNJE MALIGNOSTI MASTOCITOMOV, OCENO VZORCA KIT-BARVANJA IN DOLOČANJE PROLIFERACIJSKEGA INDEKSA Ki-67 | 52 |
| 3.7.1 | Ocenjevanje citološkega vzorca | 52 |
| 3.7.2 | Ocenjevanje histološke stopnje malignosti mastocitomov | 52 |
| 3.7.3 | Ocena vzorca KIT-barvanja | 54 |
| 3.7.4 | Določanje proliferacijskega indeksa Ki-67 | 56 |
| 3.8 | ODVZEM VZORCEV KRVI IN LOČITEV KRVNIH CELIC OD PLAZME | 57 |
| 3.9 | PRIDOBIVANJE S TROMBOCITI SIROMAŠNE PLAZME | 57 |
| 3.10 | IZOLACIJA MIKROVEZIKLOV | 57 |
| 3.11 | ŠTETJE MIKROVEZIKLOV S PRETOČNIM CITOMETROM | 58 |
| 3.12 | MERJENJE ŠTEVILSKE KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V PERIFERNI KRVI | 60 |
| 3.13 | STATISTIČNE METODE | 60 |
| 4 | REZULTATI | 62 |
| 4.1 | LASTNOSTI IZBRANIH ANORGANSKIH NANOMATERIALOV | 62 |
| 4.2 | REZULTATI VPLIVA ANORGANSKIH NANODELCEV NA MORFOLOŠKE SPREMEMBE MEMBRANE KRVNIH CELIC | 63 |
| 4.2.1 | Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida na ukrivljenost membrane pasjih eritrocitov in njihove medsebojne interakcije | 63 |
| 4.2.2 | Vpliv nanodelcev cinkovega oksida na ukrivljenost membrane pasjih eritrocitov in njihove medsebojne interakcije | 63 |
| 4.2.3 | Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida na ukrivljenost membrane pasjih trombocitov in njihove medsebojne interakcije | 64 |
| 4.2.4 | Vpliv nanodelcev cinkovega dioksida na ukrivljenost membrane pasjih trombocitov in njihove medsebojne interakcije | 65 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.3 | REZULTATI VPLIVA ANORGANSKIH NANODELCEV NA LASTNOSTI FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN | 66 |
| 4.3.1 | Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida na lastnosti fosfolipidne membrane..... | 66 |
| 4.3.2 | Vpliv nanodelcev cinkovega oksida na lastnosti fosfolipidne membrane..... | 66 |
| 4.4.1 | Primerjava številske koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi psov z mastocitomom s številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi zdravih psov | 67 |
| 4.4.2 | Povezava med histološko stopnjo malignosti mastocitoma po Patnaiku in številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri psih pred zdravljenjem..... | 68 |
| 4.4.3 | Povezava številske koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi skupine psov z mastocitomom in vzorcem KIT-barvanja | 69 |
| 4.4.4 | Povezava med proliferacijskim indeksom Ki-67 in številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi skupine psov z mastocitomom | 72 |
| 4.4.5 | Povezava med številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri psih z mastocitomom s kliničnimi ocenami malignosti, histološkimi ocenami malignosti ter številsko koncentracijo trombocitov v periferni krvi | 74 |
| 4.4.6 | Spremljanje številske koncentracije mikroveziklov in trombocitov v izolatih periferne krvi psov pred, med in po začetku zdravljenja mastocitoma | 75 |
| 5 | RAZPRAVA | 79 |
| 5.1 | VPLIV ANORGANSKIH NANODELCEV NA MORFOLOŠKE SPREMEMBE MEMBRANE KRVNIH CELIC IN FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN..... | 79 |
| 5.1.1 | Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida in cinkovega oksida na ukrivljenost membrane pasjih eritrocitov in njihove medsebojne interakcije..... | 79 |
| 5.1.2 | Vpliv anorganskih nanodelcev na ukrivljenost membrane pasjih trombocitov in njihove medsebojne interakcije..... | 80 |
| 5.1.2.1 | Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida na ukrivljenost membrane pasjih trombocitov in njihove medsebojne interakcije..... | 80 |
| 5.1.2.2 | Vpliv nanodelcev cinkovega oksida na ukrivljenost membrane pasjih trombocitov in njihove medsebojne interakcije..... | 80 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.1.3 | Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida in cinkovega oksida na lastnosti fosfolipidnih membran | 81 |
| 5.2 | MORFOLOŠKE SPREMEMBE MEMBRANE CELIC PRI PSIH Z MASTOCITOMOM..... | 82 |
| 5.2.1 | Primerjava številske koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi psov z mastocitomom s številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri zdravih psih | 82 |
| 5.2.2 | Povezava med histološko stopnjo malignosti mastocitoma po Patnaiku in številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri psih pred zdravljenjem..... | 83 |
| 5.2.3 | Povezava številske koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi psov z mastocitomom in vzorcem KIT-barvanja | 84 |
| 5.2.4 | Povezava med proliferacijskim indeksom Ki-67 in koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi skupine psov z mastocitomom | 85 |
| 5.2.5 | Povezava med številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri psih z mastocitomom s kliničnimi ocenami malignosti, histološkimi ocenami malignosti ter številsko koncentracijo trombocitov v periferni krvi | 86 |
| 5.2.6 | Spremljanje številske koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi in trombocitov iz periferne krvi pred, med in po začetku zdravljenja mastocitoma | 88 |
| 6 | SKLEPI | 90 |
| 7 | POVZETEK..... | 91 |
| 8 | SUMMARY..... | 93 |
| 9 | ZAHVALE | 95 |
| 10 | LITERATURA | 97 |
| 11 | PRILOGE | 125 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: MCT histološke stopnje malignosti I, II in III | |
| Figure 1: Grade I, II and III MCT | 53 |
| Slika 2: MCT z vzorcem KIT-barvanja | |
| Figure 2: MCT with KIT-staining pattern | 55 |
| Slika 3: MCT in proliferativni indeks Ki-67 | |
| Figure 3: MCT and proliferative index Ki-67 | 56 |
| Slika 4: Citometrična metoda | |
| Figure 4: Cytometric method..... | 58 |
| Slika 5: Točkovni diagram zdravega psa | |
| Figure 5: A density plot of a healthy dog | 59 |
| Slika 6: Točkovni diagram psa z MCT | |
| Figure 6: A density plot of a dog with MCT | 59 |
| Slika 7: Suspenzija ND TiO ₂ in ZnO v glukozi (0,3M raztopini), slikana s presevnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom | |
| Figure 7: TiO ₂ and ZnO NPs suspended in glucose (0.3M solution), imaged by a transmission electron microscope and by a scanning electron microscope | 62 |
| Slika 8: Mikrografije izpranih eritrocitov treh psov, zajete z vrstično elektronsko mikroskopijo | |
| Figure 8: Scanning electron microscope micrographs of washed red blood cells of three dogs | 64 |
| Slika 9: Mikrografije s trombociti bogate plazme treh psov, zajete z vrstično elektronsko mikroskopijo. | |
| Figure 9: Scanning electron microscope micrographs of platelet-rich plasma of three dogs | 65 |
| Slika 10: Število OFM po dodatku 0,3 M raztopine glukoze (kontrola) in suspenzije ND TiO ₂ in ZnO | |
| Figure 10: Number of GPVs after addition of 0.3M glucose solution (control) and suspension of ZnO and TiO ₂ NPs..... | 66 |
| Slika 11: MCT histološke stopnje malignosti II in III | |
| Figure 11: Grade II and III MCT | 68 |
| Slika 12: MCT z vzorcem KIT-barvanja | |
| Figure 12: MCT with KIT-staining pattern..... | 70 |
| Slika 13: MCT in proliferativni indeks Ki-67 | |
| Figure 13: MCT and proliferative index Ki-67 | 72 |

KAZALO TABEL

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Podatki o pacientih vključenih v raziskavo MCT in MV | |
| Table 1: Data on patients included in the study of MCTs and MVs..... | 48 |
| Tabela 2: Lastnosti suspenzij ND TiO ₂ in ZnO | |
| Table 2: Characteristics of TiO ₂ and ZnO NPs..... | 63 |
| Tabela 3: Primerjava številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi psov z MCT s številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi zdravih psov | |
| Table 3: Comparison of the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dog with MCT with the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of healthy dogs | 67 |
| Tabela 4: Primerjava med histološko stopnjo malignosti MCT po Patnaiku in številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi pri psih pred zdravljenjem | |
| Table 4: Comparison between the histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik and the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs before treatment | 69 |
| Tabela 5: Primerjava številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi psov z MCT glede na vzorec KIT-barvanja | |
| Table 5: Comparison of the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs with MCT according to the KIT-staining pattern | 71 |
| Tabela 6: Primerjava številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi psov z MCT glede na proliferacijski indeks Ki-67 | |
| Table 6: Comparison of the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs with MCT according to the proliferative index Ki-67..... | 73 |
| Tabela 7: Podatki o kliničnem izgledu MCT, kliničnem stadiju, histološki stopnji malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu, številski koncentraciji MV v izolatih periferne krvi in trombocitov v periferni krvi | |
| Table 7: Data on MCT's clinical presentation, clinical stage, histological of malignancy of MCT according to Patnaik and Kiupel, concentration of MVs in isolates from peripheral blood and platelets in peripheral blood..... | 74 |
| Tabela 8: Spremljanje številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi in trombocitov v periferni krvi pri psih z MCT pred, med in po zdravljenju | |

| | | |
|------------|--|-----|
| Table 8: | Monitoring of the concentration of MVs in isolates from peripheral blood and platelets in peripheral blood of dogs with MCT before, during and after treatment..... | 76 |
| Tabela 9: | Podatki o starosti psov, spolu, pasmi, lokaciji in velikosti MCT, kliničnem izgledu, kliničnem stadiju in histološki stopnji malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu, vzorcu KIT-barvanja in proliferacijskem indeksu Ki-67 pri psih z MCT pred zdravljenjem | |
| Table 9: | Data on dog's age, sex, breed, location and size of MCT, clinical presentation, clinical stage and histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik and Kiupel, KIT-staining pattern and proliferative index Ki-67 in dogs with MCT before treatment..... | 125 |
| Tabela 10: | Podatki o pasmi, številski koncentraciji MV v izolatih periferne krvi in trombocitov v periferni krvi, kliničnem stadiju, histološki stopnji malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu, vzorcu KIT-barvanja in proliferacijskem indeksu Ki-67 pri psih z MCT pred zdravljenjem | |
| Table 10: | Data on breed, concentration of MVs in isolates from peripheral blood and platelets in peripheral blood, clinical stage, histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik and Kiupel KIT-staining pattern and proliferative index Ki-67 in dogs with MCT before treatment | 126 |
| Tabela 11: | Podatki o kliničnem izgledu MCT, številski koncentraciji MV v izolatih periferne krvi in trombocitov v periferni krvi pred, med in po zdravljenju, kliničnem stadiju, histološki stopnji malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu, vzorcu KIT-barvanja in proliferacijskem indeksu Ki-67 pri psih z MCT | |
| Table 11: | Data on MCT's clinical presentation, concentration of MVs in isolates from peripheral blood and platelets in peripheral blood before, during and after treatment, clinical stage, histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik and Kiupel, KIT-staining pattern and proliferative index Ki-67 in dogs with MCT | 127 |

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|---------|---|
| AgNOR | s srebrom dokazljiva regija za organizacijo nukleolusov (angl. argyrophilic nucleolar organiser regions) |
| ARF6 | ADP (adenozin-difosfat)-ribolizacijski dejavnik 6 (angl. ADP (adenosine diphosphate)-ribosylation factor 6) |
| ADP | adenozin-difosfat (angl. adenosine diphosphate) |
| ATP | adenozin-trifosfat (angl. adenosine triphosphate) |
| BFGF | bazični fibroblastni rastni dejavnik (angl. basic fibroblast growth factor) |
| DLS | dinamično sipanje svetlobe (angl. dynamic light scattering) |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid) |
| ECT | elektrokemoterapija (angl. electrochemotherapy) |
| EDTA | etilendiaminotetraoetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) |
| EGFR | receptor za epidermalni rastni dejavnik (angl. epidermal growth factor receptor) |
| EGT | elektrogenska terapija |
| ESCRT | kompleks proteinov ESCRT (angl. endosomal sorting complexes for transport) |
| FSC A | prednje sipanje (angl. forward side scatter) |
| FSF | zaviralni dejavnik fibroblastov (angl. fibroblast suppressor factor) |
| GIST | gastrointestinalni stromalni tumorji |
| GTP-aza | gvanozin trifosfataza (angl. guanosine triphosphatase) |
| HPF | vidno polje velike povečave (angl. high power field) |
| IL | interlevkin |
| KIT | receptor tirozin kinaze |
| LT | levkotrien |
| MAKP | mitogen-aktivirajoča protein-kinaza |
| MCT | mastocitom (angl. mast cell tumour) |
| MI | mitotični indeks |
| mRNA | informacijska ribonukleinska kislina (angl. messenger ribonucleic acid) |
| miRNA | mikro ribonukleinska kislina (angl. micro ribonucleic acid) |

| | |
|--------------------|--|
| MLCK2 | kinaza 2 lahke miozinske verige (angl. myosin light-chain kinase 2) |
| MMP | matriks metaloproteinaza |
| MVT | multivezikularno telesce |
| MYO1A | miozin 1a (angl. myosin 1a) |
| ND | nanodelci |
| OFM | orjaški fosfolipidni mehurčki |
| PBS | fosfatni pufer s soljo (angl. phosphate buffer saline) |
| PCNA | jedrni antigen proliferirajočih celic (angl. proliferating cell nuclear antibody) |
| PDGF | rastni dejavnik iz trombocitov (angl. platelet derived growth factor) |
| PDGFR | receptor za rastni dejavnik iz trombocitov (angl. platelet derived growth factor receptor) |
| PGD | prostaglandin |
| PKC | protein-kinaza C |
| POPC | lipidov 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3 fosfatidilholin |
| SCF | rastni dejavnik matičnih celic (angl. stem cell factor) |
| SEM | vrstični elektronski mikroskop (ang. scanning electron microscopy) |
| SSC A | stransko sipanje (angl. side side scatter) |
| TBST | tris-pufer z dodatkom Tweena (angl. tris-buffered-saline-Tween) |
| TEM | presevni ali transmisijski elektronski mikroskop |
| TIAB | tankoigelna aspiracijska biopsija |
| TKR | receptorji tirozin kinaze |
| TMV | mikrovezikli, nastali iz tumorskih celic (angl. tumor-derived microvesicles) |
| TNF- α | dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. tumor necrosis factor alfa) |
| <i>TSLC1</i> | gen za tumor zavirajoče beljakovine (angl. tumour-suppressor gene) |
| uPA | urokinazni aktivator plazminogen (angl. urokinase-type plasminogen activator) |
| VEGF | žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor) |
| VEGFR | receptor za žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor receptor) |
| ζ -potencial | potencial zeta |

1 UVOD

Osnovni gradnik celične membrane je fosfolipidni dvosloj, sestavljen iz več vrst fosfolipidnih molekul. V fosfolipidni dvosloj so vgrajene različne večje molekule, kot so na primer glikoproteini in glikolipidi, zaradi česar debelina membrane evkariotskih celic variira od 6–10 nm (Lodish in Rothman, 1979). Holesterol se poveže v fosfolipidni dvosloj in poveča stabilnost celične membrane. Membranske sestavine so več ali manj prosto gibljive lateralno po membrani, lahko pa tudi med seboj interagirajo – povežejo se v funkcionalne enote, ki jim pravimo membranski rafti (Ikonen in Simons, 1998). Membranski rafti so heterogene, dinamične strukture, bogate s holesterolom in sfingolipidi in služijo kot signalne platforme (Ikonen in Simons, 1998). Lateralno gibanje membranskih sestavin vpliva na interakcijo med njimi in s tem na nastanek membranskih raftov, na oblikovanje medceličnih stikov in interakcijo med receptorji in ligandi (Heidemann, 2013). Snovi prehajajo skozi membrano na različne načine kot na primer s pasivnim transportom (difuzija), z aktivnim transportom in endocitozo, odvisno od tipa celic in lastnosti snovi, ki prehajajo (Heidemann, 2013). Celična membrana ščiti celice pred zunanjim okoljem, obenem pa zaradi dinamične narave lahko spreminja kemijske in fizikalne lastnosti glede na mikrookolje, v katerem se nahaja. Lateralna gibljivost sestavin daje celični membrani lastnosti dvodimenzionalne tekočine, zato so jo v okviru modela poimenovali tekoči mozaik (Singer in Nicolson, 1972), ta model pa je bil kasneje dopolnjen z vključitvijo membranskih raftov (Brown in London, 1998; Simons in Ikonen, 2000), lokalno ukrivljenost pa so povezali z lokalno sestavo membrane. Za študij medsebojne odvisnosti sestave in oblike membrane so primerni sistemi, pri katerih energija membrane prispeva bistveni del k energiji sistema. Taka sistema sta na primer eritrocit, pri katerem je citoskelet omejen na tanko plast pod fosfolipidnim dvoslojem, in fosfolipidni mehurček. Oba sistema nimata notranje strukture in se zato lastnosti membrane in njihove spremembe odražajo na spremembi oblike celotnega sistema. Eritrociti in fosfolipidni mehurčki so tudi dovolj veliki, da jih lahko direktno in v realnem času opazujemo z optičnim mikroskopom. Zato so bile na teh dveh sistemih opravljene študije, ki so pokazale, da pod vplivom različnih dejavnikov, ki vplivajo na površino in prostornino fosfolipidnih mehurčkov ter na razliko med površinama obeh slojev membrane, fosfolipidni mehurčki zavzamejo različne oblike (Sakashita in sod., 2012). Nekatere od teh oblik (diskocitno in stomatocitno, pa tudi nekatere druge) so opazili tudi pri eritrocitih (Canham, 1970). Nadalje so opazili, da so bili posebej močni učinki vgrajevanja

amfifilnih molekul v membrano eritrocitov (Hägerstrand in Isomaa, 1992). Te so povzročile brstenje membrane, ki je privedlo do odcepljanja brstov od materinske membrane (Hägerstrand in Isomaa, 1992). Pojav so poimenovali mikrovezikulacija membrane in predstavlja ekstremno spremembo morfologije celice (eritrocita). Brstenje in vezikulacijo so ob dodajanju učinkovin opazili tudi pri fosfolipidnih mehurčkih (Mavčič in sod., 2004, Urbanija in sod., 2007), vendar so bili brsti v tem primeru večinoma manj številni in večji (Urbanija in sod. 2007). Celične mikrovezikle je mogoče izolirati iz krvi in določiti njihovo število, kar je posredni kazatelj za lastnosti celičnih membran in sprememb njihovih oblik. Model tekočega mozaika pa opisuje membrano, ki ni močno ukrivljena, kot je na primer v membranskih mikro- in nanostrukturah. Pri obravnavanju membranskih nanostruktur se je izkazalo, da je struktura njenih sestavin in njena lateralna porazdelitev tista, ki določa lokalno ukrivljenost membrane; zaradi tega ima membrana lastnosti dvodimenzionalnega tekočega kristala, kar je pomembno tudi pri brstenju membrane in določa obliko veziklov, ki jih celica v končni fazi brstenja odpusti v okolico (Kralj-Iglič, 2012).

Na lastnosti celične membrane in njeno vezikulabilnost tako lahko vpliva sestava okolne raztopine in s tem različne učinkovine, ki jih v telo vnesemo, kot na primer nanodelci (ND). Membranski mikrovezikli (MV) lahko nastajajo v telesu tudi zaradi patoloških procesov, kot so npr. tumorji.

Uporaba ND v zadnjih dveh desetletjih naglo narašča v vseh gospodarskih panogah, predvsem zaradi njihovih edinstvenih lastnosti v primerjavi z večjimi delci enake kemijske sestave.

ND so predvsem zaradi trdnosti, optičnih, fotokatalitičnih in drugih sposobnosti aplikativni za proizvodnjo materialov z izboljšanimi lastnostmi v kemiji, kozmetiki, optiki, robotiki, gradbeništvu, proizvodnji hrane, tekstila, še posebej pa v terapevtske in diagnostične medicinske namene, pri čemer se ND vnaša v telo, tudi neposredno v žilo (Manivasagam in sod., 2010; Naahidi in sod., 2013; Viet Long in sod., 2014). Zaradi vsakodnevne uporabe ND in neposrednega stika živali in ljudi z ND je njihov dolgoročni vpliv na zdravje zelo pomemben (Colvin in sod., 2003; Iavicoli in sod., 2011). Razumevanje vpliva ND na biološke sisteme, zlasti na celično membrano, je ključno za varno uporabo nanomaterialov, predvsem tistih, ki se posredno ali neposredno vnašajo v telo.

Na lastnosti celične membrane in vezikulabilnost vpliva patološko stanje organizma. MV so celični fragmenti, obdani s celično membrano, ki nastajajo v zadnji fazi brstenja membran vseh celičnih tipov. Njihova sestava odraža sestavo matične celice, iz katere izvirajo. Brstenje MV

je fiziološki fenomen in se bolj izraža pri aktivnih celicah, pri celicah, ki so izpostavljene škodljivim dejavnikom, apoptotičnih in tumorskih celicah (Ratajczak, 2006; Ratajczak in sod., 2006; Muralidharan-Chari, 2010; Yanez-Mo in sod., 2015). Glede na način nastanka obstajajo vsaj trije tipi MV, ki jih imenujemo ektosomi, eksosomi in apoptotska telesca (Lee in sod., 2011). MV lahko pridejo v telesne tekočine (kri, limfo, cerebrospinalno tekočino, urin idr.) in predstavljajo mehanizem medcelične komunikacije. V interakcijo MV in oddaljene celice je vključenih več mehanizmov: MV lahko neposredno stimulirajo ciljne celice (npr. z izraženimi rastnimi faktorji ali bioaktivnimi lipidi), prenesejo lahko na celično membrano vezane ligande receptorjev ali pa prenesejo v celico cele organele, kužne delce, prione in genetski material (Ratajczak, 2006; Ratajczak in sod., 2006). MV, ki vsebujejo prokoagulantne, rastne, regulatorne in onkogene molekule, lahko le-te z interakcijo prenesejo na netransformirane stromalne, endotelijske celice in vnetne infiltrate celic. S tem pripomorejo k invaziji tumorja, angiogenezi, metastaziranju in rezistenci na zdravila (Lee in sod., 2011). Raziskave kažejo, da je povišana številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi humanih onkoloških bolnikov (Kim in sod., 2003; Janša in sod., 2008). Prav zaradi teh lastnosti so MV, ki so bili zaradi svoje majhnosti dolgo spregledani in poimenovani kot trombocitni prah, zadnja leta predmet številnih intenzivnih raziskav. MV so zaradi svojega diagnostičnega potenciala kot biomarkerji in napovedni dejavniki razvoja in zdravljenja novotvorb zanimivi tako v humani kot tudi v veterinarski medicini.

Mastocitom (angl. mast cell tumor, MCT) je najpogostejši tumor kože pri psih (16–21 %) (Finnie in Bostock, 1979; Bostock, 1986), ki kljub patohistološkim in imunohistokemičnim klasifikacijam zaradi svojega izjemno spremenljivega biološkega obnašanja še vedno predstavlja izziv v napovedi poteka obolenja in izida zdravljenja.

V doktorski nalogi smo obravnavali vplive različnih dejavnikov na lastnosti bioloških membran, ki so se odrazile v spremembah njihove oblike. Obliko eritrocitov in trombocitov smo opazovali z mikroskopom, indirektno (preko koncentracije MV v izolatih) pa smo ugotavljali večje vplive, ki privedejo do mikrovezikulacije. Pri orjaških fosfolipidnih mehurčkih (OFM) smo ugotavljali samo večje vplive, ki privedejo do njihovega pokanja.

Želeli smo ugotoviti *in vitro* vpliv ND TiO₂ in ZnO na morfološke spremembe membrane eritrocitov in trombocitov. Opazovanje vpliva teh ND na OFM smo omejili na merjenje njihovega števila. Ugotavljali smo torej, ali so ND povzročili pokanje membran OFM.

Lastnosti membran celic smo proučevali tudi z merjenjem številske koncentracije MV pri psih. Zanimalo nas je predvsem, kakšen je vpliv MCT na morfološke spremembe membrane celic in s tem na vezikulabilnost njihovih membran.

Z nalogo smo želeli preiskusiti MV kot dodatni napovedni biomarker za določanje stopnje malignosti, napredovanja bolezni in ugotavljanje uspešnosti zdravljenja MCT.

1.1 NAMEN RAZISKAVE IN HIPOTEZE

Osrednji namen doktorskega dela je bil prispevek k boljšemu razumevanju mehanizma morfoloških sprememb membrane krvnih celic pod vplivom ND in MCT pri psih. Doktorsko nalogo smo razdelili na dva dela:

- a. Namen prvega dela je bil raziskati interakcije ND z biološkimi in umetnimi fosfolipidnimi membranami. Proučevali smo vpliv ND TiO₂ in ZnO na membrane eritrocitov in trombocitov ter na umetne membrane.
- b. V drugem delu doktorske naloge smo želeli preveriti, ali lahko na lastnosti bioloških membran vpliva patološko stanje organizma. Za ta namen smo kot model izbrali tumorsko obolenje pri psih, pri katerem zaradi učinkov tumorja prihaja do različnih odstopanj v homeostazi tako v mikrokolju tumorja kot tudi sistemsko na drugih organskih sistemih. Ugotavljali smo, ali sta številski koncentraciji MV in trombocitov pri psih z MCT višji v primerjavi z zdravimi psi in ali so odstopanja povezana s stopnjo malignosti ter klinično stopnjo bolezni. Z namenom ovrednotenja uporabnosti številske koncentracije MV in trombocitov za ugotavljanje odgovora na zdravljenje oziroma napredovanje bolezni smo omenjene parametre pri pacientih spremljali tudi med in po zdravljenju in ugotavljali, ali gre za korelacijo med številsko koncentracijo MV in trombocitov z napredovano boleznijo.

Hipoteze, ki smo jih preverjali, so:

1. Anorganski ND vplivajo na ukrivljenost membrane krvnih celic (eritrocitov in trombocitov) in njihove medsebojne interakcije.
2. Anorganski ND vplivajo na lastnosti fosfolipidnih membran.
3. Številski koncentraciji MV in trombocitov sta v krvi psov z MCT višji kot pri zdravih psih in povezani s histološko stopnjo malignosti MCT.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ANORGANSKI NANODELCI

2.1.1 Lastnosti in uporaba nanodelcev

Anorganski nanodelci (ND) nastajajo v naravnem okolju, predvsem v procesih erozije in vulkanskih izbruhov, lahko pa so stranski proizvod izgorevanja biomase in goriv, ali pa so načrtno narejeni in uporabljeni v različnih tehnoloških procesih. ND so široko zastopani v različnih gospodarskih panogah zaradi edinstvenih termičnih, mehaničnih, električnih in optičnih sposobnosti. Vsestransko so uporabni predvsem zaradi majhnosti, saj imajo vsaj eno dimenzijo manjšo od 100 nm, in velike reaktivne površine, kar omogoča nove fizikalne in kemične lastnosti, boljšo prehodnost v celice, večjo katalitično in biološko aktivnost (Oberdorster in sod., 2005). Prav zaradi teh lastnosti so ND nepogrešljivi tudi v medicini in farmaciji, kjer se uporabljajo za ciljno dostavo zdravil in genov, raziskave deoksiribonukleinske kisline (angl. deoxyribonucleic acid, DNA), zdravljenje tumorjev, slikovne preiskave z MRI, implantante, kot fluorescenčni označevalci, idr. (Wolfram in sod., 2015; Baeza in sod., 2016).

Naraščajoča uporaba ND v vsakdanjem življenju v hrani, oblekah, kozmetiki, sončnih kremah, medicini, farmaciji idr. postavlja vse več vprašanj glede njihovega vpliva na zdravje ljudi in živali (Reijnders, 2012). Možne poti vnosa v telo so preko: dihalnih poti (Yeates in Mauderly, 2001), oralno preko prebavil (Böckmann in sod., 2000), preko kože, lahko pa jih v organizem vnesemo načrtno v terapevtske ali diagnostične namene (Yallapu in sod., 2010; Naseroleslami in sod., 2016).

Na biološko reaktivnost ND vplivajo njihove specifične lastnosti, kot so: velikost, oblika, površinski naboj, kemijska sestava, sposobnost odtapljanja ionov iz ND in potencialna agregacija/aglomeracija nanomateriala, ki je odvisna od ionske moči raztopine in lahko spremeni efektivno velikost delcev za več velikostnih razredov (Borm in sod., 2006; Albanese in Chan, 2011; Yong in sod., 2013, Lin in sod., 2014; Shang in sod., 2014; Pastrello in sod., 2016).

2.1.2 Biološka reaktivnost nanodelcev

2.1.2.1 Interakcija nanodelcev in celične membrane *in vitro*

Ob čedalje obsežnejši uporabi ND v medicinske in farmacevtske namene, kjer prihaja do neposrednega stika ND s celicami organizma, je razumevanje interakcij ND na celične membrane velikega pomena. Mnogi avtorji zaključujejo, da prve interakcije med ND in celicami potekajo na celičnih membranah (Leroueil in sod., 2007; Verma in Stellacci, 2010; Chen in Bothun, 2014) ne glede na to, kako so bile izpostavljene ND (Banaszak-Holl, 2008). Na spremembo morfologije celične membrane in njeno stabilnost vplivajo tako biokemični kot fizikalni dejavniki (Elsaesser in Howard, 2012).

Interakcije med površino ND in lipidnim dvoslojem so kompleksen pojav, pri katerem lahko sodelujejo van der Waalove, elektrostatične, hidrofobne, hidrofilne in protruzijske sile. ND se lahko adsorbirajo na membrane in povzročijo prerazporeditev v lipidnem dvosloju (Wang in sod., 2008; Yu in Granick, 2009), na destabilizacijo membrane lahko delujejo preko oksidoredukcijskih procesov, ali pa je učinek ND na membrano posledica odtapljanja ionov (Hong in sod., 2006; Wang in sod., 2008; Xia in sod., 2011). ND se na membrano lahko adsorbirajo in povzročijo lokalno ukrivljenost (Wang in sod., 2008; Chen in Bothun, 2011), lahko pa s formacijo por, tanjšanjem membrane in lipidno peroksidacijo zmanjšajo njeno integriteto (Mecke in sod., 2005; Hong in sod., 2006; Ginzburg in Balijepalli, 2007; Leroueil in sod., 2008; Moghadam in sod., 2012; Li in Malmstadt, 2013).

ND lahko povzročijo apoptozo celice (Park in sod., 2008), lahko pa se vežejo na plazemske proteine, kar bistveno vpliva na njihovo interakcijo s celicami (Ruh in sod., 2012).

2.1.2.2 Nanodelci in proteinska korona

ND po vstopu v biološko okolje pridejo v stik s številnimi biomolekulami, sestavljenimi iz proteinov, lipidov in sladkorjev, raztopljenimi v telesnih tekočinah. Proteinska korona je izraz, ki pomeni oplaščanje ND s proteini (Cedervall in sod., 2007; Lundqvist in sod., 2008), vendar se na površino ND ne vežejo le proteini, temveč tudi lipidi in sladkorji. Oplaščeni ND spremenijo fizikalno-kemične lastnosti in dobijo novo identiteto (Monopoli in sod. 2012). Za nastanek proteinske korone sta razen biomolekul in vrste, velikosti in naboja ND pomembna

tudi časovna izpostavitve ND biomolekulam v telesni tekočini in razmerje med fiziološko tekočino in ND. Interakcije proteinske korone z biološkimi sistemi so kompleksne in še predmet intenzivnih raziskav (Lee in sod., 2014; Docter in sod., 2015, Gräfe in sod., 2016).

2.1.2.3 Nanotoksičnost

Z vstopom ND v telo se ti lahko preko krvnega obtoka zanesejo po celem organizmu. Skrb vzbujajoči so številni rezultati raziskav, ki kažejo na citotoksične, genotoksične in imunotoksične učinke ND na celice (Huang in sod., 2009; Setyawati in sod., 2013; Farrera in Fadeel, 2015).

Toksičen učinek nanodelcev, ki ima za posledico nastanek okvar v celicah, genomu in delovanju imunskega sistema, naj bi bil posledica povečanega sproščanja reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ), ki inducirajo oksidativni stres, v katerem tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti prevlada nad antioksidativno obrambo celice (Khanna in sod., 2015).

Vpliv ND na imunski sistem je lahko zelo raznolik, saj ND lahko delujejo v organizmu kot adjuvansi (spodbujevalci imunskega sistema) ali hapteni, kar pomeni, da vplivajo na povišano sproščanje številnih citokinov ter sprememb prenosa signalov, aktivacije komplementarnega sistema, celičnega in humoralnega vnetnega odgovora in v nekaterih primerih zavirajo delovanje imunskega sistema. Organizem se na prisotnost ND lahko odzove na različne načine: lahko odstrani ND kot tujke, razvije povišano občutljivost za njihovo prisotnost ali pa razvije vnetno ali avtoimuno bolezen (Kononenko in sod., 2015; Ilinskaya in Dobrovolskaia, 2016).

Mehanizem nastanka okvare dedne zasnove in nastanka novotvorb, naj bi bil prav tako posledica povečanega sproščanja reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ), saj prosti radikali in lipidna peroksidacija povzročijo poškodbe DNA, spremenjeno izražanje genov ter vplivajo na potek vnetnega odgovora (Jaeger in sod., 2012; Fu in sod., 2014). Poročajo pa tudi o neposrednem vplivu ND na genski material (Toyooka in sod., 2012).

2.1.3 Vpliv nanodelcev na eritrocite in trombocite

Ker se ND prenašajo do organov in celic po krvnem obtoku, so ključnega pomena raziskave njihovega vpliva na krvne celice. Vsi tipi krvnih celic opravljajo številne funkcije, npr. aktivni in pasivni transport snovi do tarčnih tkiv, zanje je značilno ohranjanje ionskega in električnega gradienta in homeostaze, hkrati pa imajo značilno celično membrano in so zato ustrezen modelni sistem za raziskave vpliva ND in vitro (Suwalsky in sod., 2009). Zaradi naraščajoče uporabe ND, tudi v medicinske namene, je vse več raziskav namenjenih vplivu ND na eritrocite in trombocite. Eritrociti so bikonkavne geometrije, ki lahko zaradi viskoelastičnosti in glede na zunanje sile, spremenijo obliko celice, med tem ko so trombociti diskoidne oblike in zato imenovani tudi ploščice. Študije poročajo o vplivu ND na spremenjeno obliko membrane eritrocitov, zaradi česar lahko membrana izgubi viskoelastične sposobnosti in pride do morfoloških sprememb eritrocitov ter do nastanka sferocitov, ehinocitov, stomocitov, idr ter nenazadnje do hemolize (Mocan, 2013; Kozelskaya in sod., 2016). ND lahko aktivirajo trombocite in spremenijo morfološko obliko celice iz ploščice v okroglo celico s protruzijami (Šimundić in sod., 2013), ki se lahko posledično agregirajo (Samuel in sod., 2015; Fröhlich 2016). Našteti je več mehanizmov vpliva ND na membrano eritrocitov in trombocitov in sicer, da: ND poškodujejo membrano eritrocitov in trombocitov tako, da se na membrano celic vežejo zaradi elektrostatične interakcije, saj je membrana negativno nabita in zato privlači pozitivno nabite ND, ki lahko povzročijo hemolizo eritrocitov (Kozelskaya in sod., 2016) in aktivacijo ter agregacijo trombocitov (Ziemba in sod., 2012). Kot drugi vzrok za morfološke spremembe eritrocitov pod vplivom ND navajajo sproščanje RKZ iz lipidov membrane eritrocitov, ki poškodujejo membrano eritrocitov (Nel in sod., 2009; Asharani in sod., 2010; Huang in sod., 2016) in trombocitov, kjer RKZ, povzročijo aktivacijo trombocitov ter posledično njihovo agregacijo, s čimer se poveča tveganje za nastanek tromboembolij (Vermeulen in sod., 2005; Shannahan in sod., 2012, Ilinskaya in Dobrovolskaia, 2013; Nemmar in sod., 2015). Nadalje opisujejo, da lahko zaradi hidrofobne interakcije med ND in celično membrano pride do morfoloških sprememb in razpok v membrani eritrocitov in poškodbe celice (Kozelskaya in sod., 2016) ter do aktivacije trombocitov (Miyamoto in sod., 1990). ND lahko v eritrocitu povzročijo spremembe na citoskeletu ter tako vplivajo na morfološke spremembe eritrocitov (Diakowski in sod., 2006), navajajo pa tudi, da do sprememb citoskeleta pride lahko zaradi konfiguracione spremembe membranskega proteina band 3 (Gimsa in Ried, 1995). Deb

in sodelavci (2011) so s fluorescinskim označevalcem prikazali prisotnost ND na granulah trombocitov in opisujejo možnost, da bi ND v trombocitu povzročili aktivacijo le-tega (Deb in sod., 2011).

2.1.4 Anorganski nanodelci, uporabljeni v doktorski nalogi

2.1.4.1 Nanodelci titanijevega dioksida

ND TiO₂ lahko najdemo v številnih produktih: v športnih oblekah, plastiki, steklu, fasadah, papirju, hrani, prisotni so v farmaciji, v kozmetični industriji in v drugih gospodarskih panogah (Fujishima in sod., 2008; Shi in sod., 2013). ND TiO₂ se v največji meri proizvajajo kot prah bele barve in brez vonja. Letna poraba tega materiala je okrog 4 milijone ton (Ortlieb, 2010). Zaradi izredne kemijske stabilnosti in fotokatalitičnosti so bili ND TiO₂ prvotno uporabljeni v samočistilnih površinah, na katere so nanесли ND TiO₂, ki so ob obsevanju sproščali proste radikale, razgrajevalce polutantov. Zaradi fotokatalitičnega učinka so ND TiO₂ vse bolj zastopani tudi v medicini, predvsem v onkologiji, kjer se uporabljajo pri fotodinamični terapiji tumorjev (Vinardell in Montserrat, 2015). Stopnja toksičnosti ND TiO₂ je manjša v primerjavi z drugimi anorganskimi ND, saj so toplotno in kemijsko stabilni in slabo topni v tekočinah (Hahn in sod., 2012).

2.1.4.2 Nanodelci cinkovega oksida

ND ZnO so zaradi fotokatalitičnih in drugih fizikalno-kemičnih lastnosti eni izmed najpogosteje uporabljenih ND v proizvodnji keramike, barv, hrane, kozmetike, predvsem sončnih krem in zobnih past ter lasne kozmetike (Osmond in McCall, 2010). V porastu je uporaba ND ZnO za medicinske namene, kjer prihaja do neposrednega stika med ND ZnO in telesom. Nove študije potrjujejo uporabnost ND ZnO pri zdravljenju diabetesa (Kitture in sod., 2015), prenosu zdravil do tarčnih celic (Tripathy in sod., 2015), za onkološke namene pa predvsem pri fotodinamični terapiji (Sadjadpour in sod., 2016).

Toksičnost ND ZnO je pogojena z indukcijo oksidativnega stresa in odtapljanjem Zn ionov (Brunner in sod., 2006; Xia in sod., 2011) ter neposrednim stikom med ND in celicami (Premanathan in sod., 2011).

2.2 MASTOCITOM

2.2.1 Mastociti

Mastociti – tkivni bazofilci so heterogena populacija celic, izvirajoča iz pluripotentnih krvotvornih matičnih celic, označenih z antigenom CD34, ki se lahko diferencirajo ne samo v krvne, pač pa tudi v druge celične vrste pod vplivom hematopoetina liganda c-kit, rastnega dejavnika SCF (angl. stem cell factor, SCF) ter drugih citokinov (Lin in London, 2006; Lin in sod., 2006; Scott in Stoskham, 2000). Mastociti imajo na svoji celični površini receptor KIT, ki je iz družine tirozin kinaznih receptorjev (TKR) in se aktivira po vezavi liganda. KIT je kodiran z genom *c-KIT*. Mastociti so celice, ki sodelujejo pri vnetnem procesu. Njihova aktivacija povzroči sproščanje številnih vazoaktivnih substanc iz citoplazemskih zrn, kot so: amini (histamin, serotonin), encimi (katepsin G, fosfolipaza A, triptaza, kimaza idr.), proteoglikani (heparin, hondroitin sulfat) (Scott in Stoskham, 2000), citokini (dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. tumor necrosis factor alfa, TNF α)), interleukin-6 (IL-6), kemokini (kemokin CCL2, kemokin CXCL1), rastni dejavnik (žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor, VEGF), bazični fibroblastni rastni dejavnik (angl. basic fibroblast growth factor, bFGF) in lipidni mediatorji (prostaglandin D2, PGD2) ter levkotrien C4 (LTC4) (Kumar in Sharma, 2010).

2.2.2 Pojavnost mastocitoma

Mastocitom (angl. mast cell tumor, MCT) je tumor, ki nastane z neoplastično proliferacijo mastocitov, najpogosteje v koži in podkožju. Nenehna izpostavljenost kože različnim kemičnim in mehanskim dejavnikom je najverjetneje eden od razlogov, da je kar 9,5–51 % vseh tumorjev psov kožnih (Bronden in sod., 2010), med katerimi je med najpogostejšimi prav MCT, ki zajema 16–21 % vseh kožnih tumorjev pri psih (Finnie in Bostock, 1979; Bostock in sod., 1986). Obolevajo predvsem psi v starosti 8,5–9,5 let ne glede na spol. Pri pasmah, sorodnih buldogu, se pogosteje pojavljajo MCT nizke ali srednje stopnje malignosti. Pri nemških bokserjih se pogosteje pojavijo MCT z nizko stopnjo malignosti (Foncesa in sod., 2015), medtem ko se pri mopsih lahko razvijejo multipli benigni kožni MCT (McNiel in sod., 2006). Shar-peiji, nasprotno, najpogosteje obolevajo za agresivno maligno obliko kožnega MCT

(Mullins in sod., 2006). Pogosto za MCT obolevajo tudi bostonski terierji, labradorci, zlati prinašalci, beagli, šnavcerji, rodezijski grebenarji, pitbuli in weimaranci (Peters, 1969; Patnaik in sod., 1984; Bostock in sod., 1986; Rothwell in sod., 1987; White in sod., 2011; Blackwood in sod., 2012). Nemški bokserji obolevajo 10,7-krat pogosteje kot psi mešane pasme (Shoop in sod., 2015).

Etiologija nastanka MCT še ni v celoti pojasnjena, čeprav je znano, da je za nastanek tumorja pomembna genetska predispozicija in izguba kontrole nad regulacijo izražanja receptorja KIT (London in Kisseberth, 1996; Downing in sod., 2002; Webster in sod., 2007). Raziskave kažejo, da se lahko na genu *c-KIT*, ki kodira KIT, pojavi mutacija, tandemska podvojitev znotraj eksona 11 in 12, kar ima za posledico nekontroliran prenos signalov preko KIT in stalno aktivacijo KIT (London in sod., 1999; Letard in sod., 2008). Redke so mutacije na drugih exonih 2, 6, 7, 8, 9, 15, 17 (Letard in sod., 2008; Takeuchi in sod., 2013). Mutacija na genu *c-KIT* je prisotna pri 25–30 % MCT srednje in visoke stopnje malignosti, pri katerih so lokalne ponovitve pogostejše in pogosteje zasevajo, kar pomeni slabšo prognozo (Downing in sod., 2002; Zemke in sod., 2002; London in sod., 2003; Webster in sod., 2008). Mutacije na genu *c-KIT* so potrdili tudi pri psih z gastrointestinalnimi stromalnimi tumorji (GIST) (Gregory-Bryson in sod. 2010) ter v humani medicini pri bolnikih z levkemijo (Fink in sod., 2012; Machado in sod., 2012), sistemsko mastocitozo (Boissan in sod., 2000; Fink in sod., 2012) in GIST (Hirota in sod., 1998; Grgić in Novaković, 2014).

2.2.3 Klinična slika

MCT se lahko pojavljajo v koži ali podkožju v več oblikah: dobro diferencirani, slabo diferencirani, podkožni in multipli primarni (Mullins in sod., 2006). Dobro diferencirani kožni MCT, ki so solitarni, rastejo počasi in imajo površino kože nad seboj neodlakano. MCT, ki se v več letih od nastanka ne spreminjajo, so pogosteje benigni (Bostock, 1973). Slabo diferencirani MCT, ki so hitro rastoči, srbeči in z ulcerirano površino, lahko tudi s satelitskimi lezijami okrog primarnega tumorja ali s spremljajočo limfadenopatijo ali organomegalijo nakazujejo na maligno obliko MCT (Mullins in sod., 2006; Thamm in Vail, 2007). Podkožni MCT spominjajo na lipom.

MCT se ponavadi pojavijo na različnih mestih v koži in podkožju. Približno 50 % se jih pojavi na trupu in perinealni regiji, 40 % na okončinah in 10 % na vratu in glavi (Hottendorf in Nielsen,

1967; Cohen in sod., 1974; Thamm in Vail, 2001). MCT le redko nastanejo v ustni votlini, nosni votlini, žrelu, očesni veznici, sečevodu, hrbtenici, v gastrointestinalnem traktu, prav tako je zelo redek pojav diseminirane mastocitoze (Patnaik in sod., 1982; Crowe, 1986; Iwata in sod., 2000; Moore in sod., 2001; Ozaki in sod., 2002; Steffey in sod., 2004; Thamm in Vail, 2007).

Paraneoplastični klinični znaki nastanejo zaradi sproščanja aktivnih substanc in mediatorjev vnetja iz citoplazemskih zrn celic MCT ter sposobnosti vzpodbujanja nastanka in izločanja drugih citokinov ter vnetnih celic. Klinična slika teh tumorjev je zelo raznolika. Lokalne spremembe na mestu MCT so oteklina, rdečina, razjede in upočasnjeno celjenje. Mehanična manipulacija MCT (palpacija, punkcija) lahko privede do sproščanja aktivnih substanc iz zrn MCT, kar povzroči edem in eritem okolice, t. i. Darierjev sindrom (Thams in Macy, 1981). Sistemske učinki histamina in heparina, ki se izločata iz citoplazemskih zrn mastocitov, se kažejo kot bruhanje, driska, melena, vročina, periferni edemi in slabo celjenje (Thamm in Vail, 2007). Pri intenzivnejšem sistemskem sproščanju histamina lahko pride celo do aritmij, sistemske hipotenzije in šoka (Fox, 2002). Sproščanje heparina iz MCT pa lahko privede tudi do koagulopatije (Hottendorf in Nielsen, 1965; O'Keefe, 1990).

2.2.4 Diagnostika in klasifikacija mastocitoma

2.2.4.1 Citološka diagnostika

MCT v 92–96 % primerov lahko diagnosticiramo s citološko preiskavo vzorcev, odvzetih s pomočjo tankoigelne aspiracijske ali neaspiracijske biopsije (TIAB ali TIB). Mastociti so okrogle celice z jedrom okrogle ali ovalne oblike, ki imajo v citoplazmi značilna metakromatična zrnca (Scott in Stockham, 2000). S citološko preiskavo lahko postavimo diagnozo MCT, za potrditev diagnoze in oceno stopnje malignosti ter s tem napoved prognoze pa je potrebna patohistološka preiskava tumorja.

2.2.4.2 Patohistološka diagnostika

Vzorci za patohistološko preiskavo lahko odvezamo z incizijsko ali ekscizijsko biopsijo, kar je odvisno od velikosti in lokacije tumorja.

Najstarejša in najpogosteje uporabljena razvrstitev po patohistoloških kriterijih je t. i. klasifikacija po Patnaiku (Patnaik in sod., 1984), ki razvršča MCT v tri histološke stopnje malignosti: dobro diferencirani MCT (histološka stopnja malignosti I), zmerno diferencirani MCT (histološka stopnja malignosti II) in diferencirani MCT (histološka stopnja malignosti III).

Histološka stopnja malignosti je najpomembnejši samostojni napovedni dejavnik za MCT (Blackwood in sod., 2012). Po podatkih Patnaika in sod. (1984), 93 % psov z MCT histološke stopnje malignosti I, 47 % psov z MCT stopnje malignosti II in samo 6 % psov z MCT stopnje malignosti III preživi več kot 1500 dni (Patnaik in sod., 1984).

Čeprav je Patnaikov sistem zlati standard za prognozo MCT, ima določene pomanjkljivosti, saj je stopnja malignosti II, zmerno diferenciran MCT, nepredvidljivega obnašanja in se lahko izraža kot benigni ali maligni tumor s ponovitvijo in/ali zasevki (Seguin in sod., 2001; Weisse in sod., 2002). Zato so leta 2011 Kiupel in sod. (2011) izdali nova priporočila dvostopenjskega ocenjevanja. Po njihovem predlogu ločujemo MCT nizke stopnje malignosti (angl. low grade) in visoke stopnje malignosti (angl. high grade) (Kiupel in sod., 2011). V omenjeni študiji so avtorji potrdili, da imajo psi z MCT visoke stopnje malignosti statistično značilno krajše obdobje brez bolezni, da imajo zasevke pogosteje in krajšo dobo preživetja, ki je povprečno 4 mesece pri visoko malignih in več kot 2 leti pri nizko malignih MCT.

2.2.4.3 Imunohistokemične metode za napoved poteka bolezni

Poleg histološke stopnje malignosti sta za napoved prognoze in izbiro načina zdravljenja pomembna vzorec imunohistokemičnega izražanja receptorja tirozin kinaze, tj. KIT-barvanja (Kiupel in sod., 2004) ter proliferacijski indeks Ki-67. Izražanje obeh je povezano s pogostnostjo lokalnih ponovitev in krajšo dobo preživetja (Abadie in sod., 1999, Webster in sod., 2007).

Izražanje KIT lahko prikažemo z imunohistokemičnim barvanjem, pri katerem uporabimo protitelo proti c-kit (CD117). Pri MCT so opisani trije vzorci imunohistokemične reakcije: na celični membrani (vzorec KIT-barvanja I), fokalno ali zrnčasto barvanje v citoplazmi (vzorec KIT-barvanja II) in difuzno citoplazemsko barvanje (vzorec KIT-barvanja III). Vzorec KIT-barvanja I se pojavlja pri normalnih mastocitih in MCT stopnje malignosti I. Vzorca KIT-barvanja II in III sta povezana s povečanim tveganjem za lokalno ponovitev ter krajšim časom

preživetja (Webster in sod., 2004) in sta prisotna pri MCT stopnje malignosti II in III. Vzorec barvanja KIT nakazuje korelacijo z mutacijo na genu *c-KIT* in je napovedni dejavnik preživetja pri MCT kože pri psih ter pomemben podatek pri izbiri zdravljenja (Webster in sod., 2004). Protein Ki-67 se nahaja v jedru in je označevalec celične proliferacije t. i. proliferacijski indeks Ki-67. V času aktivne faze razvojnega ciklusa celice je sestavljen iz dveh proteinskih podenot (345 in 395 kDa) (Abadie in sod., 1999). Relativno število Ki-67 pozitivnih celic v tkivu je zato v korelaciji s proliferacijskim ciklusom celice in ga ne najdemo v fazi mirovanja celice. Ki-67 prikažemo z imunohistokemičnim barvanjem in določimo s štejetjem imunohistokemično obarvanih jeder novotvorbni celic od skupno 1000 jeder (Abadie in sod., 1999). Visok Ki-67 proliferacijski indeks je prognostični dejavnik, povezan z visoko smrtnostjo, pogostimi zasevki in ponovitvami (Scase in sod., 2006). Ki-67 uporabljamo za napoved poteka bolezni in izbiro načina zdravljenja predvsem pri MCT stopnje malignosti II (Maglennon in sod., 2008). Za napoved nadaljnega poteka bolezni in izbiro zdravljenja lahko v kombinaciji s histološko preiskavo uporabljamo še druge proliferacijske označevalce, kot so: s srebrom dokazljiva regija za organizacijo nukleolusov (angl. argyrophilic nucleolar organiser regions, AgNOR), jedrni antigen proliferirajočih celic (angl. proliferating cell nuclear antibody, PCNA) in mitotični indeks (MI) (Blackwood in sod., 2012).

2.2.4.4 Določanje kliničnega stadija bolezni

Za določanje kliničnega stadija bolezni je potrebno opraviti TIAB regionalne bezgavke MCT in ultrazvočni pregled trebušne votline, predvsem vranice, jeter in bezgavk (Blackwood in sod., 2012). Warland in sod. (2014) so ugotovili, da MCT primarno zaseva v regionalne bezgavke in da oddaljenega zasevanja ni, če v regionalnih bezgavkah ni zasevka (Warland in sod., 2014). TIAB vranice in jeter opravimo vedno v primeru zasevanja v regionalne bezgavke ne glede na rezultate ultrazvočne preiskave (Finora in sod., 2006; Book in sod., 2011). Radiografijo prsne votline uporabimo zaradi morebitnih povečanih bezgavk v prsni votlini, medtem ko so zasevki v pljučih zelo redki (Warland in sod., 2014). V kostnem mozgu le redko najdemo zasevke (4,5 %) (Endicott in sod., 2007), zato ga rutinsko ne biopsiramo.

2.2.5 Zdravljenje

Prvi izbor zdravljenja MCT obsega kirurško odstranitev primarnega tumorja z ustreznimi varnostnimi robovi ter odstranitev bezgavke. V primeru zasevka sta kot neoadjuvantni ali adjuvantni zdravljenji radioterapija in kemoterapija, pri psih z mutacijo tandemske podvojitve znotraj eksona 11 in 12 na genu *c-KIT* pa zdravimo še z inhibitorji tirozin kinaze, kot sta toceranib in masitinib. Poleg naštetih metod zdravljenja se za lokalno zdravljenje vse bolj uveljavljajo alternativne metode, kot sta elektrokemoterapija in elektrogenska terapija (Kodre in sod., 2009, Pavlin in sod., 2011, Pavlin in sod., 2015). Odločitev o izbiri zdravljenja je odvisna od lokacije, velikosti, števila nodulov in stopnje malignosti tumorja ter od prisotnosti morebitnih zasevkov.

2.2.5.1 Kirurško zdravljenje

Pri MCT brez zasevkov je prvi izbor zdravljenja kirurška ekscizija. Kožne tumorje nizke in srednje stopnje malignosti kirurško v celoti odstranimo z 2 cm varnostnim robom in spodaj ležečo mišično fascijo (Simpson in sod., 2004). Pri MCT stopnje malignosti II, ki niso bili v celoti odstranjeni in so robovi biopsije infiltrirani s tumorskimi celicami, se ponovitev bolezni v enem letu pojavi v 7,3 %, v dveh letih v 22,1 % in treh letih v 33,3 % primerih (Seguin in sod., 2006). V primerih, ko tumorja ne moremo kirurško v celoti odstraniti, je za preprečitev ponovitve bolezni potrebno dodatno zdravljenje. Kožne MCT visoke stopnje malignosti izrežemo v celoti s 3 cm varnostnim robom in globoko mišično fascijo. Ker je možnost zasevanja teh visoko malignih tumorjev velika, je potrebno še dodatno zdravljenje (Thamm in Vail, 2007). Glede na rezultate novjših kliničnih študij naj bi varnostni rob MCT pri nodulih premera 0,2–3,1 cm bil le 1 cm ob strani in 4 mm v globino (Schultheiss in sod., 2011) oziroma naj bi odstranili MCT ne glede na velikost in stopnjo malignosti tako, da je varnostni rob enak premeru tumorja, a maksimalno do 4 cm (Pratschke in sod., 2013).

2.2.5.2 Radioterapija

Radioterapijo najpogosteje uporabljamo adjuvantno po kirurški terapiji brez ustreznih varnostnih robov. Uspešno jo lahko uporabljamo tudi za zdravljenje lokalnih metastaz. V študijah zdravljenja MCT stopnje malignosti I/II z radioterapijo v kombinaciji s kirurškim zdravljenjem so ugotovili, da je 79 % do 97 % psov eno leto in 77 % do 85 % psov po dveh letih brez bolezni (Turrel in sod., 1988; Al-Sarraf in sod., 1996; Frimberger in sod., 1997; LaDue in sod., 1998; Poirier in sod., 2006). 19 psov z MCT stopnje malignosti I/II/III in z zasevki v regionalni bezgavki je po kirurškem zdravljenju, radioterapiji in kortokosteroidu prednisolonu imelo interval brez bolezni v povprečju 1240 dni (Chaffin in Thrall, 2002).

2.2.5.3 Kemoterapija

Kemoterapijo uporabljamo v kombinaciji s kirurškim zdravljenjem in/ali radioterapijo v primerih MCT visoke stopnje malignosti. Pri MCT stopnje malignosti II izberemo kemoterapijo v primeru, ko so proliferacijski markerji visoki, ko predstavljajo veliko tveganje za zasevanje ali pa MCT že zaseva. Namen kemoterapije je zdravljenje tumorja in upočasnitev ter preprečevanje zasevanja. Najpogosteje se v kombinaciji uporabljata kemoterapevtika vinblastin in prednisolon (Davies in sod., 2004; Thamm in sod., 2006). V eni od študij je bila v kombinaciji s kirurškim zdravljenjem in uporabi vinblastina ter prednisolona pri 61 psih z MCT stopnje malignosti III povprečna doba preživetja psov 1305 dni in pri psih z MCT stopnje malignosti II, z zasevki v lokalni bezgavki in/ali nečistimi robovi po operaciji 3 leta (Thamm in sod., 2006), medtem ko je po samo kirurški odstranitvi MCT stopnje malignosti III preživelo leto dni le 6 % do 27 % psov (Bostock, 1973; Patnaik in sod., 1984; Bostock in sod., 1989). Lomustin je drugi pogosto uporabljen kemoterapevtik v kombinaciji s kortikosteroidom prednisolonom in/ali vinblastinom (Cooper in sod., 2009; Rassnick in sod., 2010). V študijo zdravljenja s kombinacijo lomustina, vinblastina in prednisolona je bilo vključenih 17 psov z neoperabilnim MCT in 35 psov MCT stopnje malignosti III ali MCT z metastazami. Od 17 psov z neoperabilnim MCT je odgovorilo na zdravljenje 65 % psov, od tega s popolnim odgovorom (povprečno 141 dni) 5 % psov in z delnim odgovorom 6 % psov (povprečno 66 dni). Psi z MCT stopnje malignosti III so imeli krajši interval brez progresije bolezni kot psi z MCT II z zasevki (190 v primerjavi z 954 dnevi). Povprečno obdobje brez bolezni pri psih s kombinirano terapijo

je bilo 489 dni (Rassnick in sod., 2010). V študiji zdravljenja nepopolno kirurško odstranjenega MCT stopnje malignosti II pri 12 psih z lomustinom in prednisolonom so bili vsi psi eno leto brez bolezni in dve leti 77 % psov (Hosoya in sod., 2009).

2.2.5.4 Inhibitorji tirozin kinaze

V zadnjem času v primeru ponovnega nastanka MCT, ki je že bil zdravljen kirurško, uporabljamo za nadaljnje zdravljenje inhibitorje tirozin kinaze (TKI). Majhne molekule TKI se aplicirajo peroralno in se vežejo na vezno mesto za ATP ter zavirajo signal preko KIT in onemogočajo delovanje receptorja. Toceranib (Palladia, Zoetis Belgium SA, Belgija) in masitinib (Masivet, Centre Spécialités Pharmaceutiques, Francija) sta registrirani TKI za uporabo v veterinarski medicini. Toceranib deluje tudi na receptor VEGF (angl. vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) in na receptor za rastni dejavnik iz trombocitov (angl. platelet derived growth factor, PDGFR) ter zato vpliva na angiogenezo v tumorju in zmožnost zasevanja (Mendel in sod., 2003; London in sod., 2009). London in sod. (2009) poročajo, da je bil pri psih z MCT stopnje malignosti II in III, pri katerih so se ponovili tumorji po kirurškem zdravljenju, zdravljenih s toceranibom po 6 tednih objektivni odgovor na zdravljenje v 37,2 % (8,1 % popoln, 29,1 % delni) primerov v primerjavi s 7,9 % primerov psov, zdravljenih s placebom. Povprečno časovno obdobje od začetka zdravljenja do progresije tumorja je bilo 9 do 10 tednov za razliko od 3 tednov pri psih, ki so dobivali placebo (London in sod., 2009).

Hahn in sod. (2008) poročajo, da je poteklo pri psih z neoperabilnim MCT stopnje malignosti II in III ali MCT, ki se je lokalno ponovil, vendar brez zasevkov, in zdravljenih samo z masitinibom, od začetka zdravljenja do progresije tumorja povprečno 253 dni, za razliko od 75 dni pri psih, zdravljenih s placebom. V tej skupini psov, zdravljenih samo z masitinibom, ni bilo razlike v učinku terapije med MCT, ki je imel mutacijo gena *c-KIT* ali divjim tipom. Razen zaviranja prenosa signalov preko KIT obstaja verjetno še drug mehanizem delovanja, kot je npr. zaviranje drugih protein-kinaz, kar vpliva na rast tumorja (Hahn in sod., 2008).

2.2.5.5 Elektrokemoterapija

Elektrokemoterapija (angl. electrochemotherapy, ECT) združuje uporabo kemoterapije in elektroporacije. Je alternativni način lokalnega zdravljenja tumorjev in je predmet novega pristopa zdravljenja nodularnih MCT (Tozon in sod, 2001; Lowe in sod, 2016). Vnos kemoterapevtika je lahko sistemski v ožilje ali neposreden v tumor. Po vnosu kemoterapevtika cisplatina ali bleomicina sledi elektroporacija tkiva z ustreznimi električnimi pulzi, kar poveča prepustnost celičnih membran in olajša prehod kemoterapevtikov v tarčno celico ter poveča citotoksičnost cisplatina za 80-krat in bleomicina za 800-krat (Belehradek in sod., 1993; Serša in sod., 1995). Električni pulzi s svojim učinkom na žilje zaradi zmanjšane pretoka podaljšajo čas delovanja kemoterapevtikov. Zaradi elektroporacije vseh celic v tumorju pride tudi do poškodb endotela žil v tumorju in posledično do sproščanja antigenov iz tumorskih celic ter hkrati sistemskega imunskega odgovora, kar dodatno pripomore k uničevanju tumorskega tkiva (Mir in sod., 1999; Gehl, 2003, Serša in sod., 2006). Kodre in sod. (2009) so v klinični študiji primerjali rezultate uspešnosti zdravljenja MCT s kirurškim posegom in ECT pri psih. V času spremljanja pacientov (30 mesecev po kirurškem posegu in po ECT) so popolni odgovor brez ponovitve bolezni dosegli pri 50 % tumorjev, zdravljenih s kirurškim posegom, in pri 70 % tumorjev, zdravljenih z ECT (Kodre in sod., 2009).

2.2.5.6 Elektrogensko zdravljenje

Pri elektrogenski terapiji (EGT) uporabljamo elektroporacijo za vnos terapevtskih genov, najpogosteje tistih, ki nosijo zapis za citokine. Terapevtski geni se vnašajo v tumorsko tkivo ali skeletno mišičnino, čemur sledi elektroporacija z namenom začasnega povečanja prepustnosti celične membrane in boljšega vstopa molekul v celico ter posledičnega izražanja kodiranega transgena. Pavlin in sod. (2011) so v klinični študiji, v kateri so zdravili MCT pri psih z intratumorsko EGT s plazmidom, ki nosi zapis za humani interleukin-12 (IL-12), dosegli zmanjšanje volumnov tumorjev za 15 do 38 % začetne velikosti. S histološkim pregledom zdravljenih tumorjev so ugotovili povečano infiltracijo vnetnih celic in zmanjšano število mastocitov. Pri zdravljenih psih je bilo doseženo sistemsko izločanje IL-12 in interferona γ (IFN- γ) brez stranskih učinkov (Pavlin in sod., 2011). Razen lokalnega učinka IL-12 na tumor je opisan vpliv sistemskega učinka IL-12 na oddaljene tumorje (Pavlin in sod., 2009).

Kombinacija obeh opisanih načinov zdravljenja, ECT in EGT, je trenutno v fazi kliničnega preizkušanja z namenom lokalnega in sistemskega zdravljenja tumorjev in zdravljenja ali preprečevanja morebitnega zasevanja. Pavlin in sod. (2015) so objavili rezultate 32,5 mesecev trajajoče študije zdravljenja MCT 18 psov z EGT, v kateri je bil dosežen 72 % popolni odgovor na zdravljenje, od tega 100 % pri tumorjih, manjših od premera 2 cm (Pavlin in sod., 2015).

2.2.5.7 Druge metode zdravljenja, ki so bile glede na literaturne vire uporabljene redko

Izhajajoč iz strokovne literature so se kot metode zdravljenja uporabili še lokalni kortikosteroidi, ki se uporabljajo za zmanjšanje velikosti preobsežnega tumorja za kirurško zdravljenje ali v paliativne namene, ko je tumor neodziven na kemoterapijo in radioterapijo (Rogers, 1996); imunoterapija (Schusser, 1990), manjkajo pa relevantni podatki raziskav (Blackwood, 2012); hipertermija tumorja je bila v raziskavi uporabljena kot dodatno zdravljenje z radioterapijo (Thrall in Dewhirst, 1985), vendar brez dokazanega večjega uspeha kot sama radioterapija; fotodinamična terapija (Lucroy in sod., 2000), namenjena za zdravljenje manjših tumorjev, vendar s pogostimi degranulacijami, in krioterapija za zdravljenje tumorjev, manjših od 1 cm, na mestih, kjer s kirurškim zdravljenjem ne moremo izrezati tumorja v celoti (Krahwinkel, 1980).

2.2.6 Geni, signalni proteini in encimi, pomembni za prognozo mastocitoma

Ves čas potekajo raziskave tudi na molekularni ravni, s pomočjo katerih bi lahko samostojno ali v kombinaciji z že znanimi dejavniki še boljše prognoziral in zdravili MCT. Tako so Fenger in sod. (2014) opisali povečano izražanje mikroribonukleinske kisline-9 (angl. micro ribonucleic acid RNA-9, miRNA-9), ki se pojavlja pri agresivnih oblikah MCT pri psih (Fenger in sod., 2014). Povečano izražanje miRNA-9 je moč najti tako v primarnem tumorju kot tudi v zasevkih, kar nakazuje na vlogo miRNA pri njihovem nastanku, saj je miRNA regulator genov, pomembnih za normalno diferenciacijo in rast celic (Fenger in sod., 2014). Prav tako je v študiji izražanja gena za tumor zavirajoče proteine (angl. tumour-suppressor gene in lung cancer, *TSLCI*) pri psih z MCT nakazana njegova morebitna pomembna vloga v zasevanju. Znano je, da je izražanje gena *TSLCI* pogosto v negativni korelaciji s prognozo tumorjev pljuč, dojke,

prostate, požiralnika in želodca pri ljudeh (Heller in sod., 2006; Heller in sod., 2007). VEGF je glavni regulator angiogeneze in s tem potencialni avtokrini rastni dejavnik za tumorske celice. Pri psih z MCT so potrdili izražanje VEGF v tumorskih celicah. Obenem so zabeležili korelacijo med višjim izražanjem VEGF in slabo prognozo (Mederle in sod., 2010). Tumorske celice MCT proizvajajo matriks metaloproteinaze 2 in 9 (MMP2 in MMP9). MCT visoke stopnje malignosti izločajo večje količine MMP9 v proaktivni in aktivni obliki (Leibman in sod., 2000; Giantin in sod., 2012). Schlieben in sod. (2012) so potrdili povezavo med mutacijo na genu *c-KIT* pri visoko malignem MCT in spremembo proteina, ki je sestavni del citoskeleta in sodeluje pri migraciji celic (Schlieben in sod., 2012).

2.3 MIKROVEZIKLI

Celični mikrovezikli nastajajo v zadnji fazi brstenja membran vseh celičnih tipov. Njihova biokemijska sestava, velikost in biološke aktivnosti so odvisne od matične celice, iz katere izvirajo. Brstenje MV je fiziološki pojav in je bolj izrazit pri aktivnih celicah, pri celicah, ki so izpostavljene škodljivim dejavnikom, in apoptotičnih celicah (Ratajczak, 2006; Kralj - Iglič in Veranič, 2007). Številne raziskave potrjujejo velik vpliv MV na različnih nivojih medcelične komunikacije in vpliva na druge celice, tako pri vnetnih stanjih kot tudi tumorskih obolenjih (Inal in sod., 2012).

2.3.1 Nastanek mikroveziklov

Ektosomi so vezikli, obdani s fosfolipidnim dvoslojnikom, heterogeni po velikosti (100–1000 nm) in nastanejo z direktnim brstenjem plazemske membrane navzven, predvsem na tistih mestih, kjer so lipidni rafti ustrezne sestave (Baj-Krzyworzeka in sod., 2006; Ratajczak, 2006; Ratajczak in sod., 2006). Bogati so s fosfatidilserinom, integrini, selektini in ligandi CD40 (Ohno in sod., 2013), vsebujejo pa tudi genetski material (Martins in sod., 2013). K nastanku ektosomov prispeva povišana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} (Baj-Krzyworzeka in sod., 2006; Ratajczak, 2006), aktivacija protein-kinaze C (PKC) s forbolnim estrom (Baj-Krzyworzeka in sod., 2006) in reorganizacija citoskeleta (Ratajczak in sod., 2006). Povišana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} blokira translokazo in aktivira skramblazo, tako da se poruši

membranska asimetrija in se negativno nabite molekule fosfatidilserina pojavijo na zunanji strani membrane ektosoma (Hugel in sod., 2005).

Pri reorganizaciji citoskeleta pride do odstopa plazemske membrane od kortikalnega aktina. Vloga kontraktilnega proteina v procesu nastanka mikroveziklov je pojasnjena sledeče: na vratu vzbrsti je kinaza, ki aktivira kinaza 2 lahke miozinske verige (angl. myosin light-chain kinase 2, MLCK2), ta pa omogoča kontrakcijo aktinskega citoskeleta. Skupaj z miozinom 1a (angl. myosin 1a, MYO1A) naj bi bila potrebna za nastanek MV (McConnell in sod, 2009; Muralidharan-Chari in sod., 2010). Ključen za nastanek MV iz tumorskih celic (angl. tumor-derived microvesicles, TMV) naj bi bil adenzin-difosfat (angl. adenosine diphosphate, ADP) ribozilacijski dejavnik 6 (angl. ADP-ribosylation factor 6, ARF6), ki posredno vpliva na MLCK2 (Muralidharan-Chari in sod., 2009). Prvotnemu prerazporejanju membranskih sestavin, pri čemer se najprej oblikujejo membranski izrastki, sledi odcepitev od površine celice in nastanek prostih MV (Kralj - Igljč, 2012).

Eksosomi so vezikli, obdani s fosfolipidno membrano in manjši od 120 nm. Nastajajo znotraj celice ter se zadržujejo v multivezikularnih telescih (MVT), iz katerih se sprostijo v okolico, ko se membrane MVT združijo s celično membrano (Camussi in sod. 2010; Kralj - Igljč, 2012). Biogeneza eksosoma še ni raziskana. Vključuje kompleks proteinov ESCRT (angl. endosomal sorting complexes for transport, ESCRT), ki so potrebni za nastanek MV. MVT se združi s celično membrano in eksosom se sprost v zunajcelični prostor z aktivnim procesom, ki ga katalizirata gvanozin trifosfataza (angl. guanosine triphosphatase, GTP-aza) Rab27A in Rab27B (Muralidharan-Chari in sod., 2009). Poročajo, da ima ključno vlogo pri nastanku proteolipidnega eksosoma maščobna molekula ceramid, ki nastane na citosolni strani membrane (Trajkovic in sod., 2008). Pomembno vlogo pri nastanku eksosomov pripisujejo proteinu tetraspaninu (Andreu in Yanez 2014).

Eksosomi vsebujejo vrsto proteinov, potrebnih za celični transport in membransko fuzijo (flotilin, aneksin, Tsg 101, Allix), integrinov in tetraspaninov (CD9, CD63, CD81, CD82), stresnih proteinov (Hsp70, Hsp90), posttranslacijsko modificiranih proteinov (kinaze, fosfataze, glikoziltransferaze) ter lipidnih raftov, holesterola, sfingolipidov in ceramidov (Martins in sod., 2013). Eksosomi so tudi nosilci genetskega materiala (Rak, 2010; Lee in sod., 2012; Lee in sod., 2014).

Apoptotska telesca (kaspaza-3 pozitivni MV) so MV, ki nastajajo med apoptozo, ko celotna celica razpade na apoptotska telesca. Ta so običajno večja od 1 μm in vsebujejo citoplazemski in membranski material, nukleinske kisline in organele (Kralj - Igljč, 2012).

Z različnimi mikroskopskimi tehnikami je mogoče ločiti apoptotska telesca od ostalih MV; apoptotska telesca so večja, nepravilnih oblik in optično gostejša, medtem ko zaenkrat še niso znane natančne razlike med ektosomi in eksosomi. Pri pridobivanju MV potekajo procesi, ki lahko pomembno vplivajo na njihovo identiteto, zato je razumevanje mehanizmov, ki vodijo do njihovega nastanka, še rudimentarno.

Večina študij zajema mešano populacijo ektosomov in eksosomov in jih skupno označuje kot MV; enotnega dogovora o natančni klasifikaciji zunajceličnih MV še ni (Ohno in sod., 2013). MV različnih velikosti nastanejo tudi *in vitro* s fragmentacijo celic v procesu izolacije zaradi delovanja zunanjih strižnih sil (Šuštar in sod., 2011).

2.3.2 Interakcija mikroveziklov s ciljno celico

V skladu z dosedanjim pogledom na MV lahko ti vstopijo v telesne tekočine (kri, limfo, cerebrospinalno tekočino, urin idr.), preko teh potujejo po organizmu in prenašajo snovi ter informacije do oddaljenih celic, kjer z njimi interagirajo (Baj-Krzyworzeka in sod., 2006), in tako predstavljajo mehanizem medcelične komunikacije. Opisanih je več načinov interakcij MV z receptorsko celico: fagocitoza (Feng in sod., 2010; Christianson in sod., 2013), makropinocitoza (Fitzner in sod., 2011) in fuzija s celično membrano (Parolini in sod., 2009). MV lahko neposredno stimulirajo ciljne celice (npr. z izražanjem rastnih dejavnikov ali bioaktivnih lipidov), prenesejo na membrano vezane ligande, receptorje, ali pa prenesejo v celico cele organele, kužne delce, prione in genetski material (Ratajczak, 2006; Ratajczak in sod., 2006; Cocucci in sod., 2009).

MV lahko po odcepitvi od matične celice izoliramo iz skoraj vseh telesnih tekočin ljudi in živali. Najpogosteje so MV izolirani iz vzorcev periferne krvi (Šuštar in sod., 2011), lahko pa iz ascitesa, plevralnega izliva (Mrvar - Brečko in sod., 2010), urina (Dear in sod., 2013), slin in amnijske tekočine (Keller in sod., 2011), očesnih tekočin (Perkumas in sod., 2007), sinovialne tekočine (György in sod., 2012) ter materinega mleka (Admyre in sod., 2007). Za izolacijo MV iz krvi vzorce centrifugiramo in izpiramo. Večina MV, izoliranih iz periferne krvi zdravih oseb, je trombocitnega izvora (80 %), preostalih 20 % pa predstavljajo MV iz

levkocitov, eritrocitov in endotelijskih celic (Diamant in sod., 2002; Ratajczak in sod., 2006). MV iz periferne krvi izoliramo z metodo centrifugiranja in spiranja vzorcev, medtem ko številsko koncentracijo MV določamo z metodo pretočne citometrije (Orozco in Lewis, 2010). Za analizo posameznih komponent vezave molekul v MV se uporabljajo fluorescenčni označevalci, s pomočjo katerih se proučuje vezava na površino (Diamant in sod., 2002), vsebnost nukleinskih kislin (Mestdagh in sod., 2008) in vsebnost proteinov (Prokopi in sod., 2009). Izolirani MV lahko nastajajo iz celic tudi med samim jemanjem vzorca in postopkom izolacije (Šuštar in sod., 2011). Zunanji vplivi okolja, kot so strižne sile, ki se pojavijo že pri odvzemu krvi v igli, mehanski stres in temperatura okolja, lahko pomembno vplivajo na številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi (Šuštar in sod., 2011). Kljub naštetemu MV odražajo lastnosti izvornih celic.

2.3.3 Mikrovezikli, nastali iz tumorskih celic

TMV, so heterogena skupina, ki se sprošča v zunajcelično okolje. Zaradi kompleksnosti bioaktivnih substanc, ki jih vsebujejo TMV, tako prostih proteinov kot tudi proteinov, vezanih na membrano vezikla, so nosilci številnih molekularnih informacij in sodelujejo pri napredovanju tumorja ter nastanku zasevkov, povzročajo tromboze, angiogenezo in rekrutacijo premetastatskih celic iz kostnega mozga (Baj-Krzyworzeka in sod., 2006; Ratajczak, 2006; Ratajczak in sod., 2006; Martins in sod., 2013; Minciacchi in sod, 2015). Znano je, da je število MV v krvi onkoloških bolnikov višje kot pri zdravih ljudeh (Ginestra in sod., 1998; Kim in sod. 2003; Zwicker in sod. 2009). Telesne tekočine, predvsem kri, so pomemben rezervoar TMV za njihovo identifikacijo. TMV, izolirani iz tekočin onkoloških bolnikov, bi v bodoče lahko podali več podatkov o sami bolezni (Al-Nedawi in sod., 2008). Spremljanje številske koncentracije MV v izolatih telesnih tekočin onkoloških bolnikov lahko omogoča tudi spremljanje učinkovitosti zdravljenja.

2.3.4 Prenos medceličnih informacij iz mikroveziklov, nastalih iz tumorjev do tumorskega mikrookolja

Nove raziskave nakazujejo možnost horizontalnega prenosa medceličnih informacij preko TMV in s tem nastanek tumorskega mikrookolja. TMV, dobljeni iz medijev kultur tumorskih celic, vsebujejo mnogo površinskih determinant maternih tumorskih celic, rastne dejavnike, njihove receptorje, adhezijske molekule, signalne molekule, DNA, miRNA, informacijska RNA (angl. messenger RNA, mRNA) pa tudi metaloproteinaze ter druge proteolitične encime, s pomočjo katerih razkrajajo zunajcelični matriks in s tem tudi omogočajo rast in invazijo tumorja v okolno tkivo in krvne žile (Ratajczak in sod., 2006; Minciacchi in sod, 2015).

Za uspešno rast in zasevanje tumorja sta ključnega pomena razkroj zunajceličnega matriksa in angiogeneza. Za razkroj matriksa so potrebne proteaze; MMP-2, MMP-9 ter urokinazni aktivator plazminogen (angl. urokinase-type plasminogen activator, uPA), ki razgradi bazalno membrano in fibrin. Graves in sod. (2004) so dokazali povečano število TMV z večjo vsebnostjo MMP-2, MMP-9 in uPA v krvnih vzorcih bolnic s karcinomom ovarijskega stadija v primerjavi z začetnim stadijem. Prav tako so z inhibicijo vezave proteaz na TMV izključili vpliv TMV na zasevanje (Graves in sod., 2004).

Za angiogenezo sta značilni proliferacija endotelijskih celic za tvorbo krvnih žil in njihova infiltracija v tumorsko tkivo. TMV vsebujejo rastne dejavnike, kot sta VEGF in fibroblastni rastni dejavnik (angl. fibroblast growth factors, FGF). Proteini, prisotni na TMV, povečajo izločanje proangiogenih dejavnikov iz stromalnih fibroblastov, ki pospešujejo angiogenezo preko proliferacije endotelijskih celic (Janowska-Wieczorek in sod., 2005). V TMV je mRNA, ki kodira rastne dejavnike, kar je lahko indirektno povezano z aktivacijo rastnih dejavnikov, predvsem VEGF in rastnega dejavnika hepatocitov. Dokazan je prenos nukleinskih kislin pri fuziji monocitov s TMV, ki inducirajo rastne dejavnike (Baj-Krzyworzeka in sod., 2007).

TMV lahko iz celic melanoma, ki zaseva, prenašajo tirozinsko kinazo MET do matičnih celic v kostnem mozgu, kar zaradi spremenjene mobilnosti in značaja celic močno poveča sposobnost zasevanja primarnega melanoma (Peinado in sod., 2012).

Al-Nedawi in sod. (2008) so dokazali prenos onkogenega receptorja za epidermalni rastni dejavnik (angl. epidermal growth factor receptor, EGFRvIII) iz malignega glioma preko TMV na neagresivno populacijo tumorskih celic, kar nadalje aktivira mitogen-aktivirajočo protein

kinazo (MAKP) in signalno pot Akt ter vpliva na spremembe v izražanju genov (*Bcl-xL*, *p27*) (Al-Nedawi in sod., 2008).

Kim in sod. (2002) poročajo, da lahko sfingomielin, ki je glavna sestavina lipidnih raftov, bodisi sam bodisi kot del TMV pospeši angiogenezo in s tem omogoča napredovanje tumorja (Kim in sod., 2002). Metastatske različice humanih prostatičnih adenokarcinomatovskih celičnih linij, ki kažejo večji potencial zasevanja (DU-145 in ND-1), vsebujejo več sfingomielina v primerjavi s celičnimi linijami z manjšim potencialom (LNCaP) (Dahiya in sod., 1992). Na membranskih lipidnih raftih se lahko nahajajo tudi nekateri onkogeni proteini (npr. EGRF in H-ras) (Patra, 2008).

2.3.5 Nukleinske kisline v mikroveziklih, nastalih iz tumorjev

Medcelični prenos genetskih informacij ima močan vpliv na tumorsko mikrookolje. V eksosomu sta dokazani eno-verižna DNK (Balaj in sod., 2011) in dvo-verižna DNK (Thakur in sod., 2014).

Ugotovljen je prenos mRNA na TMV iz glioblastoma (Skog in sod., 2008), želodčnega karcinoma in karcinoma kolona (Baran in sod., 2010).

TMV iz CD105 pozitivnega tumorja ledvičnih zarodnih celic stimulirajo angiogenezo in zasevanje na pljučih. Grange in sod. (2011) so ugotovili, da 105 TMV-pozitivni vezikli posedujejo proangiogeno mRNA in miRNA, ki vplivata na napredovanje tumorja in pojavljanje zasevkov (Grange in sod., 2011). Študije kažejo, da se lahko DNA in komplementarna DNA iz glioblastoma vključita v TMV, vendar ta mehanizem še ni razjasnjen (Balaj, 2011).

2.3.6 Vpliv mikroveziklov, nastalih iz tumorskih celic na imunski sistem

TMV omejujejo delovanje imunskega sistema na več načinov. Tumorske celice izločajo kaspazo 3, encim, pomemben za apoptozo v TMV, in se tako izognejo prekomernemu znotrajceličnemu kopičenju le-teh ter apoptozi celice. V TMV je močno izražen komplementarni regulatorni membranski kofaktorski protein (CD46), ki inaktivira komplement C3b in C4b. Z zamenjavo integrinov in lipidov na površini membrane TMV celica ni več razpoznavna kot tumorska (Valenti in sod., 2006). TMV lahko odstranijo ligand Fas (FasL) iz tumorske celice in s tem slabijo adaptivni imunski sistem (Inal in sod., 2013). TMV, ki nosijo FasL (ligand

receptorja Fas ali CD95), sprožijo apoptozo aktiviranih T-celic ubijalk, ki ubijajo tumorske celice (Andreola in sod., 2002; Huber in sod., 2005). Tumorji, ki niso občutljivi na kemoterapevtike, izločajo TMV z večjo koncentracijo doksorubicina (Shedden in sod., 2003) in cisplatina (Saefi in sod., 2005) za razliko od celic, občutljivih na kemoterapevtike. S tem mehanizmom se najverjetneje izognejo apoptozi, inducirani s kemoterapevtiki. MV iz kultur celic karcinoma dojke in drugih vrst tumorjev lahko prenašajo rezistenco na zdravila (Lv in sod., 2014; Choi in sod., 2014)

2.3.7 Mikrovezkli, nastali iz tumorjev in tromboembolizem

Zwicker in sod. (2009) so ugotovili, da je večina tkivnega dejavnika (TF) v MV tumorskega izvora, kar močno poveča tveganje za nastanek tromboembolij pri onkoloških bolnikih (Zwicker in sod., 2009).

2.3.8 Mikrovezikli v izolatih krvi kot biomarkerji in napovedni dejavnik poteka bolezni

Za diagnozo in spremljanje onkoloških pacientov so še vedno potrebni invazivni posegi, kot so tankoigelnna punkcija, biopti in kirurški posegi. Ker TMV vsebujejo molekule materinske celice, torej svoje izvirne celice, in ker se nahajajo praktično v vseh telesnih tekočinah, so zanimivi kot potencialni biomarkerji bolezni. Pri pacientih s karcinomom prostate so s protosko analizo v eksosomu iz urina dokazali prisotnost mRNK, ki kodira gena *PCA3* in *TMPRSS*, pomembna za nastanek karcinoma prostate (Miranda in sod., 2010). Prav tako so iz MV iz izolatov periferne krvi bolnice s karcinomom dojke dokazali izoliran HER-2 onkoprotein (Koga in sod., 2005).

Koncentracija TMV korelira z invazivnostjo tumorja (Ginestra in sod., 1999), hkrati pa s spremljanjem koncentracije MV v izolatih telesnih tekočin onkoloških bolnikov, predvsem iz plazme, spremljamo učinke zdravljenja, saj so povečane koncentracije MV v krvi teh bolnikov povezane z večjim zasevanjem in slabšo prognozo (Kim in sod., 2003). Klinične študije na populaciji ljudi so pokazale razliko v koncentraciji MV v izolatih krvi med bolniki s tumorji na prebavilih in zdravimi osebami (Kim in sod., 2003; Janša in sod., 2008) ter znižano koncentracijo MV pri pacientih, kjer je bil tumor v remisiji (Ogorevc in sod., 2013). TMV kot

biomarkerji iz tkiv in telesnih tekočin obetajo nove razsežnosti odkrivanja tumorjev, zasevkov in spremljanje bolezni med in po terapiji (Fonseca in sod., 2016).

2.4 MODELNI SISTEMI

2.4.1 Krvne celice

2.4.1.1 Eritrociti

Eritrociti so najštevilčnejše celice krvnega obtoka in so odgovorne za prenos kisika do organov in tkiv. So brez jedra in v fizioloških pogojih bikonkavne oblike. Nastajajo iz pluripotentnih matičnih celic v kostnem mozgu. Zanje je značilno, da se hitro odzovejo na spremenjene membranske lastnosti, zato predstavljajo široko uporabljen modelni sistem.

Vpliv snovi na eritrocitne membrane se odrazi v spremembi celične oblike in njihove aglutinacije, kar opazujemo s svetlobno ali elektronsko mikroskopijo (Šimundić in sod., 2013; Drašler in sod., 2014), in v končni fazi lahko privede celo do lize celic (Aisaka in sod., 2008).

2.4.1.2 Trombociti

Trombociti ali krvne ploščice so brezjdrne celice krvnega obtoka. Nastajajo v kostnem mozgu iz megakariocitov. Igrajo pomembno vlogo pri vzpostavljanju in ohranjanju telesne homeostaze, saj predstavljajo celično komponento krvnega koagulacijskega sistema. So glavni akterji pri razvoju kardiovaskularnih bolezni, kar nas vzpodbuja v iskanju vzrokov za nastanek aktivacije in agregacije trombocitov in tudi njihove inhibicije. Med vzroki, ki privedejo do aktivacije in agregacije trombocitov, so lahko tudi ND, ki pridejo v neposreden kontakt s trombociti (Deb in sod., 2011).

2.4.2 Orjaški fosfolipidni mehurčki

Zelo primeren sistem za študije učinkov različnih substanc, tudi ND, na celične membrane so umetne fosfolipidne membrane, saj je fosfolipidni dvosloj glavna komponenta bioloških membran. Fosfolipidne mehurčke lahko pripravimo s formacijo v vodni raztopini, sestavo

membrane in okoljske raztopine pa do neke mere lahko kontroliramo (Drobne in Kralj - Iglič, 2009). Večina eksperimentalnih dokazov o delovanju fosfolipidnih membran temelji na študijah, izvedenih na orjaških fosfolipidnih mehurčkih (OFM) (Döbereiner, 2000; Dimova in sod., 2006), saj so ti dovolj veliki za opazovanje pod svetlobnim mikroskopom (večji od 1 μm ; večinski premer med 10 in 50 μm) (Angelova in Dimitrov, 1986; Bivas in sod., 1997; Bagatolli in sod., 2000; Ambrožič in sod., 2006; Peterlin in Arrigler, 2008; Pavlič in sod., 2010; Peterlin in sod., 2012). Faznokontrastna svetlobna mikroskopija, ki je ena izmed najbolj uporabnih tehnik za opazovanje OFM, deluje na osnovi različne optične gostote vzorca, kjer je optično gostejša notranjost vezikla v primerjavi z okolno raztopino. Žarek svetlobe se lomi na robu OFM in tako omogoča opazovanje faznih sprememb v vzorcih. Ugotovili so (Canham, 1970; Svetina in Žekš, 1989; Ziherl in Svetina, 2005), da mehurčki lahko zavzamejo različne oblike. Majhne asimetrične spremembe v lipidnem dvosloju lahko povzročijo močno spontano ukrivljanje membrane, kar vpliva na preoblikovanje veziklov, ki se lahko preoblikujejo v različno oblikovane vezikle, lahko pa tudi v vezikle z brstmi (Lipowsky, 1991; Lipowsky in Döbereiner, 1998; Yu in Granick, 2009) ali pa celo povzročijo njihovo razbitje (Zupanc in sod., 2012; Drašler in sod., 2014). Kralj-Iglič in sod. (2001) poročajo, da pride do transformacije veziklov zaradi razlike med osmotskim pritiskom med zunanostjo in notranostjo vezikla (Kralj-Iglič in sod., 2001) ali zaradi stika snovi kot NM na fosfolipide (Yu in Granick, 2009). Z OFM kot modelnimi sistemi bioloških membran lahko tako proučujemo vpliv substanc (npr. ND) na spremenjeno gibanje (fluktuacijo) (Baumgart in sod., 2007; Wang in sod., 2008), permeabilnost (Peterlin in sod., 2009; Peterlin in sod. 2012), elastičnost (Bivas in sod., 1987; Bivas, 2010) in delovanje makromolekul (Ambrožič in sod., 2006; Pavlič in sod., 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NANODELCI TITANIJEVEGA IN CINKOVEGA DIOKSIDA

3.1.1 Priprava suspenzij titanijevega dioksida in cinkovega oksida za poskuse z orjaškimi fosfolipidnimi mehurčki in krvnimi celicami

Uporabili smo komercialno dostopne ND TiO₂ anatazne kristalne strukture in ZnO v obliki nanoprahu (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija).

Za poskuse z OFM smo pripravili suspenziji ND TiO₂ in ZnO v 0,3 M raztopini glukoze (enaki raztopini, kot obdaja pripravljene OFM v saharozni raztopini), s koncentracijo 1 mg TiO₂ ali ZnO/ml, za testiranje vpliva na krvne celice pa v fosfatno-citratnem pufru z NaCl (angl. phosphate buffer saline, PBS) (PBS-citratni pufer; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,8 mM NaH₂PO₄•2H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4), s koncentracijo 5mg TiO₂ ali ZnO/ml.

3.1.2 Karakterizacija suspenzij titanijevega dioksida in cinkovega oksida

Karakterizacijo suspenzij ND smo izvedli v sodelovanju z Odsekom za sintezo materialov (IJS, prof. dr. Darko Makovec), in sicer s transmisijsko elektronsko mikroskopijo (TEM), z metodo dinamičnega sipanja svetlobe (angl. dynamic light scattering, DLS) ter z merjenjem potenciala zeta (ζ-potenciala). Primarno velikost in obliko ND smo določili z uporabo TEM (JEOL 2100, Tokio, Japonska; pri 200 kV). Preparate smo pripravili s sušenjem vodnih suspenzij ND TiO₂ in ZnO na bakreni perforirani mrežici, prekrite z ogljikovo folijo, pri sobni temperaturi. Suspenzije ND, pripravljene v PBS-citratnem pufru, smo slikali tudi z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (LEO Gemini 1530 (LEO, Oberkochen, Nemčija). Hidrodinamični premer ND v suspenzijah v 0,3 M raztopini glukoze (10 µg/ml) smo ovrednotili z inštrumentom DLS Fritsch Analysette 12 DynaSizer (Idar-Oberstein, Nemčija). Zaradi zelo hitre sedimentacije obeh suspenzij v PBS-citratnem pufru meritve DSL ni bilo mogoče izvesti. Meritve ζ-potenciala suspenzij TiO₂ in ZnO v 0,3 M glukozi in PBS-citratnem pufru smo izvedli z uporabo ZetaPals instrumenta (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, New York, ZDA).

3.2 PRIPRAVA ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV

OFM smo pripravili po modificirani metodi elektroformacije (Angelova, 1986) iz mešanice sintetičnih lipidov 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3 fosfatidilholina (POPC) (Avanti Polaris Lipids, Alabaster, Alabama, ZDA), raztopljeni v mešanici kloroforma in metanola (razmerje 2 : 1) v koncentraciji 1 mg/ml pri sobni temperaturi. Za povečano obstojnost smo dodali holesterol v razmerju 1 : 5. Mešanico POPC in holesterola (v volumskem razmerju 4 : 1, v/v) (0,02 ml) smo nanесли na dve platinasti elektrodi in ju dali v šibek vakuum za 2 uri, da je topilo lahko izhlapelo. V elektroformacijsko kamrico, ki je vsebovala 0,3 M saharozne raztopine, smo za 2 uri priključili obe elektrodi v razmiku 4 mm na izmenično električno polje s frekvenco 10 Hz in amplitudo 5 V/mm. Frekvenco in amplitudo električne napetosti smo nato postopoma zmanjševali v 15-min intervalih, najprej na frekvenco 5 Hz in amplitudo napetosti 2,5 V, nato frekvenco 2,5 Hz in amplitudo napetosti 2,5 V, nazadnje frekvenco 1 Hz in amplitudo napetosti 1 V. 600 µL suspenzije s formiranimi OFM smo odlili k 1 ml 0,3 M raztopine glukoze v volumskem razmerju 3 : 5 (saharozna /glukozna raztopina; v/v) in jo zaprli s parafinskim trakom z namenom zaščite pred vdorom zraka in mikroorganizmov. OFM smo pustili stati 24 ur v nizkem vakuumu pri 23 °C.

3.3 PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV SUSPENZIJE ORJAŠKIH FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV IN NANODELCEV TITANIJEVEGA DIOKSIDA IN CINKOVEGA OKSIDA TER ZAJEM IN ANALIZA MIKROSKOPSKIH VIDEOPOSNETKOV

Suspenzije OFM (0,07 ml) (saharozna /glukozna raztopina; v/v) smo vnesli v eksperimentalne kamrice (CoverWell™ Perfusion chambers PC4L-0,5; Grace Bio-Labs, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija). Razredčeni suspenziji OFM (z 0,3 M glukozno raztopino) smo dodali ND v volumskem razmerju suspenzija OFM : testni medij = 9 : 1; v/v, s končnimi koncentracijami TiO₂ ali ZnO 0,01mg /ml. Kontrolnim skupinam smo dodali enak volumen 0,3 M raztopine glukoze. V posamezni kamrici smo obravnavali eno populacijo OFM, ki je bila predhodno izpostavljena ND (20 in 50 min), zajetih v dveh enodimenzionalnih videoposnetkih na dveh ločenih pasovih, posnetih pri 400-kratni povečavi. Videoposnetke populacij OFM smo izvedli z uporabo svetlobnega fazkontrastnega mikroskopa Nikon Eclipse TE2000-S (Nikon, Tokio,

Japonska) in videokamere CCD XC -77 CE (Sony, Tokio, Japonska), priključene na mikroskop. Vzorce smo proučevali tako, da smo ustvarili mozaik z algoritmom iz našega video mikroskopskega posnetka. Vsak mozaik je vseboval vse potrebne OFM. Iz teh smo z uporabo avtomatske segmentacije in ročnega pregleda mozaikov slik izrazili kvantitativne podatke o številu OFM kontrolne skupine in po dodatku testiranih ND TiO₂ in ZnO (Zupanc in sod., 2010; Zupanc in sod., 2011; Zupanc in sod., 2014).

3.4 POSKUSI Z ANORGANSKIMI NANODELCI IN KRVNIMI CELICAMI

Krvne vzorce smo odvzeli s punkcijo ene od perifernih ven (*vene cephalice antebrachii*) v epruveto z antikoagulantom (0,109 M antikoagulant trinatrijevega citrata, Vacutube, Laboratorijska tehnika Burnik d.o.o., Vodice, Slovenija). Citrirano kri (2,7 ml z 0,109M antikoagulant trinatrijevega citrata) smo centrifugirali (centrifuga Centric 200/R, Tehnica Železniki, Podjetje precizne mehanike in elektronike, Železniki, Slovenija) 15 min s pospeškom 50 g pri 37 °C, da smo ločili s trombociti bogato plazmo od eritrocitov. Eritrocite smo sprali (3 krat) s PBS-citratom tako, da smo centrifugirali 10 min s pospeškom 1550 g pri 37 °C. Sprane eritrocite in s trombociti bogato plazmo smo razdelili v dva odmerka (50 µl eritrocitov in 200 µl s trombociti bogato plazmo). Suspenziji ND TiO₂ in ZnO v PBS-citratnem pufru (5 mg/ml) smo inkubirali s pasjimi spranimi eritrociti (v razmerju 2 : 1) in s trombociti bogato plazmo (v razmerju 3 : 1). Za kontrolo smo PBS-citratno raztopino brez ND dodali k pasjim spranim eritrocitom (v razmerju 2 : 1) in s trombociti bogati plazmi (v razmerju 3 : 1) ter opazovali morebitne spremembe v vzorcu po 1-urni inkubaciji pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce fiksirali v 0,1 % glutaralhidu, ponovno 1 uro inkubirali pri sobni temperaturi in jih nato centrifugirali 10 min s pospeškom 1550 g pri 37 °C. Supernatant smo zamenjali s PBS-citratnim pufrom, vzorec vorteksirali, centrifugirali s pospeškom 1550 g pri 37 °C še za 10 minut in fiksirali 1 uro z 2 % glutaralhidom.

Izolate vzorcev smo opazovali z različnimi mikroskopskimi tehnikami, tj. s faznokontrastnim mikroskopom in z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM).

3.4.1 Mikroskopiranje

a. Faznokontrastna mikroskopija

5 µl raztopine eritrocitov smo nanесли med dve krovni stekelci, ki smo ju zalepili z lakom za nohte. Vzorec smo opazovali pod mikroskopom s faznokontrastno optiko Olympus GWB BH-2 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) pri 400-kratni povečavi. Slike smo posneli z digitalno kamero Canon EOS 450D (Canon, Tokio, Japonska).

b. Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)

Fiksirane vzorce smo sprali s PBS-citratno raztopino in inkubirali za 20 min pri sobni temperaturi. Postopek smo ponovili 4-krat, zadnja inkubacija je trajala čez noč pri 8 °C. Vzorce smo nato fiksirali še za 60 min pri 22 °C v 1 % OsO₄ raztopini 0,9 % NaCl, dehidrirali v naraščajoči vrsti acetona (50 %–100 %, v/v). Vzorce smo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom LEO Gemini 1530 (LEO, Oberkochen, Nemčija).

3.5 ŽIVALI

V študiji vpliva ND na krvne celice smo uporabili kri treh zdravih psov mešane pasme, starosti treh, štirih in šestih let.

V študijo koncentracije MV v krvi psov z MCT smo vključili trinajst psov z MCT, pri čemer je bila diagnoza MCT pri devetih psih postavljena s patohistološko preiskavo in pri štirih psih s citološko preiskavo, ter osem zdravih psov, ki smo jih vključili v kontrolno skupino. Podatke o živalih predstavljamo v Tabeli 1. Lastniki psov so podpisali svoj pristanek za odvzem vzorcev in uporabo podatkov v raziskovalne namene.

Tabela 1: Podatki o pacientih vključenih v raziskavo MCT in MV.

Table 1: Data on patients included in the study of MCTs and MVs.

| Zaporedna številka | Starost (let) | Spol | Pasma | Lokacija MCT | Premer tumorja (cm) | Klinični izgled | Klinični stadij | PH | IHC |
|--------------------|---------------|------|-------|--------------------|---------------------|-------------------------|-----------------|----|-----|
| 1 | 5 | m | NB | trebuh | 2 | alopecija, pigmentacija | 1 | da | da |
| 2 | 6 | ž | VPP | noga sp. l. | 3 | alopecija | 1 | da | da |
| 3 | 3 | ž | SP | noga z. d. | np | alopecija | 1 | da | da |
| 4 | 9 | m | NT | komolec | 5 | alopecija, ulceracija | 1 | da | da |
| 5 | 6 | m | JRT | vrat | 1 | pod kožo | 1 | da | da |
| 6 | 12 | m | PRT | aksilarno področje | 0,5 | pod kožo | 1 | da | da |
| 7 | 12 | ž | LAB | noga sp. l. | 2 | alopecija, ulceracija | 1 | da | da |
| 8 | 5 | m | NB | rama | 3 | ulceracija | 2 | da | da |
| 9 | 8 | ž | M | plečka | 15 | obsežna nekroza | 2 | da | da |
| 10 | 3 | ž | NB | vulva | 1 | ulceracija | np | ne | ne |
| 11 | 12 | m | M | koleno | np | np | 1 | ne | ne |
| 12 | 10 | ž | ZP | prst | post op | np | 2 | da | ne |
| 13 | 8 | m | BPP | nosnica | 3 | depigmentacija | np | ne | ne |
| 14 | 9 | m | M | kontrola | | | | | |
| 15 | 1 | m | GR | kontrola | | | | | |
| 16 | 2 | ž | EB | kontrola | | | | | |
| 17 | 0,7 | ž | M | kontrola | | | | | |
| 18 | 3 | m | V | kontrola | | | | | |
| 19 | 4 | ž | M | kontrola | | | | | |
| 20 | 8 | m | M | kontrola | | | | | |
| 21 | 4 | m | BC | kontrola | | | | | |

Legenda: PH: patohistologija; IHC: imunohistokemija; pasma: NB = nemški bokser, VPP = veliki planšarski pes, SP = shar-pej, NT = nemški terier, JRT = jack russel terier, PRT = parson russel terier, LAB = labradorec, M = mešanec, ZP = zlati prinašalec, BPP = bernski planšarski pes, G = greyster, EB = epagneul breton, V = vižla, BC = border collie; np = ni podatka; noga z. d. = zadnja desna noga; noga sp. l. = sprednja leva noga; klinični stadij: 1 = solitarni tumor brez zasevkov, 2 = solitarni tumor z zasevki v regionalni bezgavki

Legend: PH: pathohistology; IHC: immunohistochemistry; breed: NB = Boxer, VPP = Great Swiss Mountain Dog, SP = Shar Pei, NT = German Hunting Terrier, JRT = Jack Russell Terrier, PRT = Parson Russell Terrier, LAB = Labrador Retriever, M = mixed breed, ZP = Golden Retriever, BPP = Bernese Mountain Dog, G = Greyster, EB = Epagneul Breton, V = Vizsla, BC = Border Collie; np = no data; noga z. d. = right hind leg; noga sp. l. = left front leg; clinical stage: 1 = nonmetastatic solitary tumour, 2 = solitary tumour with metastases in the regional lymph node

3.6 PRIPRAVA VZORCEV MASTOCITOMOV ZA PATOHISTOLOŠKO IN IMUNOHISTOKEMIČNO PREISKAVO

3.6.1 Obdelava vzorcev za citološko diagnostiko

Pri živalih s tumorjem smo s TIAB odvzeli vzorce, jih na zraku posušili in obarvali s toluidinskim barvilom, po protokolu, ki ga uporabljajo na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete v Ljubljani.

3.6.2 Obdelava vzorcev tumorjev za patohistološko in imunohistokemično preiskavo

Pri živalih s citološko diagnosticiranim MCT smo z ekscizijsko ali incizijsko biopsijo odvzeli tkivne vzorce tumorskega tkiva in jih fiksirali v 10 % puferiranem formalinu. Poseg smo opravili v splošni anesteziji. Patohistološko in imunohistokemično preiskavo smo opravili na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Vzorce tumorjev za patohistološko in imunohistokemično preiskavo smo fiksirali v 10 % puferiranem formalinu in jih nato rutinsko impregnirali s parafinom s pomočjo aparature Hypercenter XP (Shandon, Watertown, ZDA).

3.6.3 Barvanje s hematoksilinom in eozinom ter toluidinskim modrilom

Iz parafinskih blokov smo z drsnim mikrotomom (Leica, Nussloch, Nemčija) narezali tkivne rezine debeline 4 μm . Tkivne rezine smo v aparaturi Varistain (Shandon, Cheshire, Velika Britanija) deparafinizirali v ksilolu in padajoči vrsti alkoholov. Nato smo eno rezino v aparaturi Varistain (Shandon, Cheshire, Velika Britanija) obarvali s hematoksilinom in eozinom (HE), drugo rezino pa ročno s toluidinskim modrilom (pH 4,2). Po končanem barvanju smo rezine dehidrirali v naraščajoči vrsti alkoholov in postopek barvanja zaključili z bistrenjem v ksilolu. Pobarvane tkivne rezine smo pokrili s sintetično smolo in pokrovnim stekelcem. Barvanje smo izvedli po protokolu, ki ga uporabljajo na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete v Ljubljani.

3.6.4 Imunohistokemično označevanje

Imunohistokemična označevanja smo izpeljali na parafinskih tkivnih rezinah debeline 4 μm , ki smo jih prenesli na objektna stekelca prevlečena s 3-aminopropiltrioksolanom (APTES) in jih nato sušili v termostatu pri temperaturi 45 °C čez noč. Tkivne rezine smo pred imunohistokemičnim označevanjem CD117 in Ki-76 antigena, deparafinizirali v aparaturi Varistain (Shanon, Cheshire, Velika Britanija).

3.6.4.1 Postopek imunohistokemičnega označevanja

Imunohistokemično označevanje smo izvedli ročno, z vizualizacijskim kitom Dako REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007) po naslednjem postopku:

1. Deparafinizacija tkivnih rezin do vode.
2. Demaskiranje antigena z mikrovalovi:
 - V 0,01 M citratnem pufru s pH 6,0, 20 minut za tkivne rezine, ki smo jih nato označevali s protitelesom proti CD117, in
 - V 0,1 M pufru etilendiaminotetraoetne kisline (angl. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) s pH 9,0, 15 minut za tkivne rezine, ki smo jih nato označevali s protitelesom proti Ki-67 antigenu.
3. Hlajenje rezin do sobne temperature.
4. Kratko spiranje v izpiralnem pufru tris-pufer z dodatkom Tweena (angl. tris-buffered-saline-Tween, TBST) s pH 7,5, 5 minut.
5. Inhibicija endogene peroksidaze s Peroxidase-Blocking Solution Dako REAL (DAKO), 30 minut.
6. Prenos za 5 minut v izpiralni pufer.
7. Inkubacija s primarnim protitelesom v vlažni komori pri sobni temperaturi za 1 uro.
Uporabili smo primarni protitelesi:
 - kunčje poliklonsko protitelo proti človeškemu CD117 (kataloška oznaka A450229), v redčitvi 1 : 300 in
 - monoklonsko protitelo proti človeškemu Ki-67 antigenu, klon MIB-1 (kataloška oznaka M724029), v redčitvi 1 : 75.

8. Kratko spiranje v TBST, 5 minut.
9. Inkubacija v sekundarnih protitelesih, konjugiranih s polimerom, označenim s hrenovo peroksidazo, iz vizualizacijskega kita DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007) (steklenička A), v vlažni komori na sobni temperaturi, 30 minut.
10. Kratko spiranje v TBST, 5 minut.
11. Inkubacija v delovni raztopini barvnega substrata s 3-diaminobenzidinom (DAB). Raztopino barvnega substrata smo pripravili pred uporabo tako, da smo v pufer iz kita (Substrate Buffer - steklenička B) dodali kromogen iz kita (DAB + Chromogen - steklenička C), v razmerju 1 ml pufera in 20 µl kromogena. Tkivne rezine smo inkubirali na sobni temperaturi, 7 minut.
12. Spiranje z destilirano vodo in kontrastiranje z Meyerjevim hematoksilinom, 1 minuta.
13. Spiranje v TBST, 1 minuta.
14. Spiranje v tekoči vodi, 20 minut, dehidracija v naraščajoči vrsti alkoholov, bistrenje v ksilolu in pokrivanje s sintetično smolo.

Pozitivna reakcija je pri imunohistokemičnem označevanju, kjer uporabimo DAB kot barvni substrat, vidna kot rjav reakcijski produkt. Jedra celic se po kontrastiranju s hematoksilinom obarvajo nežno vijolično.

3.6.4.2 Kontrole pri imunohistokemičnem označevanju

Pri vsakem od imunohistokemičnih označevanj smo uporabili kontrole. Za pozitivno kontrolo pri imunohistokemičnem označevanju CD117 smo uporabili parafinske tkivne rezine MCT psa, kot pozitivno kontrolo Ki-67 antigena pa bezgavko psa.

Kot negativno kontrolo smo uporabili tkivne rezine, pri katerih smo v imunohistokemičnem postopku primarno protiteleso nadomestili z razredčilom za protitelesa (razredčilo za protitelesa DAKO Cytomation Antibody Diluent).

Ponovljivost imunohistokemične reakcije smo kontrolirali tako, da smo v vsako serijo barvanja vzorcev vključili tkivno rezino vzorca, ki je bil označen v prejšnjih serijah. Ponovljivost reakcije smo ocenili subjektivno.

3.7 KRITERIJI ZA OCENJEVANJE STOPNJE MALIGNOSTI MASTOCITOMOV, OCENO VZORCA KIT-BARVANJA IN DOLOČANJE PROLIFERACIJSKEGA INDEKSA Ki-67

3.7.1 Ocenjevanje citološkega vzorca

Vzorci, odvzeti iz MCT s TIAB, smo obarvali s toluidinskim barvilom in jih ocenili:

a. dobro diferencirani:

- so zgrajeni iz homogene populacije celic s številnim metakromatičnimi zrcni,

b. slabše diferencirani:

- v citoplazmi je manj metakromatičnih zrc in več izraženih malignih lastnosti celic.

3.7.2 Ocenjevanje histološke stopnje malignosti mastocitomov

S patohistološko preiskavo vzorcev mastocitomov smo ocenili stopnjo malignosti (histološki gradus).

Stopnjo malignosti smo ocenili po Patnaiku (Patnaik in sod., 1984) in po Kiupelu (Kiupel in sod., 2011):

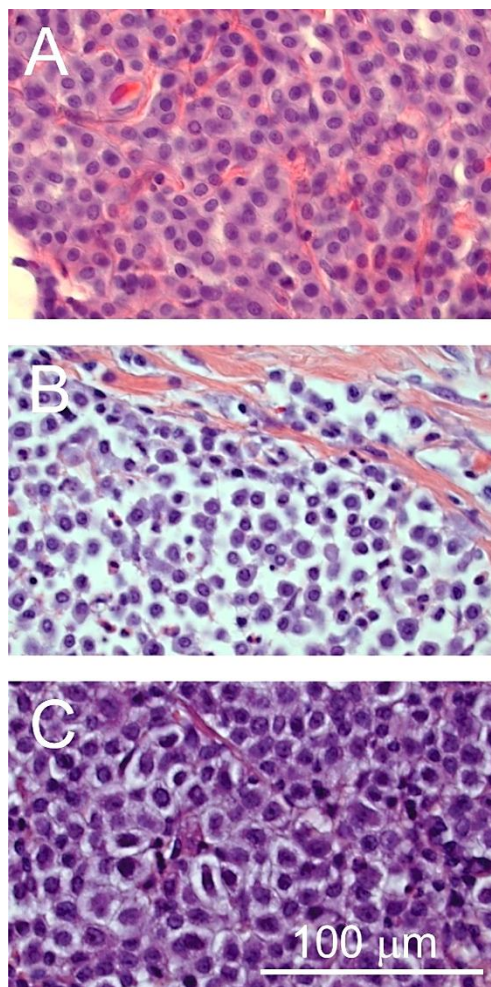
1. po Patnaiku:

a. dobro diferencirani MCT (histološka stopnja malignosti I, Slika 1 A)

- so zgrajeni iz monomorfnih okroglih celic z močno granulirano citoplazmo,
- imajo zrnca v citoplazmi, ki so srednje velika, in
- so brez mitoz.

b. zmerno diferencirani MCT (histološka stopnja malignosti II, Slika 1 B):

- so zmerno do gostocelični,
- so zgrajeni iz pleomorfnih celic okrogle do ovalne oblike,
- imajo celice z različno stopnjo granuliranosti citoplazme, v nekaterih celicah so zrnca velika in hiperkromatična, v drugih pa bolj drobna
- imajo področja z edemi, nekrozami ali hialiniziranim kolagenom,
- imajo na vidno polje velike povečave (angl. high power field, HPF) do dve mitoz,
- v katerih novotvorbne celice infiltrirajo globoko v dermis in/ali podkožje.



Slika 1: MCT histološke stopnje malignosti I, II in III. A: MCT histološke stopnje malignosti I. Dobro diferencirane, monomorfne okrogle tumorske celice z veliko granulirane citoplazme in okroglimi jedri z zgoščenim kromatinom, v katerih jedra niso vidna. Mitoz ni; B: MCT histološke stopnje malignosti II. Zmerno diferencirane tumorske celice, ki so zmerno pleomorfne - okrogle do ovalne oblike, zmerno anizocitotične in imajo različno količino citoplazme, ki je različno močno granulirana. Jedra tumorskih celic so zmerno pleomorfna - okrogla do ovalna in zmerno anizokariotična ter imajo po eno jedrce; C: MCT histološke stopnje malignosti III. Slabo diferencirane tumorske celice, ki so močno pleomorfne - okrogle do ovalne oblike, močno anizocitotične, z različno količino slabo granulirane citoplazme. Jedra tumorskih celic so močno pleomorfna - okrogla, ovalna in z zažemki, močno anizokariotična ter imajo izrazito jedrce. HE. Merilo za A, B in C = 100 μm .

Figure 1: Grade I, II and III MCT. A: Grade I MCT. Well-differentiated, monomorphic and round tumour cells with ample granulated cytoplasm and round nuclei with condensed chromatin, in which nucleoli are not seen. Mitoses are absent; B: Grade II MCT. Moderately-differentiated and moderately pleomorphic - round to ovoid tumour cells, which are moderately anisocytotic and have different amounts of cytoplasm with various degrees of granulation. The nuclei of tumour cells are moderately pleomorphic - round to ovoid, moderately anisokaryotic and have a single nucleolus; C: Grade III MCT. Poorly-differentiated, highly pleomorphic - round to ovoid tumour cells, which are highly anisocytotic and have different amounts of poorly-granulated cytoplasm. The tumour cells have highly anisokaryotic, highly pleomorphic - round, ovoid and indented nuclei with a prominent nucleolus. HE. Bar in A, B and C = 100 μm .

c. diferencirani MCT (histološka stopnja malignosti III, Slika 1 C):

- so gostocelični,
- so zgrajeni iz močno pleomorfnih celic z zažetimi ali okroglimi mehurjastimi jedri z enim ali več izrazitimi jedrci,
- imajo slabo granulirano citoplazmo, v kateri so drobna zrnca ali zrnca niso vidna,
- na eno vidno polje velike povečave je 3–6 mitoz,
- imajo pogosto področja z edemi, krvavitvami, nekrozami in hialiniziranim kolagenom ali so ulcerirani,
- v katerih novotvorbne celice infiltrirajo globoki dermis in/ali podkožje.

2. po Kiupelu:

a. MCT visoke stopnje malignosti so tisti, v katerih ugotovimo vsaj enega od naštetih kriterijev

- sedem in več mitoz v 10 vidnih poljih velike povečave,
- najmanj tri večjedrne celice (med večjedrne celice prištevamo novotvorbne celice, ki imajo več kot 3 jedra) v 10 vidnih poljih velike povečave, najmanj tri bizarna jedra (jedra, ki so močno atipična, z izrazitimi zažemki, segmentirana ali nepravilne oblike) v 10 poljih velike povečave ali
- kariomegalija, kar pomeni, da ima vsaj 10 % tumorskih celic dvakrat večji premer jeder od premera najmanjših tumorskih celic.

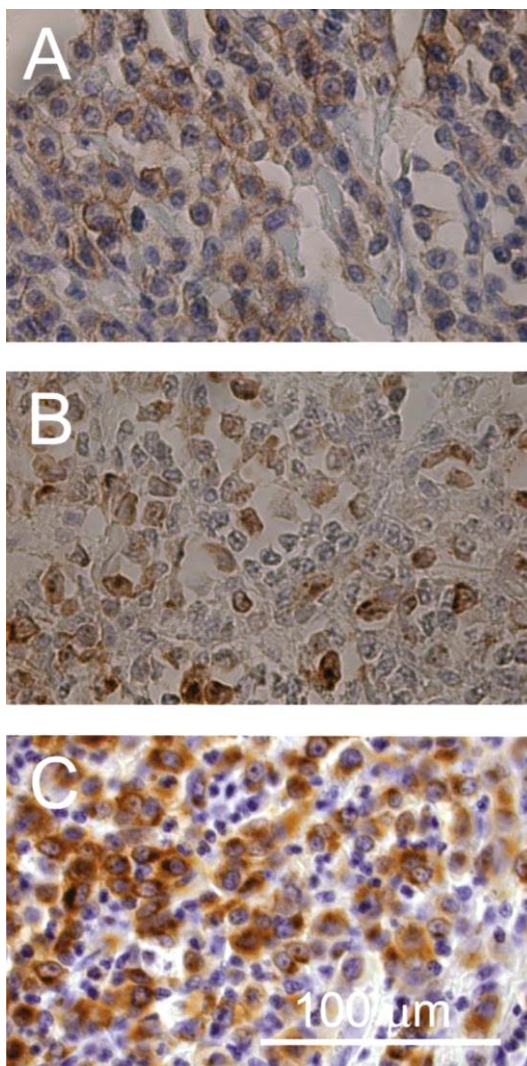
b. MCT, v katerih ne ugotovimo nobene od naštetih značilnosti, spadajo med MCT nizke stopnje malignosti.

3.7.3 Ocena vzorca KIT-barvanja

Imunohistokemično reakcijo na CD117 smo ocenili po kriterijih, ki so jih opisali Kiupel in sod. (2004), in razlikovali med tremi vzorci imunohistokemične reakcije:

- vzorec KIT-barvanja I, če smo ugotovili pozitivno reakcijo na celični membrani novotvorbni celic (Slika 2 A),

- vzorec KIT-barvanja II, če smo ugotovili fokalno ali zrnčasto pozitivno reakcijo v citoplazmi novotvorbni celic (Slika 2 B)
- in
- vzorec KIT-barvanja III, če smo ugotovili difuzno pozitivno citoplazemsko reakcijo v novotvorbni celicah (Slika 2 C) (Kiupel in sod., 2004).



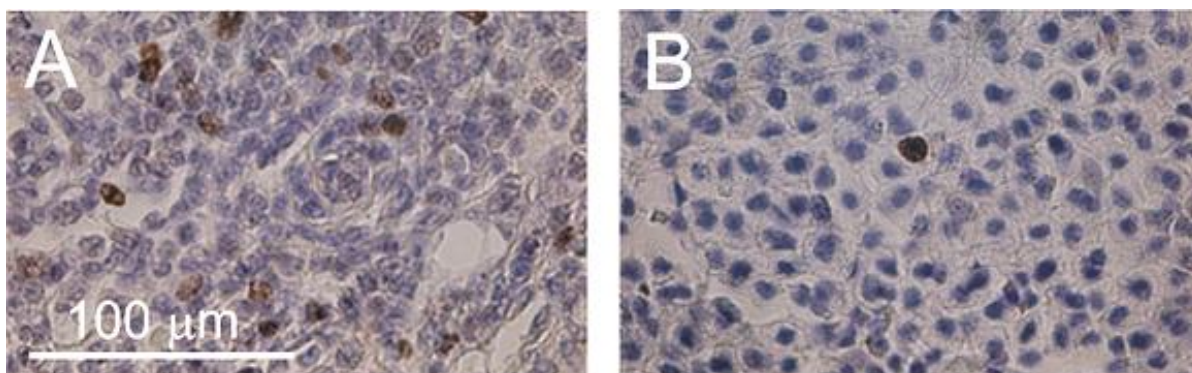
Slika 2: MCT z vzorcem KIT-barvanja. A: MCT z vzorcem KIT-barvanja I. Značilna imunohistokemična reakcija je vidna na celični membrani tumorskih celic; B: MCT z vzorcem KIT-barvanja II. V citoplazmi tumorskih celic je vidna značilna fokalna ali zrnčasta imunohistokemična reakcija; C: MCT z vzorcem KIT-barvanja III. V citoplazmi tumorskih celic je vidna značilna difuzna močna imunohistokemična reakcija. Imunohistokemično barvanje s kunčjim poliklonskim protitelesom proti človeškemu CD117 (DAKO), kontrastirano s hematoksilinom. Merilo za A, B in C = 100 µm.

Figure 2: MCT with KIT-staining pattern. A: MCT with KIT-staining pattern I, which is characterized by membrane-associated staining of tumour cells; B: MCT with KIT-staining pattern II, which is characterized by intense focal or stippled cytoplasmic staining of tumour cells; C: MCT with KIT-staining pattern III, which is characterized by diffuse and cytoplasmic staining of tumour cells. Immunohistochemical staining with rabbit polyclonal antibody against human CD117 (DAKO), counterstained with hematoxylin. Bar in A, B and C = 100 µm.

3.7.4 Določanje proliferacijskega indeksa Ki-67

Proliferacijski indeks smo določali na tkivnih rezinah, označenih s protitelesom proti antigenu Ki-67. Meritve smo opravili na mikrografijah, zajetih z digitalno kamero DS-U2 (Nikon, Tokio, Japonska) in mikroskopom Microphot FXA (Nikon, Tokio, Japonska) ter s pomočjo računalniškega programa NIS-Elements BR (Nikon, Tokio, Japonska). Meritve smo opravili na slikah, zajetih pod 400-kratno povečavo, v področjih novotvorbe, za katere smo subjektivno ocenili, da imajo največje število imunohistokemično označenih celic.

Proliferacijski indeks smo opredelili kot razmerje med številom Ki-67-pozitivnih celic na 1000 celic. Rezultate smo glede na število pozitivnih celic označili kot proliferacijski indeks Ki-67 > 10 (več kot 100 pozitivnih celic na 1000 pregledanih celic, Slika 3 A) in proliferacijski indeks Ki-67 < 10 (manj kot 100 pozitivnih celic na 1000 pregledanih celic, Slika 3 B), pri čemer smo delili število imunohistokemično pozitivnih jeder z vsemi jedri novotvorbnihih celic in pomnožili s 100.



Slika 3: MCT in proliferacijski indeks Ki-67. A: MCT s proliferacijskim indeksom Ki-67 > 10 . V jedrih številnih tumorskih celic je vidna značilna imunohistokemična reakcija; B: MCT s proliferacijskim indeksom Ki-67 < 10 . Le fokalno je v jedru tumorske celice vidna značilna imunohistokemična reakcija. Imunohistokemično barvanje z monoklonskim protitelesom proti človeškemu Ki-67 antigenu, kontrastirano s hematoksilinom. Merilo za A in B = 100 μm .

Figure 3: MCT and proliferative index Ki-67. A: MCT with proliferative index Ki-67 > 10 . An immunopositive reaction is located in the nuclei of many tumour cells; B: MCT with proliferative index Ki-67 < 10 . An immunopositive reaction is visible only focally in the nucleus of a tumour cell. Immunohistochemical staining with monoclonal antibody against human Ki-67 antigen, counterstained with hematoxylin. Bar in A and B = 100 μm .

3.8 ODVZEM VZORCEV KRVI IN LOČITEV KRVNIH CELIC OD PLAZME

Krvne vzorce smo odvzeli s punkcijo ene od perifernih ven (*vene cephalice antebrachii*, *vene saphenae* ali *vene jugularis*) v epruveto z antikoagulantom (0,109 M antikoagulanta trinatrijevega citrata). Citrirano kri (2,7 ml z 0,109M antikoagulanta trinatrijevega citrata) smo centrifugirali (centrifuga Centric 200/R, Tehnica Železniki, Podjetje precizne mehanike in elektronike, Železniki, Slovenija) 20 min s pospeškom 1550 g pri 37 °C. 250 µl supernatanta smo odpipetirali in ga prenesli v 1,8 ml mikrokrocentrifugirko (Isolab, Wertheim, Nemčija) za nadaljnjo obdelavo. Krvne vzorce (0,5 ml krvi) za hematološke preiskave smo shranili v epruvete z etilendiamintetraocetno kislino (EDTA).

3.9 PRIDOBIVANJE S TROMBOCITI SIROMAŠNE PLAZME

Citratno kri smo centrifugirali 15 min s pospeškom 800 g pri 37 °C, pri čemer smo ločili in odstranili večino eritrocitov, preostanek vzorca pa je predstavljal s trombociti siromašno plazmo.

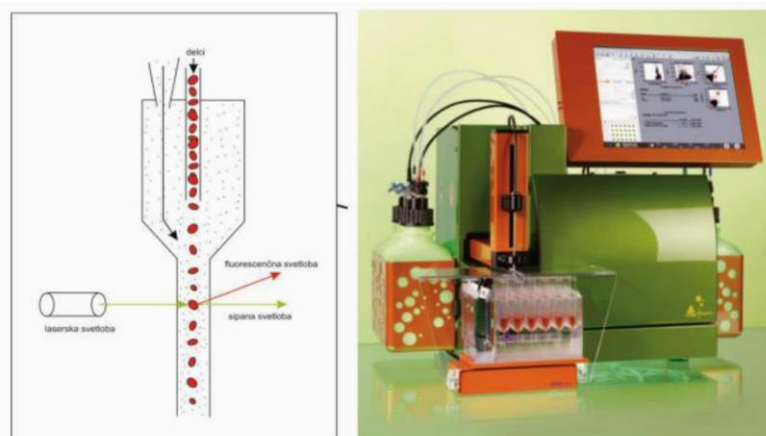
3.10 IZOLACIJA MIKROVEZIKLOV

250 µl supernatanta s trombociti siromašne plazme smo v 1,8 ml mikrocentrifugirki centrifugirali 5 min s pospeškom 17.570 g pri 37 °C. Odstranili smo 225 µl supernatanta, 25 µl peleta z MV pa razredčili z 225 µl PBS-citrata (pH 7,4), MV smo resuspendirali z vorteksiranjem s pospeškom 1200 g in vzorec centrifugirali 5 min s pospeškom 17.570 g pri 37 °C. Zgornjih 225 µl supernatanta smo odpipetirali in ga zavrgli, k 25 µl peleta pa dodali 75 µl pufra PBS-citrata (pH 7,4).

3.11 ŠTETJE MIKROVEZIKLOV S PRETOČNIM CITOMETROM

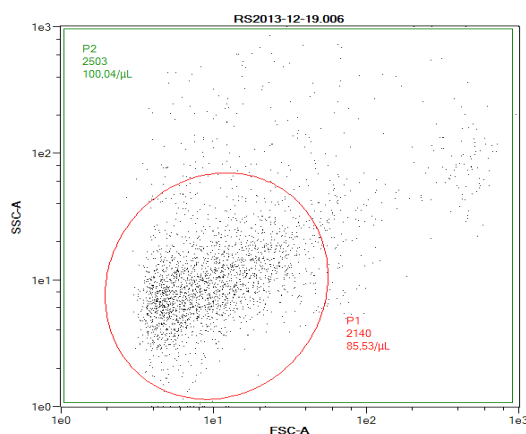
Številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi psov smo določili s pretočnim citometrom MACSQuant analizatorjem r (<http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-flowcytometry/flow-cytometers/macsquant-analyzer-10/macsquantanalyzer-10.aspx>) (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany), s 405 nm, 488 nm in 640 nm zračno hlajenimi laserji (Slika 4). Princip delovanja pretočnega citometra temelji na tem, da zazna na delcih sipano svetlobo, pri čemer je signal odvisen od lastnosti delcev. Vir svetlobe je laserski žarek, usmerjen v tok delcev, ki skozi mesto interakcije z laserskim žarkom prehajajo posamično (hidrodinamsko fokusiranje). Zaznamo lasersko svetlobo, sipano v smeri žarka (angl. forward side scatter, FSC), in v stranski smeri (angl. side side scatter SSC). Signal v smeri žarka je odvisen od velikosti delcev, signal v stranski smeri pa predvsem od površinskih lastnosti delca.

Rezultate smo analizirali z MACSQuantify™ (Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Nemčija) različico programske opreme 2.4. Za meritev smo uporabili 25 µl vzorca. MV smo na pretočnem citometru določili na razsevnem diagramu dogodkov, ki jih določa svetloba, sipanja v smeri naprej in v stranski smeri (Slika 4).



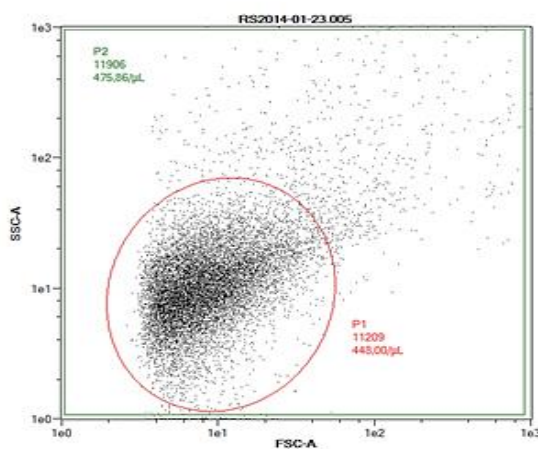
Slika 4: Citometrična metoda. Prikaz potovanja delca in sipanja svetlobe v pretočni citometriji (levo) in pretočni citometer MACSQuant analizator (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nemčija) (desno), ki se nahaja v prostorih Laboratorija za klinično biofiziko, Katedre za ortopedijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Figure 4: Cytometric method. A schematic presentation of particle movement and light scattering in flow cytometry (left) and flow cytometer MACSQuant (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) (right) at the Laboratory of Clinical Biophysics, Chair of Orthopaedics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana.



Slika 5: Točkovni diagram zdravega psa. FSC-A/SSC-A (forward side scatter/side side scatter – prednje/stransko sipanje, logaritemska skala) prikazuje MV (rdeča elipsa) in fragmente celic v izolatih, pridobljenih iz periferne krvi zdravega psa.

Figure 5: A density plot of a healthy dog. FSC-A/SSC-A (forward side scatter/side side scatter, logarithmic scale) representing MVs (red ellipse) and fragments of cells in isolates from peripheral blood of a healthy dog.



Slika 6: Točkovni diagram psa z MCT. FSC-A/SSC-A (forward side scatter/side side scatter – prednje/stransko sipanje, logaritemska skala) prikazuje MV (rdeča elipsa) in fragmente celic v izolatih, pridobljenih iz periferne krvi psa z MCT.

Figure 6 A density plot of a dog with MCT. FSC-A/SSC-A (forward side scatter/side side scatter, logarithmic scale) representing MVs (red ellipse) and fragments of cells in isolates from peripheral blood of a dog with MCT.

3.12 MERJENJE ŠTEVILSKÉ KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V PERIFERNI KRVI

Številské koncentracije trombocitov smo določali skupaj s hemogramom z diferencialno belo krvno sliko v EDTA vzorcih venozne krvi (0,5 ml krvi) z avtomatskim hematološkim analizatorjem ADVIA 120 (Siemens, Erlangen, Nemčija). Delovanje avtomatskega laserskega hematološkega analizatorja ADVIA 120 (Siemens, Erlangen, Nemčija) temelji na citokemiji in pretočni citometriji z lasersko svetlobo. Analizator omogoča določanje celotne krvne slike in retikulocitov 21 živalskih vrst.

Določanje številské koncentracije in volumna eritocitov in trombocitov poteka z enoreagentno metodo (RBC/PLT metoda), ki temelji na pretočnem citometrijskem merjenju s pomočjo razprševanja laserske svetlobe. Vzorec krvi se meša z reagentom ('RBC dil' reagent). Pri tem se eritrociti izovolumetrijsko zaokrožijo in fiksirajo z glutaraldehidom, ki je sestavni del reagenta. Reakcijska zmes gre skozi optični kanal, osnovan na laserju (helij-neonski rdeči laser), kjer poteka štetje celic, razločevanje med eritrociti in trombociti ter določanje volumna posameznih eritrocitov in trombocitov z uporabo tehnike razprševanja laserske svetlobe. Optični merjenji se izvedeta pri malem (2° – 3°) in velikem (5° – 15°) vpadnem kotu laserske svetlobe.

3.13 STATISTIČNE METODE

Za primerjavo številské koncentracije MV različnih skupin psov in posameznih pacientov pred, med in po zdravljenju smo uporabili faktor, ki predstavlja razmerje med koncentracijo MV v vzorcu, v primerjavi s kontrolo. Medsebojno smo primerjali skupine glede na histološko stopnjo malignosti po Patnaiku in Kiupelu, vzorce KIT-barvanja in proliferacijski indeks Ki-67.

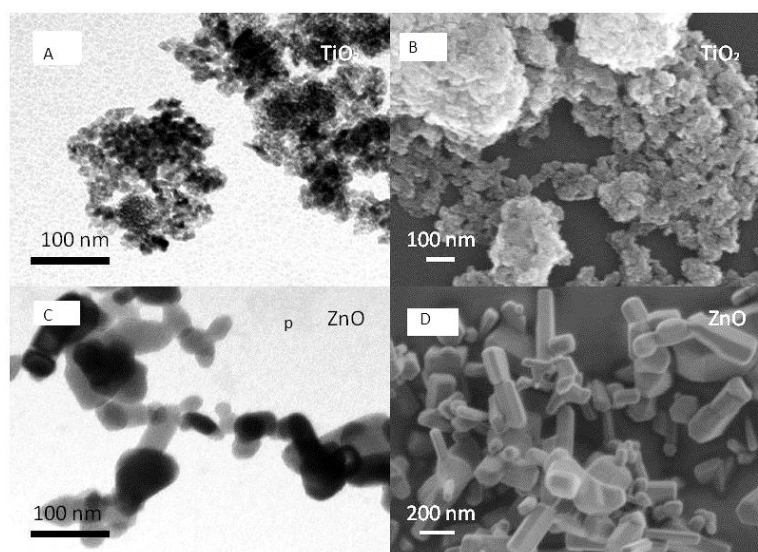
Skupine vzorcev smo predstavili s povprečnimi vrednostmi parametrov in standardnim odklikom ter jih primerjali s T-testom. Razlike, ki so jim ustrezale verjetnosti manjše, od $p = 0,05$, smo vzeli kot statistično pomembne. Primernost velikosti vzorcev smo ocenili z analizo statistične moči. Statistično moč pri vrednosti $\alpha = 0,05$ smo označili kot dovolj veliko, če je preseгла vrednost $P = 0,8$. Pri statistični analizi smo uporabili programa Excel in Statistical solutions. Microsoft Office Excel, 2007 SP3 in 1-Sample, 2-Sided Equality (HY Lown Cosulting LLC, Atlanta, GA, ZDA) 2013-2016 <http://www.powerandsamplesize.com>.

Rezultate poskusa OFM z ND smo statistično ovrednotili z uporabo programske opreme Team RC. R: A language and environment for statistical computing testa (R Foundation for Statistical Computing, Dunaj, Avstrija), 2008 ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>., pri vrednosti $\alpha = 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 LASTNOSTI IZBRANIH ANORGANSKIH NANOMATERIALOV

V suspenziji ND TiO₂ v 0,3M raztopini glukoze so se oblikovali skupki in aglomerati velikosti 600 do 4000 nm, v suspenziji ND ZnO in glukoze pa so nastali skupki velikosti 100 do 1200 nm (Slika 7).



Slika 7: Suspenzija ND TiO₂ in ZnO v glukozi (0,3M raztopini), slikana s presevnim (TEM) (A, C) in vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (B, D) (Šimundić in sod., 2013).

Figure 7: TiO₂ and ZnO NPs suspended in glucose (0.3M solution), imaged by a transmission electron microscope (TEM) (A, C) and by a scanning electron microscope (SEM) (B, D) (Šimundić et al. 2013).

Zaradi zelo hitre sedimentacije obeh suspenzij v PBS-citratnem pufru meritve DSL ni bilo mogoče izvesti.

Meritve ζ -potenciala suspenzij TiO₂ in ZnO v 0,3 M glukozi in PBS-citratnem pufru so pokazale blago negativen naboj v nevtralnem pH (Tabela 2).

Tabela 2: Lastnosti suspenzij ND TiO₂ in ZnO.

Table 2: Characteristics of TiO₂ and ZnO NPs.

| | pH | ζ-potencial |
|---------------------------------|-----|-------------|
| TiO ₂ v PBS-citratu | 7,9 | -26 |
| ZnO v PBS-citratu | 7,9 | -29 |
| TiO ₂ v 0,3M glukozi | 4,4 | -22 |
| ZnO v 0,3M glukozi | 6,6 | -15 |

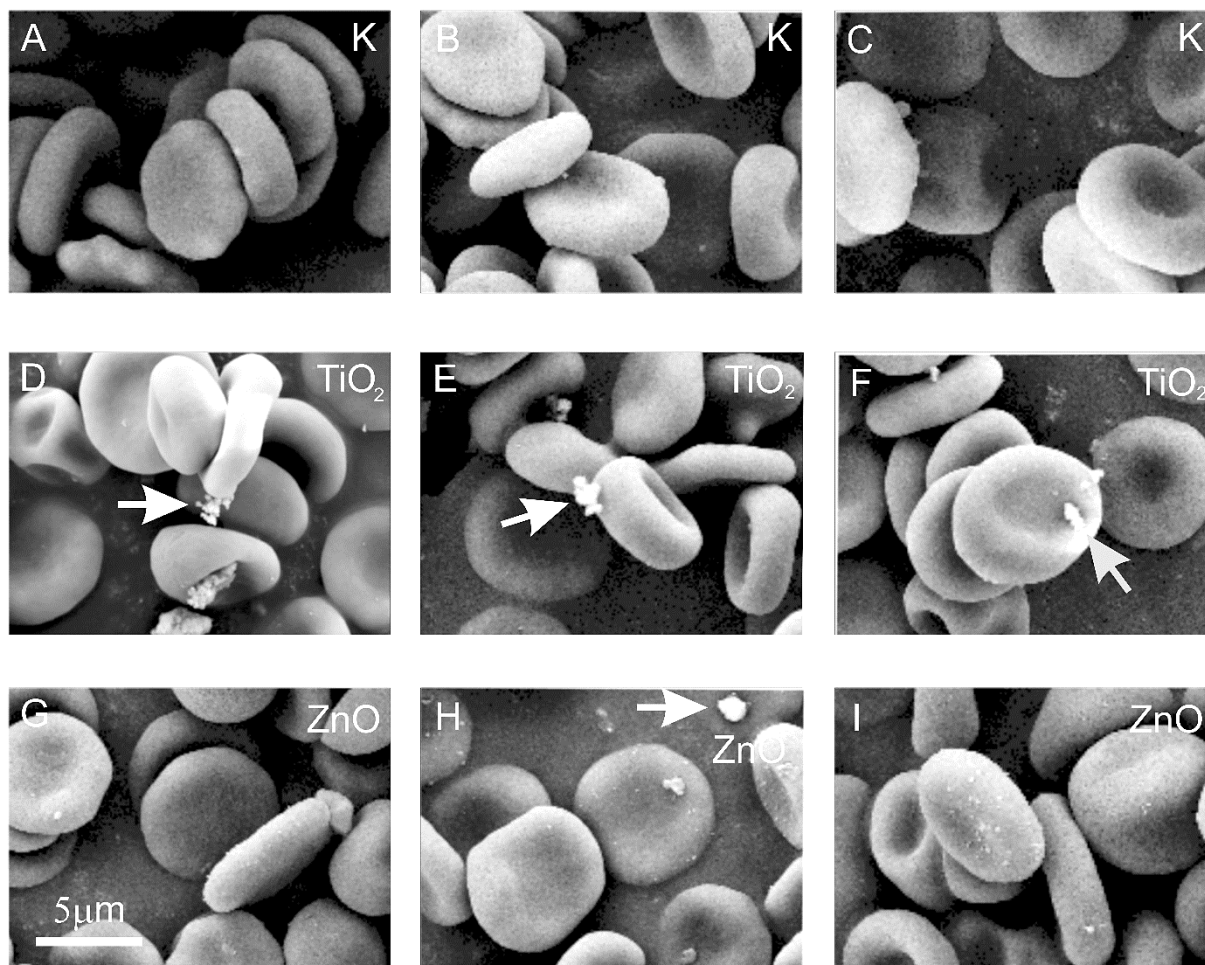
4.2 REZULTATI VPLIVA ANORGANSKIH NANODELCEV NA MORFOLOŠKE SPREMEMBE MEMBRANE KRVNIH CELIC

4.2.1 Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida na ukrivljenost membrane pasjih eritrocitov in njihove medsebojne interakcije

Inkubacija spranih pasjih eritrocitov s suspenzijo TiO₂ v PBS-citratu po 1 uri ni vplivala na ukrivljenost membrane in morfološke značilnosti eritrocitov. ND TiO₂ niso vplivali na medsebojne interakcije eritrocitov, na sprane pasje eritrocite so se le pritrdili (Slika 8 D, E, F).

4.2.2 Vpliv nanodelcev cinkovega oksida na ukrivljenost membrane pasjih eritrocitov in njihove medsebojne interakcije

Inkubacija spranih pasjih eritrocitov s suspenzijo ZnO v PBS-citratu po 1 uri ni vplivala na ukrivljenost membrane eritrocitov in morfološke značilnosti eritrocitov. ND ZnO niso vplivali na medsebojne interakcije eritrocitov, na pasje eritrocite so se le pritrdili (Slika 8 G, H, I).



Slika 8: Mikrografije izpranih eritrocitov treh psov, zajete z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM). A, B, C: kontrolna skupina eritrocitov; D, E, F: eritrociti inkubirani z ND TiO₂; G, H, I: eritrociti inkubirani z ND ZnO. Puščice kažejo na večje aglomerate ND. Merilo za A, B, C, D, E, F, G, H in I = 5 µm (Šimundić in sod, 2013).

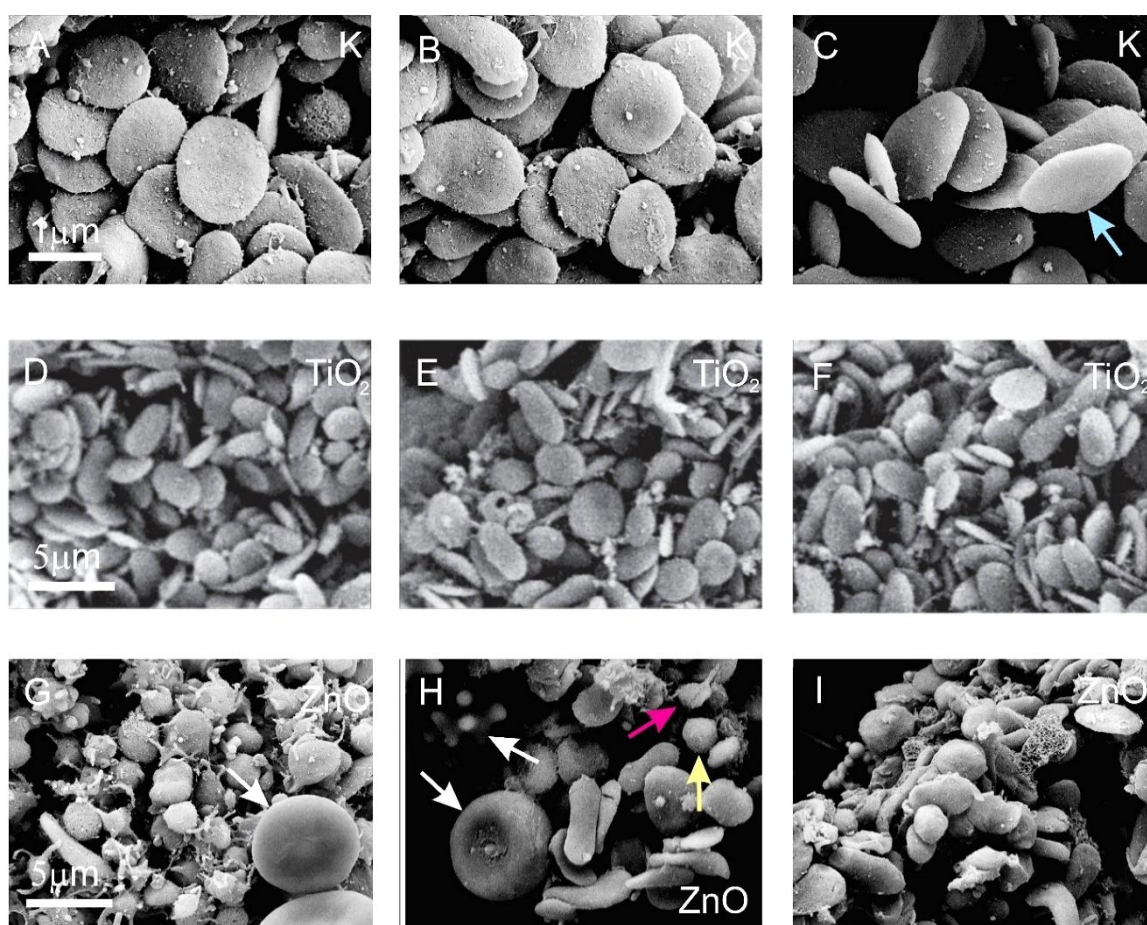
Figure 8: Scanning electron microscope (SEM) micrographs of washed red blood cells of three dogs. A, B, C: control group of red blood cells; D, E, F: red blood cells incubated with TiO₂ NPs; G, H, I: red blood cells incubated with ZnO NPs. Arrows point at larger agglomerates of NPs. Bar in A, B, C, D, E, F, G, H and I = 5 µm (Šimundić et al, 2013).

4.2.3 Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida na ukrivljenost membrane trombocitov in njihove medsebojne interakcije

Inkubacija suspenzije ND TiO₂ v PBS-citratu in s trombociti bogato plazmo po 1 uri ni imela vpliva na ukrivljenost membrane trombocitov. Skupki ND TiO₂ niso povzročili medsebojne interakcije trombocitov, na trombocite so se le pritrdili (Slika 9 D, E, F).

4.2.4 Vpliv nanodelcev cinkovega dioksida na ukrivljenost membrane trombocitov in njihove medsebojne interakcije

Anorganski ND ZnO so aktivirali trombocite v s trombociti bogati pasji plazmi že po 1-urni inkubaciji suspenzije. Aktivirani trombociti so spremenili svojo obliko iz ploščate v kroglaste oblike, nekateri s tubularnimi protruzijami. Sprememba oblike trombocitov je v časovni odvisnosti z inkubacijo; čim dlje časa, kot so bili trombociti inkubirani z ND, tem bolj so se aktivirali (Slika 9 G, H, I).



Slika 9: Mikrografije s trombociti bogate plazme treh psov, zajete z vrstično elektronsko mikroskopijo. A, B, C: kontrolna skupina s trombociti bogate plazme (trombociti diskoidne oblike-modra puščica); D, E, F: s trombociti bogata plazma inkubirana z ND TiO₂ (trombociti diskoidne oblike); G, H, I: s trombociti bogata plazma inkubirana z ND ZnO, aktivirani kroglasti trombociti, nekateri s tubularnimi protruzijami (roza puščica), aktivirani kroglasti trombociti brez protruzij (rumena puščica) in eritrociti, ki so v plazmi bogati s trombociti (bela puščica). Merilo za A, B in C = 1 μm, za D, E, F, G, H in I = 5 μm (Šimundić in sod., 2013).

Figure 9: Scanning electron microscope (SEM) micrographs of platelet-rich plasma of three dogs. A, B, C: control group of platelet-rich plasma (discoid platelets - blue arrow); D, E, F: platelet-rich plasma incubated with TiO₂ NPs (discoid platelets); G, H, I: platelet-rich plasma incubated with ZnO NPs (activated round-shaped platelets, some with tubular protrusions (pink arrow), activated round-shaped platelets without protrusions (yellow arrow) and red blood cells in platelet-rich plasma (white arrow)). Bar in A, B and C = 1 μm, for D, E, F, G, H and I = 5 μm (Šimundić et al, 2013).

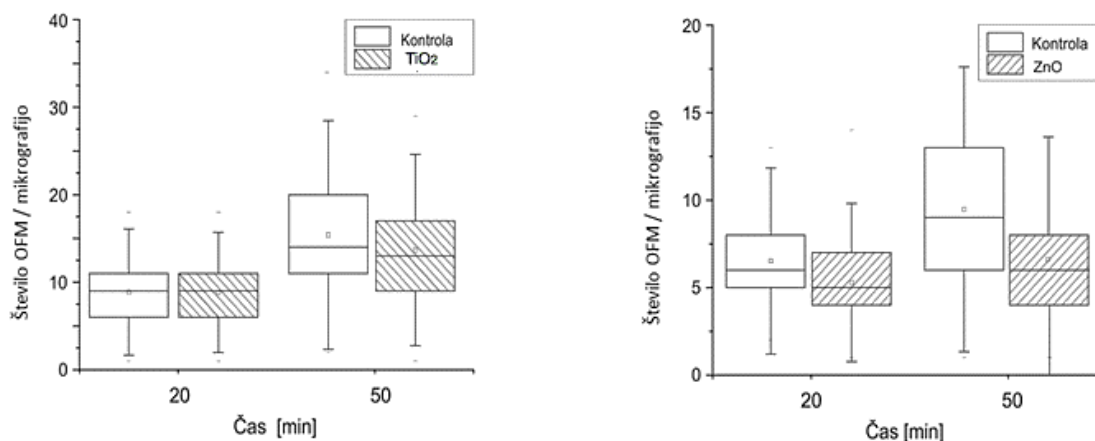
4.3 REZULTATI VPLIVA ANORGANSKIH NANODELCEV NA LASTNOSTI FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN

4.3.1 Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida na lastnosti fosfolipidne membrane

Po dodatku suspenzije ND TiO₂ v 0,3M glukozi k OFM smo zabeležili povečano število OFM na dnu kamrice podobno kot pri kontrolni skupini. Število OFM na dnu kamrice je bilo v pozitivni odvisnosti od časa; po 50 min jih je bilo več kot po 20 minutah (Slika 10).

4.3.2 Vpliv nanodelcev cinkovega oksida na lastnosti fosfolipidne membrane

Po dodatku suspenzije ND ZnO v 0,3M glukozi k OFM smo zabeležili znatno zmanjšanje števila OFM že po 20 min (17 %), še bolj pa po 50 min (28 %). Nanodelci ZnO so že po 20-minutni izpostavitvi povzročili statistično značilno ($p < 0,001$) zmanjšanje števila OFM (Slika 10).



Slika 10: Število OFM po dodatku 0,3M raztopine glukoze (kontrola) in suspenzije ND ZnO in TiO₂. Na navpični osi so podane povprečne vrednosti parametrov OFM, zajetih v eni eksperimentalni kamrici, na dveh mestih vzorčenja (P1 in P2), na vodoravni osi pa časi izpostavitve (20 min in 50 min). V vsaki kamrici pri posameznih časih izpostavitve so ponazorjeni najvišja in najnižja vrednost z ročaji, povprečje je predstavljeno kot manjši pravokotnik v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil.

Figure 10: The number of GPVs after addition of 0.3M glucose solution (control) and suspension of ZnO and TiO₂ NPs. The ordinate shows average values of GPV parameters assessed in one observation chamber at two locations of sampling (P1 and P2). The abscise shows time of exposure (20 minutes and 50 minutes). Maximal and minimal values are given for each chamber at given exposure times by a box. The average value is represented by a smaller rectangle in the middle of the box, the central line shows the median value, while the upper and the lower line show the 25th and 75th percentiles, respectively.

4.4 MORFOLOŠKE SPREMEMBE MEMBRANE CELIC PRI PSIH Z MASTOCITOMOM

4.4.1 Primerjava številske koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi psov z mastocitomom s številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi zdravih psov

V Tabeli 3 predstavljamo rezultate številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi skupine devetih psov z MCT in številske koncentracije MV skupine osmih zdravih psov.

Tabela 3: Primerjava številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi psov z MCT s številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi zdravih psov.

Table 3: Comparison of the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs with MCT with the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of healthy dogs.

| Psi z MCT | | Zdravi psi | |
|------------------------|---|------------------------|---|
| Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov (št/ μ l) | Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov (št/ μ l) |
| 1 | 134 | 14 | 168 |
| 2 | 264 | 15 | 177 |
| 3 | 338 | 16 | 158 |
| 4 | 187 | 17 | 119 |
| 5 | 158 | 18 | 97 |
| 6 | 88 | 19 | 131 |
| 7 | 456 | 20 | 120 |
| 8 | 330 | 21 | 189 |
| 9 | 446 | | |
| Povprečje | 267 | | 145 |
| Standardna deviacija | 135 | | 31 |

$p = 0,01$; $P = 0,77$

Legenda: št = število

Legend: št = number

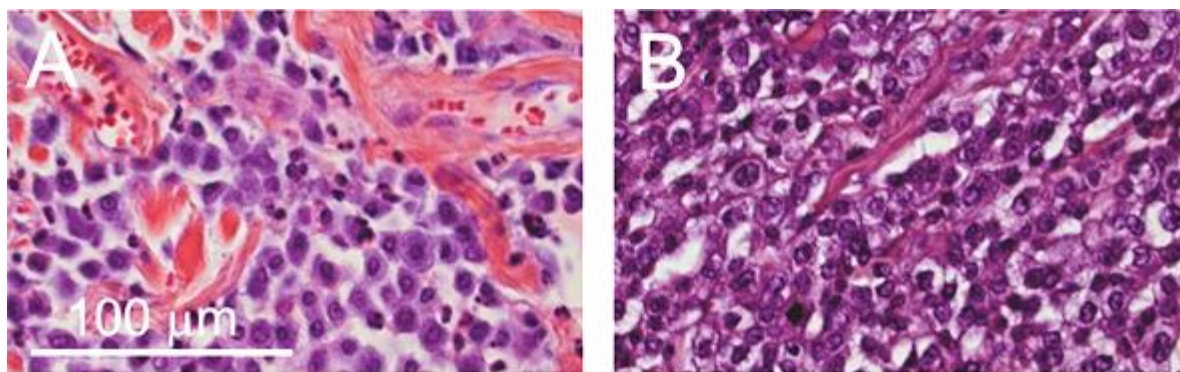
Opomba: primerjava dveh skupin, tj skupine psov z MCT, in zdrave, kontrolne skupine. Pod zaporedno številko so posamezni pacienti, ki jim je bila izmerjena številska koncentracija MV(μ l) v izolatih periferne krvi. Izračunana je povprečna številska koncentracija MV (μ l) v izolatih periferne krvi skupine psov z MCT in zdrave, kontrolne skupine

Remark: Comparison of two groups: the group of dogs with MCT and the control group of healthy dogs. Individual patients with measured concentrations of MVs (μ l) in isolates from peripheral blood are under consecutive numbers. The average concentration of MVs (μ l) in isolates from peripheral blood of the group of dogs with MCT and the control group of healthy dogs is calculated.

V izolatih periferne krvi osmih zdravih psov smo s pretočno citometrijo izmerili povprečno številsko koncentracijo $145/\mu\text{l}$, v skupini devetih psov z MCT pa $267\text{ MV}/\mu\text{l}$. Statistična analiza je pokazala, da je povprečna številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi psov z MCT statistično značilno (84 %) in za faktor 1,8 višja kot povprečna številska koncentracija MV pri zdravih psih (Tabela 3).

4.4.2 Povezava med histološko stopnjo malignosti mastocitoma po Patnaiku in številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri psih pred zdravljenjem

V Tabeli 4 predstavljamo rezultate številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi psov, razdeljeni v dve skupini glede na histološko oceno malignosti MCT (Slika 11).



Slika 11: MCT histološke stopnje malignosti II in III. A: MCT histološke stopnje malignosti II. Zmerno diferencirane tumorske celice, ki so zmerno pleomorfne - okrogle do ovalne oblike, zmerno anizocitotične in imajo različno količino citoplazme, ki je različno močno granulirana. Jedra tumorskih celic so zmerno pleomorfna - okrogla do ovalna in zmerno anizokariotična ter imajo po eno jedrce; B: MCT histološke stopnje malignosti III. Slabo diferencirane tumorske celice, ki so močno pleomorfne - okrogle do ovalne oblike, močno anizocitotične, z različno količino slabo granulirane citoplazme. Jedra tumorskih celic so močno pleomorfna - okrogla, ovalna in z zažemki, močno anizokariotična ter imajo izrazito jedrce. HE. Merilo za A in B = $100\ \mu\text{l}$.

Figure 11: A: Grade II and III MCT. Moderately-differentiated and moderately pleomorphic - round to ovoid tumour cells, which are moderately anisocytotic and have different amounts of cytoplasm. The cytoplasm is more granulated in some and in less in other tumour cells. The nuclei are moderately pleomorphic - round to ovoid, moderately anisocytotic and have a single nucleolus; B: Grade III MCT. Poorly-differentiated, highly pleomorphic - round to ovoid, highly anisocytotic tumour cells, which have different amounts of poorly-granulated cytoplasm. The tumour cells have highly anisokaryotic, highly pleomorphic - round, ovoid and indented nuclei, with a prominent nucleolus. HE. Bar for A in B = $100\ \mu\text{m}$.

Tabela 4: Primerjava med histološko stopnjo malignosti MCT po Patnaiku in številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi pri psih pred zdravljenjem.

Table 4: Comparison between the histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik and the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs before treatment.

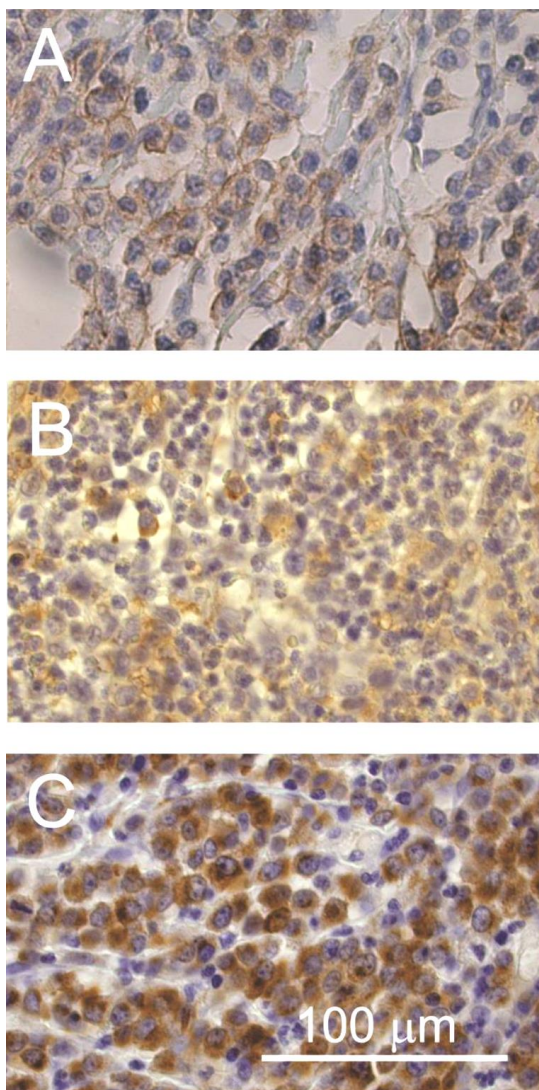
| Histološka stopnja malignosti II | | Histološka stopnja malignosti III | |
|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov (št/μl) | Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov (št/μl) |
| 1 | 134 | 7 | 456 |
| 2 | 264 | 8 | 330 |
| 3 | 338 | 9 | 446 |
| 4 | 187 | | |
| 5 | 158 | | |
| 6 | 88 | | |
| Povprečje | 195 | | 411 |
| Standardna deviacija | 91 | | 70 |

$p = 0,0095$; $P = 1$
Legenda: št = število
Legend: št = number

V izolatih periferne krvi skupine šestih psov z MCT stopnje malignosti II smo izmerili povprečno številsko koncentracijo 195 /μl, v skupini treh psov z MCT stopnje malignosti III pa 411 MV/μl. Rezultati kažejo, da je povprečna številka koncentracija MV v skupini psov z MCT stopnje malignosti III bila za faktor 2,1 višja od povprečne številke koncentracije MV skupine šestih psov z MCT stopnje malignosti II (Tabela 4).

4.4.3 Povezava številke koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi skupine psov z mastocitomom in vzorcem KIT-barvanja

V Tabeli 5 predstavljamo rezultate številke koncentracije MV v izolatih periferne krvi psov z MCT, razdeljenih v tri skupine glede na reakcijo KIT-barvanja (Slika 12).



Slika 12: MCT z vzorcem KIT-barvanja. A: MCT z vzorcem KIT-barvanja I. Značilna imunohistokemična reakcija je vidna na celični membrani tumorskih celic; B: MCT z vzorcem KIT-barvanja II. V citoplazmi tumorskih celic je vidna značilna fokalna ali zrnčasta imunohistokemična reakcija; C: MCT z vzorcem KIT-barvanja III. V citoplazmi tumorskih celic je vidna značilna difuzna močna imunohistokemična reakcija. Imunohistokemično barvanje s kunčjim poliklonskim protitelesom proti človeškemu CD117 (DAKO), kontrastirano s hematoksilinom. Merilo za A, B in C = 100 µm.

Figure 12: MCT with KIT-staining pattern. A: MCT with KIT-staining pattern I, which is characterized by membrane-associated staining of tumour cells; B: MCT with KIT-staining pattern II, which is characterized by intense focal or stippled cytoplasmic staining of tumour cells; C: MCT with KIT-staining pattern III, which is characterized by diffuse and cytoplasmic staining of tumour cells. Immunohistochemical staining with rabbit polyclonal antibody against human CD117 (DAKO), counterstained with hematoxylin. Bar in A, B and C = 100 µm.

Tabela 5: Primerjava številke koncentracije MV v izolatih periferne krvi psov z MCT glede na vzorec KIT-barvanja.

Table 5: Comparison of the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs with MCT according to the KIT-staining pattern.

| KIT-barvanje I | | KIT-barvanje II | | KIT-barvanje III | |
|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov (št/μl) | Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov (/μl) | Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov (št/μl) |
| 2 | 264 | 1 | 134 | 8 | 330 |
| 3 | 338 | 5 | 158 | | |
| 4 | 187 | 7 | 456 | | |
| 6 | 88 | 9 | 446 | | |
| Povprečje | 219 | | 299 | | 330 |

Legenda: št = število

Legend: št = number

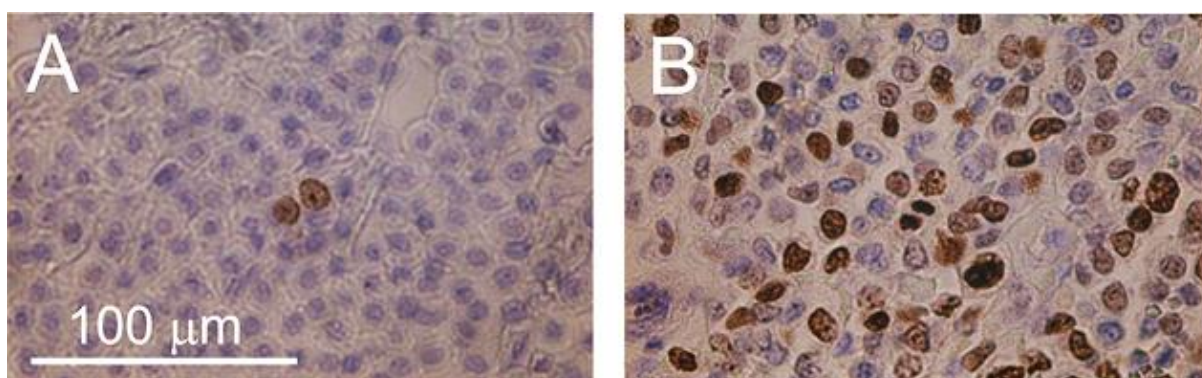
Po vzorcu KIT-barvanja I so se obarvali štirje vzorci, povprečna številka koncentracija MV v izolatih periferni krvi skupine teh štirih psov je bila 219/μl. Po vzorcu KIT-barvanja II so se obarvali štirje vzorci, povprečna številka koncentracija MV skupine teh štirih psov v izolatih periferne krvi je bila 299/μl in je bila za faktor 1,3 višja od povprečne številke koncentracije MV v izolatih periferne krvi skupine psov z vzorcem KIT-barvanja I. Po vzorcu KIT-barvanja III se je obarval le en vzorec (Tabela 5). Pri pacientu z zaporedno številko 8 je bila številka koncentracija MV v izolatih periferne krvi 330/μl in za faktor 1,1 višja od povprečne koncentracije MV v izolatih periferne krvi od skupine psov z vzorcem KIT-barvanja II.

Rezultati raziskave kažejo, da je bila številka koncentracija MV v izolatih periferne krvi psov, ki so imeli MCT z vzorcem KIT-barvanja II ali III, višja kot pri psih z MCT z vzorcem KIT-barvanja I, in da je bila številka koncentracija MV psa, ki je imel MCT z vzorcem KIT-barvanja III, višja od številke koncentracije MV psov, ki so imeli MCT z vzorcem KIT-barvanja II. Rezultati tako kažejo, da se pri vzorcih KIT-barvanja, ki so povezani s slabšo prognozo, v krvi pojavlja višja številka koncentracija MV.

Zaradi premajhnega števila vzorcev v posameznih skupinah podatki niso bili statistično obdelani.

4.4.4 Povezava med proliferacijskim indeksom Ki-67 in številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi skupine psov z mastocitomom

V Tabeli 6 predstavljamo rezultate številske koncentracije MV v izolatih periferne skupine psov z MCT, razdeljeni v dve skupini glede na proliferacijski indeks Ki-67. V prvi skupini so psi, katerih MCT so imeli proliferacijski indeks Ki-67 < 10 (Slika 13 A), in v drugi skupini so psi, katerih MCT so imeli proliferacijski indeks Ki-67 > 10 (Slika 13 B).



Slika 13: MCT in proliferacijski indeks Ki-67. A: MCT s proliferacijskim indeksom Ki-67 < 10. Le fokalno je v jedru tumorske celice vidna značilna imunohistokemična reakcija; B: MCT s proliferacijskim indeksom Ki-67 > 10. V jedrih številnih tumorskih celic je vidna značilna imunohistokemična reakcija. Imunohistokemično barvanje z monoklonskim protitelesom proti človeškemu Ki-67 antigenu, kontrastirano s hematoksilinom. Merilo za A in B = 100 µm.

Figure 13: MCT and proliferative index Ki-67. A: MCT with proliferative index Ki-67 < 10. An immunopositive reaction is visible only focally in the nucleus of a tumour cell; B: MCT with proliferative index Ki-67 > 10. An immunopositive reaction is located in the nuclei of many tumour cells. Immunohistochemical staining with monoclonal antibody against human Ki-67 antigen, counterstained with hematoxylin. Bar in A and B = 100 µm.

Tabela 6: Primerjava številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi psov z MCT glede na proliferacijski indeks Ki-67.

Table 6: Comparison of the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs with MCT according to the proliferative index Ki-67.

| Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov (št/μl) | PI Ki-67 < 10 | Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov (št/μl) | PI Ki-67 > 10 |
|------------------------|-------------------------------------|---------------|------------------------|-------------------------------------|---------------|
| 1 | 134 | 4,9 | 5 | 158 | 16,2 |
| 2 | 264 | 1,32 | 6 | 88 | 31,1 |
| 3 | 338 | 0,29 | 7 | 456 | 18,2 |
| 4 | 187 | 8,64 | 8 | 330 | 14,1 |
| | | | 9 | 446 | 31,1 |
| Povprečje | 231 | 3,8 | | 296 | 23,4 |

Legenda: št = število; PI = proliferacijski indeks
Legend: št = number; PI = proliferative index

Povprečna številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi skupine štirih psov, katere MCT so imeli proliferacijski indeks Ki-67 < 10, je bila 195/μl. Povprečna številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi skupine petih psov, katere MCT so imeli proliferacijski indeks Ki-67 > 10, je bila 259/μl.

Rezultati kažejo, da je povprečna številska koncentracija MV v skupini psov z MCT s proliferacijskim indeksom Ki-67 > 10 bila za faktor 1,3 višja od teh pri skupini psov z MCT s proliferacijskim indeksom Ki-67 < 10.

Odstopanja so bila pri pacientih z zaporedno številko 3, 5 in 6.

Pri pacientu z zaporedno številko 3 je bila številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi 338/μl, medtem ko je bil proliferacijski indeks Ki-67 < 10, kar je za faktor 1,5 višje od povprečja številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi skupine psov s proliferacijskim indeksom Ki-67 < 10. Pri pacientu z zaporedno številko 5 je bila številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi 158/μl, medtem ko je bil proliferacijski indeks Ki-67 > 10 (Tabela 6), kar je za faktor 1,9 nižje od povprečja številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi skupine psov s proliferacijskim indeksom Ki-67 > 10. Pri pacientu z zaporedno številko 6 je bila številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi 88/μl, medtem ko je bil proliferacijski indeks Ki-67 > 10 (Tabela 6), kar je za faktor 3,3 nižje od povprečja številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi skupine psov s proliferacijskim indeksom Ki-67 > 10.

Zaradi premajhnega števila vzorcev v posameznih skupinah podatki niso bili statistično obdelani.

4.4.5 Povezava med številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri psih z mastocitomom s kliničnimi ocenami malignosti, histološkimi ocenami malignosti ter številsko koncentracijo trombocitov v periferni krvi

V Tabeli 7 predstavljamo podatke o izgledu površine tumorja, kliničnem stadiju pacientov, o histološki stopnji malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu ter rezultate številске koncentracije MV v izolatih periferne krvi in trombocitov v periferni krvi pri psih z MCT.

Tabela 7: Podatki o kliničnem izgledu MCT, kliničnem stadiju, histološki stopnji malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu, številski koncentraciji MV v izolatih periferne krvi in trombocitov v periferni krvi.

Table 7: Data on MCT's clinical presentation, clinical stage, histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik and Kiupel, concentration of MVs in isolates from peripheral blood and platelets in peripheral blood.

| Zaporedna številka psa | Klinični izgled | Klinični stadij | Histološka stopnja malignosti | | Koncentracija mikroveziklov (št/ μ l) | Trombociti (143,3–400 $\times 10^9/l$) |
|------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------------|--------|---|---|
| | | | Patnaik | Kiupel | | |
| 1 | alopecija, pigmentacija | 1 | 2 | 0 | 134 | 169 |
| 2 | alopecija | 1 | 2 | 0 | 264 | 218 |
| 3 | alopecija | 1 | 2 | 0 | 338 | 284 |
| 4 | alopecija, ulceracija | 1 | 2 | 0 | 187 | 340 |
| 5 | pod kožo multipli | 1 | 2 | 0 | 158 | 420 |
| 6 | pod kožo | 1 | 2 | 0 | 88 | 282 |
| 7 | alopecija, ulceracija | 1 | 3 | 1 | 456 | 341 |
| 8 | ulceracija | 2 | 3 | 1 | 330 | 286 |
| 9 | nekroza | 2 | 3 | 1 | 446 | 1114 |

Legenda: histološka stopnja malignosti MCT po Patnaiku (2 = II, 3 = III) in Kiupelu (0 – nizko malignen, 1 – visoko malignen); klinični stadij: 1 = solitarni tumor brez zasevkov, 2 = solitarni tumor z zasevki v regionalni bezgavki; št = število

Legend: histological grades of malignancy of MCT according to Patnaik (2 = II, 3 = III) and Kiupel (0 – low-grade, 1 – high-grade); clinical stage: 1 = nonmetastatic solitary tumour, 2 = solitary tumour with metastases in the regional lymph node; št = number

V naši raziskavi so bili MCT z ulcerirano in/ali nekrotizirano površino ugotovljeni pri štirih psih. Izmed teh so bili trije MCT pacientov z zaporedno številko 7, 8 in 9 v patohistološki

preiskavi ocenjeni kot MCT histološke stopnje malignosti III po Patnaiku in kot MCT visoke stopnje malignosti po Kiupelu, od tega je bil pri pacientih z zaporednima številka 8 in 9 določen klinični stadij 2. Pri ostalih pacientih z zaporedno številko od 1–7 smo zabeležili klinični stadij 1. Iz teh podatkov je razvidno, da imajo MCT z ulcerirano in/ali nekrotizirano površino več patohistoloških kriterijev malignosti.

Pri vseh pacientih z zaporedno številko od 1–6 s histološko oceno MCT stopnje malignosti II po Patnaiku je ocena malignosti po Kiupelu nizko malign tumor (ocena 0). Pri pacientih s histološko oceno MCT stopnje malignosti III po Patnaiku je histološka ocena po Kiupelu visoko malign tumor (ocena 1) (Tabela 7). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da sta obe patohistološki preiskavi primerljivi.

Številna koncentracija trombocitov je bila pri večini psov z MCT znotraj referenčnih vrednosti. Pojav trombocitoze smo zabeležili le pri dveh pacientih z zaporednima številka 5 in 9 (Tabela 7). Pri pacientu z zaporedno številko 5 je bila številna koncentracija trombocitov $420 \times 10^9/l$ (ref. $143.3-400 \times 10^9/l$) in MV v izolatu periferne krvi $158/\mu l$, medtem ko je bila patohistološka ocena MCT stopnje malignosti II in 0 po Kiupelu. Pri pacientu z zaporedno številko 9 je bila številna koncentracija trombocitov $1114 \times 10^9/l$ (ref. $143.3-400 \times 10^9/l$), MV v izolatu periferne krvi $449/\mu l$, medtem ko je bil MCT stopnje malignosti III po Patnaiku in MCT visoke malignosti po Kiupelu (ocena 1).

Pacient s trombocitozo z zaporedno številko 5 je bil histološko ocenjen kot MCT stopnje malignosti II po Patnaiku za razliko od pacienta z zaporedno številko 9, ki je bil ocenjen kot MCT stopnje malignosti III po Patnaiku.

Rezultati ne kažejo korelacije trombocitoze z visoko malignim MCT (razen pacient 9).

4.4.6 Spremljanje številske koncentracije mikroveziklov in trombocitov v izolatih periferne krvi psov pred, med in po začetku zdravljenja mastocitoma

V Tabeli 8 so prikazani rezultati številske koncentracije MV in trombocitov v izolatih periferne krvi skupine psov pred, med in po začetku zdravljenja MCT.

Tabela 8: Spremljanje številske koncentracije MV v izolatih periferne krvi in trombocitov v periferni krvi pri psih z MCT pred, med in po zdravljenju.

Table 8: Monitoring of the concentration of MVs in isolates from peripheral blood and platelets in peripheral blood of dogs with MCT before, during and after treatment.

| Zaporedna številka psa | Koncentracija mikroveziklov pred zdravljenjem (št/μl) | Čas po zdravljenju (tedni) | Zdravljenje in odgovor na zdravljenje | Koncentracija mikroveziklov po zdravljenju (št/μl) | Trombociti (143,3-400 x10 ⁹ /l) |
|------------------------|---|----------------------------|---------------------------------------|--|--|
| 2 | 264 | 0 | kg | | 218 |
| | | 4 | | 414 | np |
| | | 16 | | 133 | 199 |
| 4 | 187 | 17 | recidiv | | |
| | | 0 | kg, ECT, EGT | | 340 |
| | | 4 | ECT, EGT | 153 | 336 |
| 7 | 456 | 8 | | 167 | 352 |
| | | 0 | kg | | 341 |
| | | 4 | CR | 247 | np |
| 8 | 330 | 0 | kg, kemo | | 286 |
| | | 9 | ECT, EGT | 216 | 282 |
| | | 12 | masitinib | np | np |
| | | 14 | | 52 | 282 |
| 9 | 446 | 20 | evt, multiorganska odpoved | np | np |
| | | 0 | kemo | | 1114 |
| | | 5 | kg paliat | 612 | 940 |
| | | 12 | meta lnn; masitinib | np | 486 |
| 10 | 151 | 13 | evt | np | np |
| | | 0 | ECT | | 264 |
| | | 8 | CR | np | np |
| 11 | np | 0 | kemo | | 285 |
| | | 1 | | 107 | 211 |
| | | 2 | NC | 221 | |
| | | 15 | evt, PD | | np |
| 12 | np | 0 | kg brez var. robov, kemo | | np |
| | | 5 | | 104 | 247 |
| | | 10 | recidiv | 723 | 281 |
| | | 28 | pogin | np | np |
| 13 | np | 0 | kemo | | 211 |
| | | 3 | ECT | np | 236 |
| | | 7 | | 160 | 366 |
| | | 8 | | 127 | 320 |
| | | 12 | kemo lomustin | np | 158 |
| | | 13 | evt | np | np |

Legenda: krg = kirurško zdravljenje; krg brez var. robov = kirurgija brez varnostnih robov; np = ni podatka; kemo = kemoterapija z vinblastinom in prednisolonom; kemo lomustin = kemoterapija z lomustinom; ECT = elektrokemoterapija; EGT = elektrogenska terapija; krg paliat = paliativna kirurgija; evt = evtanazija; CR = popoln odgovor na zdravljenje (angl. complete response); PD = napredujoča bolezen (angl. progressive disease); NC = ni spremembe (angl. no change); meta lnn = zasevki v bezgavki; št = število

Legend: krg = surgery; krg brez var. robov = surgery without safety margins; np = no data; kemo = chemotherapy with vinblastine and prednisolone; kemo lomustin = chemotherapy with lomustine; ECT = electrochemotherapy; EGT = electrogene therapy; krg paliat = palliative surgery; evt = euthanasia; CR = complete response; PD = progressive disease; NC = no change; meta lnn = metastases in the lymph node; št = number

Številna koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri pacientu z zaporedno številko 2 je bila 264/ μ l pred začetkom zdravljenja in je za faktor 1,01 nižja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT, štiri tedne po kirurški terapiji 414/ μ l (za faktor 1,56 višja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT) in 16 tednov po začetku zdravljenja 133/ μ l (za faktor 2 nižja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT). Številna koncentracija trombocitov je bila znotraj referenčnih vrednosti.

Številna koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri pacientu z zaporedno številko 4 je bila pred začetkom zdravljenja 187/ μ l in je za faktor 1,4 višja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT, štiri tedne po začetku zdravljenja 153/ μ l (za faktor 1,7 nižja od povprečja kontrolne skupine psov z MCT) in osem tednov po začetku zdravljenja 167/ μ l (za faktor 1,5 nižja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT). Številna koncentracija trombocitov je bilo znotraj referenčnih vrednosti.

Številna koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri pacientu z zaporedno številko 7 je bila pred začetkom zdravljenja 456/ μ l in je za faktor 1,7 višja od povprečja številne koncentracije MV skupine psov z MCT in štiri tedne po začetku zdravljenja 247/ μ l (za faktor 1,08 nižja od povprečja kontrolne skupine psov z MCT). Številna koncentracija trombocitov je bila znotraj referenčnih vrednosti.

Številna koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri pacientu z zaporedno številko 8 je bila pred začetkom zdravljenja 330/ μ l in je za faktor 1,2 višja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT, devet tednov po začetku zdravljenja 216/ μ l (za faktor 1,2 nižja od povprečja kontrolne skupine psov z MCT) in štirinajst tednov po začetku zdravljenja 52/ μ l (za faktor 5,1 nižja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT). Številna koncentracija trombocitov je bila znotraj referenčnih vrednosti.

Številna koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri pacientu z zaporedno številko 9 je bila pred začetkom zdravljenja 446/ μ l in je za faktor 1,7 višja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT in mesec po začetku zdravljenja 612/ μ l (za faktor 2,2 višja od povprečja kontrolne skupine psov z MCT). Številna koncentracija trombocitov je bila povišana pred začetkom zdravljenja $1114 \times 10^9/l$ pet tednov po začetku zdravljenja $940 \times 10^9/l$ in dvanajst tednov po začetku zdravljenja $486 \times 10^9/l$ (ref. 143.3–400 $\times 10^9/l$).

Številna koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri pacientu z zaporedno številko 10 je bila 151/ μ l pred začetkom zdravljenja in je za faktor 1,8 nižja od povprečne številne koncentracije

MV skupine psov z MCT. Številna koncentracija trombocitov je bila znotraj referenčnih vrednosti.

Številna koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri pacientu z zaporedno številko 11 je bila 107/ μ l 1 teden po zdravljenju in je za faktor 2,5 nižja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT ter en teden po zdravljenju 221/ μ l (za faktor 1,2 nižja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT). Številna koncentracija trombocitov je bila znotraj referenčnih vrednosti.

Številna koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri pacientu z zaporedno številko 12 je bila 104/ μ l 5 tednov po začetku zdravljenja in je za faktor 2,6 nižja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT in 10 tednov po začetku zdravljenja 723/ μ l (za faktor 2,7 višja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT). Številna koncentracija trombocitov bila znotraj referenčnih vrednosti.

Številna koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri pacientu z zaporedno številko 13 je bila 160/ μ l 7 tednov po začetku zdravljenja in je za faktor 1,6 nižja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT ter 8 tednov po začetku zdravljenja 127/ μ l (za faktor 2,1 nižja od povprečne številne koncentracije MV skupine psov z MCT). Številna koncentracija trombocitov je bila znotraj referenčnih vrednosti.

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV ANORGANSKIH NANODELCEV NA MORFOLOŠKE SPREMEMBE MEMBRANE KRVNIH CELIC IN FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN

5.1.1 Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida in cinkovega oksida na ukrivljenost membrane pasjih eritrocitov in njihove medsebojne interakcije

V naši raziskavi smo zabeležili, da so se ND TiO₂ in ZnO pritrdili na membrano pasjih eritrocitov po 1-urni inkubaciji, medtem ko nismo opazili spremenjene ukrivljenosti membrane eritrocitov. Prav tako ni prišlo do vpliva ND na medsebojne interakcije pasjih eritrocitov. Tudi v naši že objavljeni študiji vpliva ND TiO₂ na človeške eritrocite smo zaključili, da ni prišlo do spremembe ukrivljenosti celične membrane. Za razliko od tukaj predstavljenega dela, pa smo v naši drugi študiji opazili medsebojno zlepljanje eritrocitov kot posledico interakcije ND TiO₂ ali ZnO z membrano človeškega eritrocita po 24-urni inkubaciji s suspenzijama (in ne po 3-urni inkubaciji) (Šimundić in sod., 2013). Predpostavili smo, da je prišlo do sočasne interakcije ND z membrano dveh celic, kar je privedlo do t. i. premostitvene interakcije (Šimundić in sod., 2013). Dobljen negativen rezultat v doktorskem delu je lahko posledica kratke inkubacije. Čas inkubacije se je namreč izkazal kot pomemben dejavnik pri vrednotenju vpliva ND na različne sesalčje celice (Colvin, 2003; Jeng in Swanson, 2006; Šimundić in sod., 2013).

V okviru raziskav doktorskega dela so bili ND TiO₂ in ZnO v suspenzijah v obliki večjih aglomeratov. Zook in sod. (2011) poročajo o višjem hemolitičnem potencialu manjših aglomeratov ND v primerjavi z večjimi (Zook in sod., 2011). Greish in sod. (2014) so v študiji zaključili, da lahko večjih agregati ND v realnem biološkem okolju povzročijo mehansko zamašitev drobnih kapilar in žil (Greish in sod., 2014). Za razliko od rezultatov, predstavljenih v našem delu, Pajnič in sod. (2015) poročajo o poškodbi membrane eritrocitov in nastanku velikih por po lepljenju velikih aglomeratov ND črnega ogljika na membrano eritrocitov (Pajnič in sod., 2015). Velikost in koncentracija ND sta pomembna dejavnika vpliva ND na celice. Li in sod. (2008) poročajo o vplivu velikosti ND TiO₂ na kunčje eritrocite, pri čemer so bili ND TiO₂ premera 20 nm in so povzročili nastanek akantocitov, hemaglutinacijo, hemolizo ter sproščanje RKZ (Li in sod., 2008), saj je v membrani eritrocitov veliko poli-nenasičenih

maščobnih kislin (Scott in sod., 1993). Prav tako poročajo, da so ND ZnO v odvisnosti od koncentracije povzročili hemolizo eritrocitov (Aula in sod., 2014). Sprememba lastnosti membrane eritrocita lahko zmanjša prehodnost kapilar za eritrocite, kar vodi v upočasnen krvni obtok, hipoksemijo in poškodbo tkiva (Winski in Carter, 1998; Svetina in sod., 2004). Aisaka in sod. (2008) so dokazali supresijo hemolize, nastale kot posledice delovanja ND TiO₂ na eritrocite z dodatkom plazme, kar nakazuje, da bi bilo to mogoče tudi *in vivo*, t j. v kompleksnem biološkem okolju (Aisaka in sod., 2008). Pričakujemo, da bi bila večja verjetnost nastanka spremembe oblike membrane eritrocitov pod vplivom ND TiO₂ in ZnO, če bi bili ND manjši in ne v skupkih aglomeratov, v višji koncentraciji in če bi inkubacija traja dlje časa.

5.1.2 Vpliv anorganskih nanodelcev na ukrivljenost membrane pasjih trombocitov in njihove medsebojne interakcije

5.1.2.1 Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida na ukrivljenost membrane trombocitov in njihove medsebojne interakcije

ND TiO₂ niso povzročili morfoloških sprememb trombocitov po 1-urni inkubaciji, prav tako ni prišlo do medsebojnih interakcij trombocitov pod vplivom ND TiO₂. Za razliko od dobljenih rezultatov smo v študiji vpliva ND TiO₂ na človeške trombocite ugotovili, da so se trombociti aktivirali po 24-urni inkubaciji (ne pa po 3-urni inkubaciji) (Šimundić in sod., 2013). Verjetno je, da do morfoloških sprememb membrane pasjih trombocitov pod vplivom ND TiO₂ ni prišlo zaradi kratkega inkubacijskega časa. V drugi študiji (Krek in sod., 2015) smo prav tako zabeležili, da ND črnega ogljika po 1-urni inkubaciji niso vplivali na obliko pasjih trombocitov (Krek in sod., 2015).

5.1.2.2 Vpliv nanodelcev cinkovega oksida na ukrivljenost membrane trombocitov in njihove medsebojne interakcije

ND ZnO so vplivali na ukrivljenost celične membrane trombocitov. Trombociti so se aktivirali v s trombociti bogati pasji plazmi že po 1-urni inkubaciji. Možen mehanizem aktivacije

trombocitov je odtapljanje Zn ionov med inkubacijo ND ZnO v s trombociti bogati plazmi, kar so potrdile tudi druge študije (Beurki-Thurnherr in sod., 2013). Predvidevamo, da lahko zaradi odtapljanja Zn ionov iz ND ZnO pride do porušenega osmotskega ravnotežja in spremembe v pH-ju raztopine, do nastanka lokalnega električnega polja zaradi nabitih delcev, kar ima lahko za posledico kemijske spremembe in nastanek škodljivih RKZ. Znano je, da dvovalentni ioni aktivirajo trombocitno agregacijo (Spaet in Zucker, 1964) in da prehodni elementi, kot so Ni, Zn in Mn, povzročajo še hitrejšo agregacijo trombocitov kot zemeljoalkalijske kovine (Mg in Ca) (Penglis in sod., 1969). Raziskave kažejo, da lahko Zn ioni v celici povzročajo povišano koncentracijo Ca, nastanek RKZ, oksidativni stres, spremembo citoskeleta in celično smrt (Sharifi in sod., 2012; Huang in sod., 2010; Chang in sod., 2012). Zn ioni lahko aktivirajo protein kinazo C in ojačajo izpostavljanje tistih fibrogenih receptorjev na površini trombocitov, ki so stimulirani z ADP (Trybulec in sod., 1993). Mehanizem aktivacije trombocitov poteka preko tirozinske fosforilacije (Golden in sod., 1990), inaktivna oblika glikoproteinskega membranskega receptorja GpIIb/IIIa se spremeni v aktivno obliko (Simak, 2009). Pri aktivaciji in kasneje agregaciji trombocitov pride do povečane intracelularne koncentracije Ca^{2+} , povečanega sproščanja adenozin-trifosfata (angl. adenosine triphosphate, ATP) (Deb in sod., 2011) idr. signalnih molekul iz trombocitnih zrc, spremembe oblike trombocita, nastanka pseudopodija, izražanja aktivnih označevalcev na celični membrani (CD62P) in sproščanja prokoagulantnih mikrodelcev iz plazemske membrane (Simak, 2009).

Kemijska zgradba ND je pomemben dejavnik, ki vpliva na citotoksičnost, saj je toksičnost ND ZnO dosti večja od ND TiO₂ predvsem zaradi odtapljanja Zn ionov iz ND (Schmidt in Vogelsberger, 2006; Ivask in sod., 2015).

5.1.3 Vpliv nanodelcev titanijevega dioksida in cinkovega oksida na lastnosti fosfolipidnih membran

Dodatek suspenzije ZnO k suspenziji OFM v sladkorni raztopini povzročil izrazito pokanje OFM. Število OFM se je že po 20-minutni inkubaciji v suspenziji ND ZnO zmanjšalo v primerjavi s kontrolno skupino. Učinek vpliva ND ZnO na OFM je bil znatno zmanjšanje števila OFM že po 20 min (17 %), še bolj pa po 50 min (28 %), medtem ko je število OFM po inkubaciji z ND TiO₂ ostalo enako kot v kontrolni skupini.

Predlagan mehanizem za opisan učinek ND ZnO pripisujemo odtapljanju Zn ionov iz ND, kar je spremenilo osmolarnost raztopine in posledično prostornino ter obliko mehurčkov. V isti študiji ND TiO₂ niso imeli učinka na OFM, kjer se je število OFM na dnu kamrice večalo s časom tako v kontrolni kot tudi v skupini z OFM inkubirani z ND TiO₂ zaradi posedanja. Vpliv ND na OFM ni odvisen samo od sestave, temveč tudi od velikosti ND. Drašler in sod. (2014) poročajo o večjem vplivu manjših aglomeratov ND CoFe₂O₄ z adsorbirano citronsko kislino v primerjavi z večjimi aglomerati golih CoFe₂O₄ in predpostavljajo, da lahko gre pri interakciji ND z umetnimi fosfolipidnimi membranami tudi za direktno interakcijo ND z lipidnim dvoslojem (Drašler in sod., 2014).

5.2 MORFOLOŠKE SPREMEMBE MEMBRANE CELIC PRI PSIH Z MASTOCITOMOM

5.2.1 Primerjava številske koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi psov z mastocitomom s številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri zdravih psih

Rezultati naše raziskave kažejo, da je povprečna številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri psih z MCT (267/μl) statistično značilna (84 %) in za faktor 1,8 višja kot pri psih brez MCT (145/μl), kar je skladno s prejšnjimi študijami, ki opisujejo povišano številsko koncentracijo MV pri ljudeh, obolenih z različnimi onkološkimi obolenji (Kim in sod., 2003; Janša in sod., 2008; Baran in sod., 2010; De Luca in sod., 2016).

Predpostavljamo, da je povišana številska koncentracija MV v izolatih iz krvi skupine psov z MCT posledica več dejavnikov: povečanega sproščanja TMV iz tumorskih celic, povečanega nastanka MV trombocitnega izvora predvsem zaradi aktivacije trombocitov in morda spremenjene vezikulabilnosti, zaradi katere se pod vplivom zunanjih sil (odvzema krvi in postopkov izolacije) celice hitreje in v večjem številu fragmentirajo. V študiji vpliva melanoma na nastanek MV so ugotovili, da je največ nastalih MV v izolatih periferne krvi trombocitnega izvora (Koliha in sod., 2016).

Številnim študijam navkljub še danes ni pojasnjen natančen mehanizem nastanka povišane številske koncentracije MV iz tumorskih celic in trombocitov pri onkoloških bolnikih, prav tako kot še ni znan mehanizem nastanka MV iz trombocitov zdravih osebkov (Ponomareva in sod.,

2016). Do sedaj predlagani mehanizmi za povišano koncentracijo MV so, da zaradi spremenjenih mehanskih lastnosti membrane krvnih celic (Yanez-Mo in sod., 2015), pride v postopku izolacije membrane do močnejše fragmentacije (Šuštar in sod., 2011).

Predvideva se tudi, da zaradi neugodnega tumorskega mikrookolja, ki vključuje hipoksijo, stradanje in acidozo, pride do avtofagije tumorskih celic in do povišane številske koncentracije MV (Murrow in Debnath, 2015; Fonseca in sod., 2016). Parolini in sod. (2009) poročajo o nastanku večjega števila MV iz kulture melanomskih celic Mel 1 v kislem okolju za razliko od alkalnega (Parolini in sod., 2009).

5.2.2 Povezava med histološko stopnjo malignosti mastocitoma po Patnaiku in številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri psih pred zdravljenjem

V povezavi s prejšnjim zaključkom o povišani številski koncentraciji MV v izolatih periferne krvi pri psih z MCT v primerjavi s psi brez MCT nas je zanimalo ali je številska koncentracija MV višja pri histološki stopnji malignosti III v primerjavi s histološko stopnjo malignosti II po Patnaiku. Glede na to, da zasevajo MCT pri psih s slabo diferenciranim tumorjem (stopnja malignosti III) kar v 75 % in sedem mesecev preživi le 13 % (Bostock, 1973) ter 48 mesecev le 6 % psov (Patnaik in sod., 1984), smo pričakovali višjo številsko koncentracijo MV pri tej skupini psov.

Ugotovili smo, da je bila povprečna številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi pri skupini psov z MCT stopnje malignosti III za faktor 2,1 višja kot pri skupini psov s stopnjo malignosti II. Podobno poročajo Kim in sod. (2003) v raziskavi, v kateri je višja številska koncentracija MV pri napredovanem stadiju IV (I-IV) karcinoma želodca pri ljudeh v primerjavi s prvim stadijem bolezni (Kim in sod., 2003).

TMV nastajajo pri ljudeh z napredovanimi tumorji v večjem številu (Pap, 2011). Prav tako nastaja večje število MV iz aktiviranih trombocitov. Maligne celice aktivirajo trombocite neposredno s kontaktom ali preko različnih mehanizmov kot npr.: ADP (Zucchella in sod., 1989; Egan in sod., 2011), trombinom in tromboksanom A2 (TXA2) (Egan in sod., 2011), tkivnim faktorjem (Chiang in sod., 1994) in še na vrsto drugih načinov (Li, 2016). Helley in sod. poročajo, da je povišano število MV trombocitnega izvora v povezavi z višjo stopnjo malignosti tumorja in hujšo klinično sliko (Helley in sod., 2009).

Največ MV v izolatih periferne krvi nastane zaradi strižnih sil *in vitro* (Šuštar in sod., 2011). Glede na razliko med povprečno številsko koncentracijo MV v vzorcu psov z MCT histološke stopnje malignosti III in povprečno številsko koncentracijo MV v vzorcu psov z MCT s histološko stopnjo malignosti II si razlagamo, da gre verjetno za spremembo vezikulabilnosti celic pod vplivom tumorja z višjo stopnjo malignosti in posledično večjo fragmentacijo celic ter nastanek večjega števila MV pod vplivom zunanjih dejavnikov (odvzem vzorca – strižna sila skozi iglo, centrifugiranje, idr.), ki prispevajo k skupnemu povišanemu številu MV v izolatih periferne krvi psov z MCT. Ustrezni mehanizmi za povišanje koncentracije MV zaenkrat še niso pojasnjeni. Do sedaj predlagani mehanizmi za povišano koncentracijo MV so, da zaradi spremenjene mehanske lastnosti membrane krvnih celic (Yanez-Mo in sod., 2015) v postopku izolacije membrane močnejše fragmentirajo (Šuštar in sod., 2011). Zaključujemo, da je povprečna številka koncentracija MV višja pri skupini psov z višjo histološko stopnjo malignosti v primerjavi s skupino psov z nižjo histološko stopnjo malignosti.

5.2.3 Povezava številke koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi psov z mastocitomom in vzorcem KIT-barvanja

Rezultati raziskave kažejo povezavo med številsko koncentracijo MV v periferni krvi in imunohistokemično reakcijo z različno izraženimi vzorci KIT receptorja. Številka koncentracija MV je v izolatu periferne krvi psa z MCT z vzorcem KIT-barvanja III za faktor 1,1 višja v primerjavi s povprečno številsko koncentracijo MV v krvi skupine psov z vzorcem KIT-barvanja II ter pri slednjih za faktor 1,3 višja od povprečne številke koncentracije MV skupine psov z MCT z vzorcem KIT-barvanja I.

To je v skladu s pričakovanji, saj je KIT protein izražen v citoplazmi MCT zlasti pri tumorjih s histološko oceno malignosti II in III po Patnaiku (Reguera in sod., 2000); to je skupina psov, kjer smo zasledili povišano številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi v primerjavi s skupino psov brez MCT. Kiupel in sod. (2004) so opisali povezavo med imunohistokemično reakcijo z izraženimi vzorci barvanja II in III KIT receptorja, pogostejšo ponovitvijo bolezni in krajšim preživetvenim obdobjem (Kiupel in sod., 2004).

Pri MCT z mutacijo na genu *c-KIT* se pogosteje izražajo receptorji KIT z vzorcem barvanja II in III, kar je verjetno posledica mutacije in fokalnega (vzorec KIT-barvanja II) ali difuznega (vzorec KIT-barvanja III) kopičenja KIT proteina v citoplazmi (Webster in sod., 2006).

Avtofosforiliran protein receptor KIT se kopiči v endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu tumorskih celic z mutacijo gena *c-KIT* v GIST pri ljudeh (Tabone-Eglinger in sod., 2008).

Vsi mehanizmi kopičenja proteina KIT v celici še niso v celoti odkriti, saj se imunohistokemične reakcije KIT z vzorcem barvanja II in III lahko ugotovijo tudi pri MCT brez dokazane mutacije. Thompson in sod. (2011) v raziskavi podkožnih MCT v šestdesetih MCT niso našli mutacije gena *c-KIT*, medtem ko je citoplazemski vzorec KIT barvanja izstopal pri MCT psov s slabšo prognozo (Thompson in sod., 2011).

Naše ugotovitve kažejo, da imata skupini psov z MCT z vzorcem KIT-barvanja II in III v povprečju višjo številsko koncentracijo MV v primerjavi s skupino psov z vzorcem KIT-barvanja I, kar pomeni, da se pri reakcijah, ki so povezane s slabšo prognozo, pojavlja višja številska koncentracija MV.

5.2.4 Povezava med proliferacijskim indeksom Ki-67 in koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi skupine psov z mastocitomom

Proliferacijski indeks Ki-67 nam omogoča vpogled v proliferacijsko aktivnost celice. Večja stopnja proliferacijske aktivnosti je prisotna pri tumorjih s slabšo prognozo. Abadie in sod. (1999) so ugotovili povezavo med histološko stopnjo malignosti III po Patnaiku in visokim številom Ki-67 pozitivnih jeder novotvorbni celic. 29 od 32 (88 %) psov s stopnjo malignosti II po Patnaiku, ki so imeli manj kot 93 Ki-67 pozitivnih jeder na 1000 tumorskih jeder, je preživel 24 mesecev, medtem ko je bilo le 10 od 27 (37 %) preživelih psov, ki so imeli več kot 93 Ki-67 pozitivnih jeder na 1000 tumorskih jeder, kar je izrednega napovednega značaja (Abadie in sod., 1999). Ker stopnja malignosti II po Patnaiku ni napovednega značaja, saj po podatkih Patnaika in sod. (1984) preživi 1500 dni 47 % psov z MCT gradusa II (Patnaik in sod., 1984), nam je proliferacijski indeks Ki-67 v pomoč glede napovedi in izbire zdravljenja (Maglennon in sod., 2008).

Rezultati naše raziskave kažejo povezavo med povišano povprečno številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi pri psih z MCT in povišanim proliferacijskim indeksom Ki-67, saj je bila povprečna številska koncentracija MV v skupini psov z MCT s proliferacijskim indeksom $Ki-67 > 10$ za faktor 1,28 višja od teh pri skupini psov z MCT, s proliferacijskim indeksom $Ki-67 < 10$.

Izstopata pacienta z zaporedno številko 5 in 6, ki imata nizko številsko koncentracijo MV in visok proliferacijski indeks $Ki-67 > 10$ in pacient z zaporedno številko 3, ki ima visoko številsko koncentracijo MV in nizek proliferacijski indeks $Ki-67 < 10$. Zanimivo je, da imata oba pacienta 5 in 6 podkožni MCT, za katerega opisujejo nižji proliferacijski indeks v primerjavi s kožnim MCT (Thompson in sod., 2011). Razlagamo si lahko, da gre verjetno za bolj maligni MCT glede na proliferacijski indeks $Ki-67 > 10$ in je morda število MV v izolatih periferne krvi psov s podkožnim MCT zaradi drugačnega okolja nižje kot pri kožnem MCT z enako stopnjo malignosti. Za potrditev te razlage bi bila potrebna raziskava MV v izolatih periferne krvi iz večjega števila psov s podkožnim MCT.

Do višje koncentracije MV pri pacientu z zaporedno številko 3 je lahko prišlo *in vitro* zaradi težjega odvzema krvi, saj gre za psico pasme shar-pei, pasmo, ki ima podkožje bogato z mucinom ter s slabo vidnimi žilami (Zanna in sod., 2009).

5.2.5 Povezava med številsko koncentracijo mikroveziklov v izolatih periferne krvi pri psih z mastocitomom s kliničnimi ocenami malignosti, histološkimi ocenami malignosti ter številsko koncentracijo trombocitov v periferni krvi

V naši raziskavi so bili MCT z ulcerirano in/ali nekrotizirano površino ugotovljeni pri štirih pacientih, od teh je bil klinični stadij 2 določen pri dveh pacientih, histološka ocena malignosti pri treh MCT psov je bila ocenjena kot stopnja malignosti III po Patnaiku in visoka stopnja malignosti po Kiupelu. Znano je namreč, da so MCT z ulcerirano/nekrotizirano površino slabše diferencirani in imajo višjo histološko stopnjo malignosti (Blackwood in sod., 2012). Iz teh podatkov je razvidno, da imajo MCT z ulcerirano in/ali nekrotizirano površino več patohistoloških kriterijev malignosti.

V raziskavi smo potrdili primerljivost histološke ocene po Patnaiku in Kiupelu, saj so bili vsi MCT ocenjeni s stopnjo malignosti II po Patnaiku z nizko stopnjo malignosti (ocena 0) po Kiupelu. Prav tako so vsi MCT, ki so bili po Patnaiku ocenjeni kot slabo diferencirani, bili ocenjeni kot MCT z visoko stopnjo malignosti po Kiupelu. Histološka stopnja malignosti je osnova za napoved poteka bolezni in izbiro zdravljenja. V eni od raziskav je bilo ugotovljeno, da je 28 različnih patologov iz 16 inštitucij v 75 % enako ocenilo MCT s stopnjo malignosti III po Patnaiku in le v 64 % enako ocenilo MCT stopnje malignosti I in II. Ocenjenih je bilo 95 MCT 95 različnih psov. Zaradi tako velikih razlik pri ocenjevanju malignosti po Patnaiku so Kiupel in sod. (2011) izdali priporočila za dvotirni sistem patohistološkega ocenjevanja stopnje

malignosti MCT z namenom, da se izboljša soglasje ocen in s tem napoved bolezni. Izsledki kažejo, da je povprečno preživetveno obdobje psov z visoko stopnjo malignosti MCT po Kiupelu 4 mesece in z nizko stopnjo malignosti več kot 2 leti (Kiupel in sod., 2011).

Številska koncentracija trombocitov je bila pri večini psov z MCT znotraj referenčnih vrednosti. Pojav trombocitoze smo zabeležili pri dveh pacientih. Le pri pacientu z zaporedno številko 9 je bila povišana številka koncentracija trombocitov $1114 \times 10^9 / l$ (ref. $143.3\text{--}400 \times 10^9 / l$) kot posledica paraneoplastičnega sindroma, saj je tumor bil nekrotiziran in je krvavel, številka koncentracija MV v izolatu periferne krvi je bila $449 / \mu l$, medtem ko je bil MCT ocenjen s stopnjo malignosti III po Patnaiku in kot visoko malignen po Kiupelu. Rezultati ne kažejo korelacije trombocitoze z visoko malignimi MCT (razen pacient 9).

Trombocitoza je pogost paraneoplastični sindrom, saj je pri ljudeh z onkološkimi obolenji prisotna kar v 33,9 % primerov (Rossi in sod., 1997). Dokazano je, da je povišana številka koncentracija trombocitov pri onkoloških pacientih povezana z večjo smrtnostjo in rezistenco na kemoterapijo (Stone in sod., 2012; Bottsford-Miller in sod., 2015). Trombocitoza nastaja kot posledica sproščanja citokinov iz tumorja, predvsem IL-6 in jetrnega trombopoietina, ki pospešujeta nastanek trombocitov (Stone in sod., 2012). Mezouar in sod. (2014) poročajo, da se pri solidnih in hematogenih vrstah novotvorb pri ljudeh poveča število MV iz trombocitov (Mezouar in sod., 2014). Janowska-Wieczorek in sod. (2005) so ugotovili vpliv MV iz trombocitov na povečano proliferacijo pljučnih karcinomskih celic (Janowska-Wieczorek in sod., 2005). Z aktivacijo trombocitov in nastankom MV iz trombocitov pride do sproščanja različnih proangiogenih dejavnikov, kot so VEGF, PDGF, MMP, kar vpliva na hitrejšo rast in zasevanje novotvorb (Rothwell in sod., 2012).

Zaključujemo, da sta patohistološki oceni MCT po Patnaiku in Kiupelu primerljivi in v večini primerov sovpadata s klinično sliko, in da je v povprečju višja številka koncentracija MV pri skupini psov z višjo oceno malignosti in hujšo klinično sliko. Trombocitoza ne korelira s stopnjo malignosti.

5.2.6 Spremljanje številske koncentracije mikroveziklov v izolatih periferne krvi in trombocitov iz periferne krvi pred, med in po začetku zdravljenja mastocitoma

Rezultati kažejo, da je številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi med in po začetku zdravljenja pri večini pacientov nižja v primerjavi s koncentracijo pred zdravljenjem ali s povprečno številsko koncentracijo MV pri psih z MCT (pri pacientih, pri katerih ni podatka o številski koncentraciji MV pred zdravljenjem) ne glede na izbrani način zdravljenja. Številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi je bila višja po zdravljenju pri dveh pacientih z zaporedno številko 2 in 9 ter v primerjavi s povprečno številsko koncentracijo MV pri psih z MCT pri pacientu z zaporedno številko 12, po 10 tednih od začetka zdravljenja. Pri pacientu z zaporedno številko 2 se je številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi povišala za faktor 1,56 štiri tedne po kirurškem zdravljenju v primerjavi s številsko koncentracijo MV pred zdravljenjem in se je za faktor 2 znižala šestnajst tednov po začetku terapije. Dvig številske koncentracije MV je v tem primeru najverjetneje posledica nenatančne metode in posledične variabilnosti koncentracij MV. Manj verjetno je, da bi dvig številske koncentracije MV bil povezan s prisotnostjo tumorskih celic, ki so v telesu ostale po kirurškem posegu, saj je po štirinajstih tednih brez dodatnega zdravljenja nivo koncentracije MV padel pod povprečje števila MV zdravih psov.

Pri pacientu z zaporedno številko 9 se je številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi povišala 5 tednov po začetku zdravljenja s kemoterapijo za faktor 2,2, ko je bil opravljen tudi paliativen kirurški poseg. Pacient je imel že ob prvem obisku na kliniki obsežno, močno nekrotizirajočo maso z zasevki v regionalni bezgavki. Ker paliativno zdravljenje ni bilo uspešno, sklepamo, da je dvig številske koncentracije MV bil povezan z napredovanjem bolezni. Verjetno so prispevali k dvigu skupne številske koncentracije MV tudi MV iz trombocitov, saj je bila številska koncentracija trombocitov že ob prvem odvzemu povišana ($1114 \times 10^9 /l$, ref. $143,3-400 \times 10^9 /l$) in prav tako 5 tednov od začetka zdravljenja ($940 \times 10^9 /l$, ref. $143,3-400 \times 10^9 /l$).

Pri pacientu z zaporedno številko 12 smo prvič izmerili številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi šele 5 tednov po začetku zdravljenja (paliativnega kirurškega posega), in je bila za faktor 2,6 nižja od povprečne številske koncentracije MV skupine psov z MCT. Po 10. tednih od začetka zdravljenja se je številska koncentracija MV povišala za faktor 6. V tem obdobju je

prišlo do ponovitve bolezni in zaradi tega verjetno do dviga številske koncentracije MV. Številska koncentracija trombocitov je bila v referenčnih vrednostih.

Zaključujemo, da je številska koncentracija MV nižja v primerjavi s številsko koncentracijo MV pred zdravljenjem ali s povprečno številsko koncentracijo MV skupine psov z MCT v izolatih periferne krvi pri večini psov po začetku in neodvisno od vrste zdravljenja. Vsekakor je zaradi še nenatančne metode ugotavljanja MV potrebno metodo nadgraditi, da bi bila lahko uporabna v medicinske namene.

6 SKLEPI

1. Anorganski nanodelci TiO_2 ne vplivajo na ukrivljenost membrane eritrocitov in trombocitov in njihove medsebojne interakcije po 1-urni inkubaciji.
2. Anorganski nanodelci TiO_2 ne vplivajo na lastnosti OFM po 20-minutni in 50-minutni inkubaciji.
3. Anorganski nanodelci ZnO ne vplivajo na ukrivljenost membrane eritrocitov in njihove medsebojne interakcije po 1-urni inkubaciji.
4. Anorganski nanodelci ZnO vplivajo na ukrivljenost membrane trombocitov in ne na njihovo medsebojno interakcijo po 1-urni inkubaciji.
5. Anorganski nanodelci ZnO povzročijo pokanje OFM že po 20 minutah, še bolj pa po 50 minutah.
6. Povprečna številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi skupine psov z MCT je višja v primerjavi s skupino zdravih psov in je povezana s histološko stopnjo malignosti, kar dokazuje, da na lastnosti membran vpliva patološko stanje.
7. Številska koncentracija trombocitov v krvi pacientov ne korelira s stopnjo malignosti tumorja in zdravljenjem.
8. Patohistološke metode ocenjevanja malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu so primerljive in višja številska koncentracija MV skupine psov sovпада z višjimi histološkimi ocenami malignosti.
9. Pri skupini psov z MCT z imunohistokemično reakcijo z visokim proliferacijskim indeksom $\text{Ki-67} > 10$ je povprečna številska koncentracija MV višja v primerjavi s proliferacijskim indeksom $\text{Ki-67} < 10$.
10. V skupini psov z MCT z imunohistokemično reakcijo z oceno izražanja KIT receptorja z vzorcem KIT-barvanja II in III je v povprečju višja številska koncentracija MV v primerjavi s skupino psov z vzorcem KIT-barvanja I, kar pomeni, da se pri reakcijah, ki so povezane s slabšo prognozo, v krvi pojavlja višja številska koncentracija MV.
11. Številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi pacientov se zniža pri večini psov po začetku in ne glede na vrsto zdravljenja. Številska koncentracija MV v izolatih periferne krvi bi ob dodatnih meritvah in daljšem spremljanju večjega števila pacientov lahko poleg kliničnih, histoloških in imunohistokemičnih predstavljala napovedni dejavnik v klinični praksi.

7 POVZETEK

V doktorski nalogi smo proučevali morfološke spremembe membrane krvnih celic in orjaških fosfolipidnih mehurčkov (OFM) pod vplivom anorganskih nanodelcev (ND) TiO₂ in ZnO, ki so čedalje bolj prisotni v vsakdanjem življenju tako živali kot ljudi. Naši rezultati vpliva ND TiO₂ in ZnO na morfološke spremembe membrane eritrocitov, trombocitov in OFM so pokazali, da so ND ZnO aktivirali trombocite in povzročili pokanje OFM, niso pa vplivali na eritrocite, medtem ko so eritrociti, trombociti in OFM po inkubaciji z ND TiO₂ ostali morfološko nespremenjeni. Rezultati so bili v skladu s pričakovanji, saj so ND TiO₂ kemijsko bolj stabilni in niso topni za razliko od ND ZnO, kjer se Zn ioni odtapljajo in so zato bolj toksični za biološke sisteme.

V povezavi s spremembo oblike membrane celic smo nadalje ugotavljali vpliv mastocitoma (MCT), najpogostejšega kožnega tumorja pri psih, ki glede na histološko stopnjo malignosti privede do različnega patološkega stanja organizma. Namen naše naloge je bil ugotoviti vpliv MCT različnih stopenj malignosti na morfološke spremembe membrane celic in posledično vezikulabilnost, kar se odraža s sproščanjem mikroveziklov (MV). MV so z membrano obdani celični delci, ki se sproščajo iz vseh tipov celic v zadnji fazi brstenja, še posebej pri aktivnih celicah, pri celicah, ki so izpostavljene škodljivim dejavnikom, apoptotičnih celicah in tumorskih celicah. MV nosijo dele materinskih celic in ko se sproščajo v zunajcelično okolje, lahko vstopajo v telesne tekočine in interagirajo z drugimi, tudi oddaljenimi celicami. Tumorske celice so še posebej nagnjene k vezikulaciji, zato je prenos informacij, ki jih nosijo v sebi, lahko ključnega pomena za napredovanje bolezni. Številsko koncentracijo MV smo izmerili s pretočno citometrijo iz izolatov periferne krvi skupine psov z MCT in jih primerjali s številsko koncentracijo MV skupine zdravih psov.

Rezultati so potrdili našo hipotezo, saj je bila številaska koncentracija MV v izolatih periferne krvi skupine devetih psov z MCT statistično značilno ($p = 0,01$) in za faktor 1,8 višja kot pri kontrolni skupini osmih psov. Dokazali smo razliko v številski koncentraciji MV glede na histološko stopnjo malignosti MCT.

Pri psih s histološko stopnjo malignosti III po Patnaiku smo izmerili za faktor 2,1 višjo povprečno številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi kot pri skupini psov s histološko stopnjo malignosti II. V nalogi smo hkrati dokazali primerljivost dveh patohistoloških ocen malignosti, saj je bila pri vseh pacientih z MCT, ki so bili ocenjeni s stopnjo malignosti II po

Patnaiku, ocena malignosti po Kiupelu nizko malignen tumor, pri pacientih z MCT stopnje malignosti III po Patnaiku pa je bil MCT po Kiupelu ocenjen kot visoko malignen tumor. Ugotovili smo povezavo med številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi skupine psov z MCT in citoplazemskim vzorcem KIT-barvanja. Po vzorcu KIT-barvanja II so se obarvali štirje vzorci, povprečna številsko koncentracija MV skupine teh štirih psov v izolatih periferne krvi je bila za faktor 1,3 višja od povprečne številsko koncentracije MV v izolatih periferne krvi skupine štirih psov z vzorcem KIT-barvanja I. Po vzorcu KIT-barvanja III se je obarval le en vzorec, pri katerem je bila številsko koncentracija za faktor 1,1 višja od povprečne številsko koncentracije MV v izolatih periferne krvi od skupine psov z vzorcem KIT-barvanja II.

Zabeležili smo povezavo med proliferacijskim indeksom Ki-67 in številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi skupine psov z MCT. Povprečna številsko koncentracija MV v skupini petih psov z MCT s proliferacijskim indeksom Ki-67 > 10, je bila za faktor 1,3 višja kot v skupini štirih psov z MCT s proliferacijskim indeksom Ki-67 < od 10.

Ugotovili smo tudi, da je številsko koncentracija MV v izolatih periferne krvi psov z MCT višja pri psih z višjimi kliničnimi ocenami malignosti. V naši raziskavi so bili štirje MCT z ulcerirano in/ali nekrotizirano površino, izmed teh so bili trije MCT ocenjeni kot histološka stopnja malignosti III po Patnaiku in kot MCT visoke stopnje malignosti po Kiupelu. Dva pacienta od teh štirih sta imela določen klinični stadij 2. MCT z ulcerirano in/ali nekrotizirano površino so imeli več histoloških kriterijev malignosti. Številsko koncentracija trombocitov je bila pri večini psov z MCT znotraj referenčnih vrednosti in ni korelirala s stopnjo malignosti MCT.

Primerjali smo številsko koncentracijo MV v izolatih periferne krvi psov z MCT pred in po zdravljenju ter ugotovili, da se je večini psov znižala številsko koncentracija MV po začetku zdravljenja ne glede na izbor zdravljenja. Pri treh pacientih nismo izmerili številsko koncentracije MV pred zdravljenjem, zato smo primerjali številsko koncentracijo MV po zdravljenju s povprečno številsko koncentracijo MV skupine psov z MCT in ugotovili, da je po zdravljenju bila nižja. Pri enem pacientu s povišano številsko koncentracijo MV takoj po zdravljenju zdravljenje že od samega začetka ni bilo uspešno in je MCT hitro napredoval.

8 SUMMARY

In the thesis, we investigated morphological changes of cells and giant phospholipid vesicles (GPVs) under the influence of inorganic nanoparticles (NPs) of TiO₂ and ZnO, which are ever more present in the daily life of animals and humans. Our results considering the influence of NPs of TiO₂ and ZnO on the morphological changes of membranes of red blood cells, platelets and GPVs showed that NPs of ZnO activated platelets and caused bursting of GPVs, but had no effect on red blood cells, while blood cells, platelets and GPVs morphologically remained the same after incubation with NPs of TiO₂. The results were in accordance with our expectations, since NPs of TiO₂ are chemically more stable and insoluble unlike NPs of ZnO, where Zn ions dissolve and are therefore more toxic for biological systems.

We then explored the cell membrane changes under the influence of mast cell tumour (MCT), the most common skin tumour in dogs, which leads to different pathological conditions in the organism depending on its histological grade of malignancy. The aim of our study was to determine the influence of MCTs of different grades of malignancy on the morphological changes of cell membranes and consequently their vesiculability, which is reflected in the release of microvesicles (MVs). MVs are membrane-enclosed cell particles, which are shed from all types of cells in the last stage of budding, especially in activated cells, cells exposed to adverse factors, apoptotic cells and tumour cells. MVs carry parts of the cells they originate from and after they are shed into the extracellular environment, they can enter body fluids and interact with other, even distant cells. Tumour cells are especially prone to vesiculation, thus probably making the carried information of crucial importance for the progression of the disease. The concentration of MVs in isolates from peripheral blood from the group of dogs with MCT was measured by using flow cytometry and compared with the concentration of MVs from the group of healthy dogs.

The results confirmed our hypothesis, since the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of the group of thirteen dogs with MCT was statistically significant ($p = 0.01$) and 1.8-times higher than in the control group of eight dogs. We proved that the concentration of MVs differed between histological grades of malignancy of MCT. In dogs with MCTs being Patnaik grade III, we measured a 2.1-times higher average concentration of MVs in isolates from peripheral blood than in the group of dogs with MCTs being Patnaik grade II. In our research, we also demonstrated that the two systems of pathohistological grading of malignancy

are comparable, since in all the patients with MCTs being Patnaik grade II, they were determined as low-grade tumours using the Kiupel grading system; while in the patients with MCTs being Patnaik grade III, they were determined as high-grade tumours using the Kiupel grading system.

We identified a correlation between the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs with MCT and the KIT-staining pattern. Four samples had KIT-staining pattern II and the average concentration of MVs in isolates from peripheral blood of these four dogs was 1.3-times higher than the average concentration of MVs in isolates from peripheral blood of four dogs with KIT-staining pattern I. Only one sample had KIT-staining pattern III and the concentration of MVs was 1.1-times higher than the average concentration of MVs in isolates from peripheral blood of the group of dogs with KIT-staining pattern II.

A correlation was noted between the proliferative index Ki-67 and the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs with MCT. The average concentration of MVs in the group of five dogs with MCT with a proliferative index Ki-67 > 10 was 1.3-times higher than in the group of four dogs with MCT with a proliferative index Ki-67 < 10.

It was also established that isolates from the peripheral blood of dogs, which have MCTs with a more aggressive clinical behaviour, have a higher concentration of MVs. In our study, four MCTs were ulcerated and/or had a necrotic surface, three among them were graded as MCTs being Patnaik grade III and as high-grade MCTs using the Kiupel grading system. Two of the four patients were evaluated as clinical stage 2. MCTs with an ulcerated and/or necrotic surface had more histological criteria of malignancy. In most of the dogs with MCT the concentration of platelets was in reference ranges and it did not correlate with the grade of malignancy of MCT.

We compared the concentration of MVs in isolates from peripheral blood of dogs with MCT before and after treatment and observed that in most of the dogs the concentration of MVs declined after treatment, regardless of the type of treatment. We did not measure the concentration of MVs before treatment in three patients, therefore we compared the concentration of MVs after treatment with the average concentration of MVs from the group of dogs with MCT, and noted that it was lower after treatment. Treatment was not successful from the very beginning in one patient who had an elevated concentration of MVs immediately after treatment and the MCT rapidly progressed.

9 ZAHVALE

Doktorsko delo je nastalo v Laboratoriju za klinično biofiziko, Inštituta za biofiziko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Laboratoriju za klinično biofiziko Zdravstvene fakultete Univerze v Ljubljani, na Veterinarski fakulteti v Ljubljani, PRVI-K, kliniki za male živali v Ljubljani. Del doktorske naloge je bil narejen na Department of Biosciences, Biocity, Abo Akademi University v Abo/Turku na Finskem.

Zahvaljujem se vodjem ustanov, prof. ddr. Alešu Igliču, univ. dipl. fiz., vodji Laboratorija za klinično biofiziko, prof. dr. Alenki Nemeč Svete, univ. dipl. inž. kem. inž., vodji Diagnostičnega laboratorija Klinike za male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani in dr. Pavu Zaninoviću, vodji PRVE-K, klinike za male živali v Ljubljani, ker so mi omogočili delo na njihovih ustanovah.

Mentorici, prof. dr. Nataši Tozon, se zahvaljujem za mentorstvo, podporo, pomoč pri izvedbi kliničnega dela študije in zaupanje.

Somentorici, prof. dr. Veroniki Kralj - Iglič, se zahvaljujem za vodenje, vso potrpežljivost in zaupanje, predvsem pa za spoznanje, da je biofizika tista, ki omogoča razumevanje medicine.

Zahvala doc. dr. Tanji Švara z Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani za pomoč pri patohistološki diagnostiki in imunohistokemični oceni mastocitomov. Tanja, hvala za vso vzpodbudo, pomoč in pozitivno kritiko in da si mi bila ves čas v veliko oporo.

Dr. Romanu Štuklju in Lei Juditi Krek, hvala za pomoč pri določanju številske koncentracije mikroveziklov s pomočjo pretočnega citometra.

Hvala dr. Vidu Šuštarju in doc. dr. Henryu Hagerstrandu iz Department of Biosciences, Abo Akademi University v Abo/Turku na Finskem za sodelovanje pri slikanju vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

Prof. Darku Makovcu in sodelavcem iz Odseka za sintezo materialov Inštituta Jožef Štefan, hvala za karakterizacijo suspenzij nanomaterialov in strokovno razlago.

Hvala sodelavcem iz Laboratorija za biofiziko Fakultete za elektrotehniko in skupini za nanobiologijo in nanotoksikologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani za sodelovanje pri eksperimentih z orjaškimi fosfolipidnimi mehurčki.

Hvala tehnikom PRVE-K, obema Andrejema in Sari ter njihovim psom, za darovanje krvnih vzorcev, Petru za računalniško pomoč in kolegu, sodelavcu Emirju Mujagiću, za vso podporo.

Tehnikom in laborantu Klinike za male živali, hvala za pomoč pri jemanju vzorcev ter iskanju in urejanju kartotek.

Hvala dr. Darji Pavlin, dr. Alenki Nemeč Svete, dr. Barbari Drašler in dr. Sari Novak za nasvete in predloge, ki so prispevali k izboljšanju naloge.

Hvala vsem lastnikom in njihovim psom za darovanje krvi.

Zahvala dr. Mateji Gaber za hitro lektoriranje slovenskega in mag. Julijani Mary Dolenšek Vode za lektoriranje angleškega besedila.

Mag. Brigiti Grecs - Smole hvala za pomoč pri urejanju literature, Stanki Ujc in Slavici Sekulić hvala za pomoč pri iskanju člankov.

Iskrena zahvala dr. Pavu Zaninoviću, ki me je vodil in mi omogočil izpolniti sanje.

Hvala Tadeju, mojemu dragemu sopotniku, ki me je potrpežljivo poslušal, vzpodbujal in mi stal ob strani. Hvala moji Ivi, ki je vpihnila veter v moja jadra življenja in zaradi katere nisem obupala.

Hvala Vidi, ki je s srcem čuvala Ivo, ko sem se posvečala nalogi. Hvala za podporo tudi Tadejevemu očetu in bratu Robiju ter njegovi družini, da so mi omogočili ure, ki sem jih namenila pisanju naloge.

Hvala mojemu velikemu bratu Bubiju, ki je vedno našel pravo besedo zame, me znal razvedriti in je od nekdaj verjel vame.

Mama in tata, hvala za vso ljubezen in skrb, za vse kar sta mi dala in omogočila. Hvala, ker sta me vpeljala v svet veterinarske medicine, zaradi vaju sem to, kar sem.

10 LITERATURA

1. Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 215(11): 1629–34.
2. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 2007; 179(3): 1969–78.
3. Aisaka Y, Kawaguchi R, Watanabe S, Ikeda M, Igisu H. Hemolysis caused by titanium dioxide particles. *Inhal Toxicol* 2008; 20: 891–3.
4. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008; 10(5): 619–24.
5. Al-Sarraf, Mauldin GN, Patnaik AK, Meleo KA. A prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumors in 32 dogs. *J Vet Intern Med* 1996; 10(6): 376–8.
6. Albanese A, Chan WC. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano* 2011; 5(7): 5478–89.
7. Ambrožič A, Čučnik S, Tomšič N, et al. Interaction of giant phospholipid vesicles containing cardiolipin and cholesterol with β 2-glycoprotein-I and anti- β 2-glycoprotein-I antibodies. *Autoimmun Rev* 2006; 6: 10–5.
8. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 2002; 195(10): 1303–16.
9. Andreu Z, Yanez - Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 2014; 5: e1–12.
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00442/full> (februar, 2016)
10. Angelova MI, Dimitrov DS. Liposome electroformation. *Faraday Discuss Chem Soc* 1986; 81: 303–11.
11. Asharani PV, Sethu S, Vadukumpully S, et al. Investigations on the structural damage in human erythrocytes exposed to silver, gold, and platinum nanoparticles. *Adv Funct Mater* 2010; 20(8): 1233–42.

12. Aula S, Lakkireddy S, Swamy AV, et al. Biological interactions in vitro of zinc oxide nanoparticles of different characteristics. *Mater Res Exp* 2014; 1(3): e035041.
<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/2053-1591/1/3/035041/pdf> (januar, 2016)
13. Baeza A, Ruiz - Molina D, Vallet - Regí M. Recent advances in porous nanoparticles for drug delivery in antitumoral applications: inorganic nanoparticles and nanoscale metal-organic frameworks. *Expert Opin Drug Deliv* 2016; 9: e1–14.
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17425247.2016.1229298> (januar, 2016)
14. Bagatolli LA, Parasassi T, Gratton E. Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods: a two photon fluorescence microscopy study. *Chem Phys Lipids* 2000; 105: 135–47.
15. Baj - Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Zembala M. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumor cells and transfer some of these determinants to monocytes.
Cancer Immunol Immunother 2006; 55(7): 808–18.
16. Baj - Krzyworzeka M, Szatanek R, Węglarczyk K, Baran J, Zembala M. Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes.
Immunol Lett 2007; 113(2): 76–82.
17. Balaj L, Lessard R, Dai L, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2011; 2: e180 (9 str.)
<http://www.nature.com/ncomms/journal/v2/n2/full/ncomms1180.html> (februar, 2016).
18. Banaszak - Holl MM. Nanotoxicology: a personal perspective.
Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2008; 1(4): 353–9.
19. Baran J, Baj - Krzyworzeka M, Weglarczyk K, et al. Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients.
Cancer Immunol Immunother 2010; 59(6): 841–50.
20. Baumgart T, Hunt G, Farkas ER, Webb WW, Feigenson GW. Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes.
Biochim Biophys Acta 2007; 9: 2182–94.
21. Belehradek M, Domenge C, Luboinski B, Orłowski S, Belehradek J, Mir LM. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical phase I-II trial.
Cancer 1993; 72(12): 3694–700.

22. Bivas I, Hanusse P, Bothorel P, Lalanne J, Aguerre - Chariol O. An application of the optical microscopy to the determination of the curvature elastic modulus of biological and model membranes. *J Physiol Paris* 1987; 48: 855–67.
23. Bivas I. Shape fluctuations of nearly spherical lipid vesicles and emulsion droplets. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2010; 81(6): 61911.
24. Blackwood L, Murphy S, Buracco P, et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet Comp Oncol* 2012; 10 (3): e1–29.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x/full>
(februar, 2016).
25. Boissan M, Feger F, Guillosson JJ, Arock M. C-kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematologic diseases. *J Leukoc Biol* 2000; 67(2): 135–48.
26. Book AP, Fidel J, Wills T, Bryan J, Sellon, Mattoon J. Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumours. *Vet Radiol Ultrasound* 2011; 52: 548–54.
27. Borm P, Klaessig FC, Landry TD, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicol Sci* 2006; 90(1): 23–32.
28. Bostock D. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract* 1973; 14: 27–40.
29. Bostock DE. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br Vet J* 1986; 142(1): 1–19.
30. Bostock DE, Crocker J, Harris K, Smith P. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer* 1989; 59: 915–8.
31. Bottsford - Miller J, Choi HJ, Dalton HJ, et al. Differential platelet levels affect response to taxane-based therapy in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21(3): 602–10.
32. Böckmann J, Lahl H, Eckert T, Unterhalt B. Blood titanium levels before and after oral administration of titanium dioxide. *Pharmazie* 2000; 55: 140–3.

33. Bronden LB, Eriksen T, Kristensen AT. Mast cell tumours and other skin neoplasia in Danish dogs: data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Vet Scand* 2010; 52: e6 (6 str.) <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-52-6> (februar, 2016)
34. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14(1): 111–36.
35. Brunner TJ, Wick P, Manser P, et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol* 2006; 40(14): 4374–81.
36. Buerki - Thurnherr T, Xiao L, Diener L, et al. In vitro mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology* 2013; 7(4): 402–16.
37. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 2010; 78(9): 838–48.
38. Canham PB. The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *J Theor Biol* 1970; 26(1): 61–81.
39. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(7): 2050–5.
40. Chaffin K, Thrall DE. Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43(4): 392–5.
41. Chang YN, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* 2012; 5: 2850–71.
42. Chen Y, Bothun GD. Cationic gel-phase liposomes with “decorated” anionic SPIO nanoparticles: morphology, colloidal, and bilayer properties. *Langmuir* 2011; 27(14): 8645–52.
43. Chen KL, Bothun GD. Nanoparticles meet cell membranes: probing nonspecific interactions using model membranes. *Environ Sci Technol* 2014; 48(2): 873–80.
44. Chiang HS, Swaim MW, Huang TF. Characterization of platelet aggregation induced by human colon adenocarcinoma cells and its inhibition by snake venom peptides, trigramin and rhodostomin. *Br J Haematol* 1994; 87: 325–31.

45. Choi DY, You S, Jung JH, et al. Extracellular vesicles shed from gefitinib-resistant nonsmall cell lung cancer regulate the tumor microenvironment. *Proteomics* 2014; 14: 1845–56.
46. Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, Li JP, Belting M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 17380–5.
47. Cocucci E, Racchetti G, Maldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 43–51.
48. Cohen D, Reif JS, Brodey RS, Keiser H. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res* 1974; 34: 2859–68.
49. Colvin V. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol* 2003; 13: 1166–70.
50. Cooper M, Tsai XR, Bennett P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 196–206.
51. Crowe DT, Goodwin MA, Greene CE. Total laryngectomy for laryngeal mast cell tumor in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1986; 22: 809–16.
52. Dahiya R, Boyle B, Goldberg BC, et al. Metastasis-associated alterations in phospholipids and fatty acids of human prostatic adenocarcinoma cell lines. *Biochem Cell Biol* 1992; 70(7): 548–54.
53. Davies DR, Wyatt KM, Jardine JE, Robertson ID, Irwin PJ. Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40(2): 124–30.
54. Dear JW, Street JM, Bailey MA. Urinary exosomes: a reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling. *Proteomics* 2013; 13(10/11): 1572–80.
55. De Luca L, D’Arena G, Simeon V, Trino S, et al. Characterization and prognostic relevance of circulating microvesicles in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2016; 14: 1–9.
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10428194.2016.1243790?journalCode=ilal20> (februar, 2016)

56. Deb S, Patra HK, Lahiri P, Dasgupta AKR, Chakrabarti K, Chaudhuri U. Multistability in platelets and their response to gold nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2011; 7(4): 376–84.
57. Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44(4): 231.
58. Diamant M, Nieuwland R, Pablo R. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106(19): 2442–7.
59. Dimova R, Aranda S, Bezlyepkina N, Nikolov V, Riske KA, Lipowsky R. A practical guide to giant vesicles, probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *J Phys Condens Matter* 2006; 18: 1151–76.
60. Docter D, Westmeier D, Markiewicz M, Stolte S, Knauer SK, Stauber RH. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned—challenge accepted?. *Chem Soc Rev* 2015; 44(17): 6094–121.
61. Drašler B, Drobne D, Novak S, et al. Effects of magnetic cobalt ferrite nanoparticles on biological and artificial lipid membranes. *Int J Nanomed* 2014; 9: 1559–81.
62. Drobne D, Kralj Igljč V. Lipid membranes as tools in nanotoxicity studies. In: Leitmannova Liu A, Igljč A, eds. *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Amsterdam : Elsevier, 2009: vol. 10: 121–34.
63. Döbereiner HG. Properties of giant vesicles. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2000; 5(3/4): 256–63.
64. Downing S, Chien MB, Kass PH, Moore PE, London CA. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63(12): 1718–23.
65. Egan K, Crowley D, Smyth P, et. al. Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signalling in ovarian cancer cells. *PLoS One* 2011; 6(10): e26125 (13 str.)
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026125>
(februar, 2016).
66. Elsaesser A, Howard CV. Toxicology of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 129–37.

67. Endicott MM, Charney SC, McKnight JA, Loar AS, Barger AM, Bergman PJ. Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999–2002). *Vet Comp Oncol* 2007; 5(1): 31–7.
68. Farrera C, Fadeel B. It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 95A: 3–12.
69. Feng D, Zhao WL, Ye YY, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 2010; 11(5): 675–87.
70. Fenger JM, Bear MD, Volinia S, et al. Overexpression of miR-9 in mast cells is associated with invasive behavior and spontaneous metastasis. *BMC Cancer* 2014; 14: e84 (16 str.) <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/84> (februar, 2016)
71. Finnie JW, Bostock DE. Skin neoplasia in dogs. *Aust Vet J* 1979; 55: 602–4.
72. Fink M, Černelč P, Pajič T. Determination of D816V mutation in the c-Kit gene in the Slovenian patients with acute myeloid leukemia and systemic mastocytosis. *Zdrav Vestn* 2012; 81(11): 168–73..
73. Finora K, Leibman NF, Fettman MJ, Powers BE, Hackett TA, Withrow SJ. Cytological comparison of fine-needle aspirates of liver and spleen of normal dogs and of dogs with cutaneous mast cell tumours and an ultrasonographically normal appearing liver and spleen. *Vet Comp Oncol* 2006; 4: 178–83.
74. Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci* 2011; 124(3): 447–58.
75. Fonseca P, Vardaki I, Occhionero A, Panaretakis T. Metabolic and signaling functions of cancer cell-derived extracellular vesicles. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016; 326: 175–99.
76. Fox LE. Mast cell tumors. In: Morrison WB, ed. *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management*. 2nd ed. Jackson : Teton New Media, 2002: 451–9.
77. Frimberger AE, Moore AS, LaRue SM, Gliatto JM, Bengtson AE. Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumors in the dog: 37 cases (1989–1993). *J Am Anim Hosp Assoc* 1997; 33(4): 320–4.
78. Fröhlich E. Action of nanoparticles on platelet activation and plasmatic coagulation. *Curr Med Chem* 2016; 1: 23(5): 408–30.
79. Fu PP, Xia Q, Hwang HM, Ray PC, Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal* 2014; 22(1): 64–75.

80. Fujishima A, Zhang X, Tryk DA. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surf Sci Rep* 2008; 63 (12): 515–82.
81. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 2003; 177: 437–47.
82. Giantin M, Aresu L, Benali S, et al. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. *J Comp Pathol* 2012; 147(4): 419–29.
83. Gimsa J, Ried C. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? *Mol Membr Biol* 1995; 12(3): 247–54.
84. Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, et al. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res* 1998; 18(5A): 3433–7.
85. Ginzburg VV, Balijepailli S. Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes. *Nano Lett* 2007; 7(12): 3716–22.
86. Golden A, Brugge JS, Shattil SJ. Role of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in agonist-induced tyrosine phosphorylation of platelet proteins. *J Cell Biol* 1990; 111(6): 3117–27.
87. Grange C, Tapparo M, Collino F, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastasis niche. *Cancer Res* 2011; 74: 5346–56.
88. Graves LE, Ariztia EV, Navari JR, Matzel HJ, Stack MS, Fishman DA. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res* 2004; 64(19): 7045–9.
89. Gräfe C, Weidner A, Lühe MV, et al. Intentional formation of a protein corona on nanoparticles: serum concentration affects protein corona mass, surface charge, and nanoparticle-cell interaction. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 75: 196–202.
90. Gregory - Bryson E, Bartlett E, Kiupel M, Hayes S, Yuzbasiyan - Gurkan V. Canine and human gastrointestinal stromal tumors display similar mutations in c-KIT exon 11. *BMC Cancer* 2010; 10: e559 (9 str.)
<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-559> (februar, 2016)

91. Greish K, Thiagarajan G, Herd H, et al. Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology* 2012; 6(7): 713–23.
92. Grgić M, Novaković S. Določanje mutacij v genih c-KIT in PDGFRA pri bolnikih z gastrointestinalnimi stromalnimi tumorji. *Onkologija* 2014; 18(1): 9–12, 72.
93. György B, Szabó TG, Turiák L, et al. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One* 2012; 7(11): e49726.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049726> (februar, 2016)
94. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 2008; 22(6): 1301–9.
95. Hahn A, Fuhlrott J, Loos A, Barcikowski S. Cytotoxicity and ion release of alloy nanoparticles. *J Nanopart Res* 2012; 14: e686 (10 str.)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3309564> (februar, 2016)
96. Hägerstrand H, Isomaa B. Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1992; 1109(2):117–26.
97. Heidemann RS. The cell. In: Klein BG, ed. *Cunningham's textbook of veterinary physiology*. 5th ed. St. Louis : Elsevier Health Science, 2013: 1–45.
98. Helley D, Banu E, Bouziane A, et al. Platelet microparticles: a potential predictive factor of survival in hormone-refractory prostate cancer patients treated with docetaxel-based chemotherapy. *Eur Urol* 2009; 56: 479–84.
99. Heller G, Fong KM, Girard L, et al. Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene* 2006; 25(6): 959–68.
100. Heller G, Geradts J, Ziegler B, et al. Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 103(3): 283–91.
101. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279(5350): 577–80.
102. Hong SP, Leroueil PR, Janus EK, et al. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug Chem* 2006; 17(3): 728–34.

103. Hosoya K, Kisseberth WC, Alvarez FJ, et al. Adjuvant CCNU (lomustine) and prednisone chemotherapy for dogs with incompletely excised grade 2 mast cell tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009; 45(1): 14–8.
104. Hottendorf GH, Nielsen SW. Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. *Zentralblatt Veterinärmed A* 1967; 14: 272–81.
105. Huang S, Chueh PJ, Lin YW, Shih TS, Chuang SM. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano TiO₂ long-term exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 241: 182–94.
106. Huang CC, Aronstam RS, Chen DR, Huang YW. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 45–55.
107. Huang H, Lai W, Cui M, et al. An evaluation of blood compatibility of silver nanoparticles. *Sci Rep* 2016; 6: e25518. <http://www.nature.com/articles/srep25518> (februar, 2017)
108. Huber V, Fais S, Iero M, et al. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005; 128(7): 1796–804.
109. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 22–7.
110. Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Bergamaschi A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur Rev Med Pharmacol* 2011; 15: 481–508.
111. Ikonen E, Simons K. Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9(5): 503–9.
112. Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns. *Nanomedicine* 2013; 8(6): 969–81.
113. Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials: past, present and future. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016; 299: 70–7.
114. Inal JM, Ansa - Addo EA, Stratton D, et al. Microvesicles in health and disease. *Arch Immunol Ther Exp* 2012; 60(2): 107–10.

115. Inal JM, Fairbrother U, Heugh S. Microvesiculation and disease. *Biochem Soc Trans* 2013; 41: 237–40.
116. Ivask A, Titma T, Visnapuu M, et. al. Toxicity of 11 metal oxide nanoparticles to three mammalian cell types in vitro. *Curr Top Med Chem* 2015; 15(18): 1914–29.
117. Iwata N, Ochia K, Kaosawa T, Takiguchi M, Umemura T. Canine extracutaneous mast cell tumours consisting of connective tissue mast cell. *J Comp Pathol* 2000; 123: 306–10.
118. Jaeger A, Weiss DG, Jonas I. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology* 2012; 296: 27–36.
119. Janowska - Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005; 113(5): 752–60.
120. Jansa R, Sustar V, Frank M, et al. Number of microvesicles in peripheral blood and ability of plasma to induce adhesion between phospholipid membranes in 19 patients with gastrointestinal diseases. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41(1): 124–32.
121. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2006; 41(12): 2699–711.
122. Keller S, Ridinger J, Rupp AK, Janssen JW, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med* 2011; 9: e86 (9 str.)
<https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-9-86>
(februar, 2016)
123. Khanna P, Ong C, Bay BH, Baeg GH. Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials* 2015; 5: 1163–80.
124. Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res* 2002; 62(21): 6312–7.
125. Kim HK, Song KS, Park YS, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003; 39(2): 184–91.
126. Kitture R, Chordiya K, Gaware S, et al. ZnO nanoparticles-red sandalwood conjugate: A promising anti-diabetic agent. *J Nanosci Nanotechnol* 2015; 15(6): 4046–51.

127. Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Pathol* 2004; 41: 371–7.
128. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol* 2011; 48(1): 147–55.
129. Kodre V, Cemazar M, Pecar J, Sersa G, Cör A, Tozon N. Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. *In Vivo* 2009; 23(1): 55–62.
130. Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, et al. Purification, characterisation and biological significance of tumor-derived exosome. *Anticancer Res* 2005; 25: 3703–7.
131. Koliha N, Heider U, Ozimkowski T, Wiemann M, Bosio A, Wild S. Melanoma affects the composition of blood cell-derived extracellular vesicles. *Front Immunol* 2016; 26(7): e82. (12 str.) <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00282/full> (februar, 2016)
132. Kononenko V, Narat M, Drobne D. Nanoparticle interaction with the immune system. *Arh Hig Rada Toksikol* 2015; 66(2): 97–108.
133. Kozelskaya AI, Panin AV, Khlusov IA, et al. Morphological changes of the red blood cells treated with metal oxide nanoparticles. *Toxicol Vitro* 2016; 37: 34–40.
134. Krahwinkel DJ Jr. Cryosurgical treatment of skin diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1980; 10: 787–801.
135. Kralj - Igljic V, Gomiscek G, Majhenc J, Arrigler V, Svetina S. Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Aspects* 2001; 181: 315–8.
136. Kralj - Igljic V, Veranič P. Curvature-induced sorting of bilayer membrane constituents and formation of membrane rafts. In: Leitmannova Liu A, eds. *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Amsterdam : Elsevier, 2007; vol. 5: 129–49.
137. Kralj - Igljic V. Stability of membranous nanostructures: a possible key mechanism in cancer progression. *Int J Nanomed* 2012; 7: 3579–96.
138. Krek JL, Šimundič M, Drab M, et al. Effect of carbon black nanomaterial on canine erythrocyte and platelet shape. *Slov Vet Res* 2015; 52(2): 75–85.

139. Kumar V, Sharma A. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Mol Immunol* 2010; 48(1/3): 14–25.
140. LaDue T, Price GS, Dodge R, Page RL, Thrall DE. Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 1998; 39(1): 57–62.
141. Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer-the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 455–67.
142. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet* 2012; 15: 125–34.
143. Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E, Montermini L, Meehan B, Rak J. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 451(2): 295–301.
144. Lee YK, Choi EJ, Webster TJ, Kim SH, Khang D. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *J Nanomed* 2014; 10: 97–113.
145. Leibman NF, Lana SE, Hansen RA, Powers BE, Fettman MJ, Withrow SJ. Identification of matrix metalloproteinases in canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 2000; 14(6): 583–6.
146. Leroueil PR, Hong S, Mecke A, Baker JR Jr, Orr BG, Banaszak Holl MM. Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology present a Janus face? *Acc Chem Res* 2007; 40(5): 335–42.
147. Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, et al. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Lett* 2008; 8(2): 420–4.
148. Letard S, Yang Y, Hanssens K, et al. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Mol Cancer Res* 2008; 6(7): 1137–45.
149. Li SQ, Zhu RR, Zhu H, et al. Nanotoxicity of TiO₂ nanoparticles to erythrocyte in vitro. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(12): 3626–31.
150. Li S, Malmstadt N. Deformation and poration of lipid bilayer membranes by cationic nanoparticles. *Soft Matter* 2013; 9(20): 4969–76.

151. Li N. Platelets in cancer metastasis: to help the villain to do evil.
Int J Cancer 2016; 138(9): 2078–87.
152. Lin TY, London CA. A functional comparison of canine and murine bone marrow derived cultured mast cells. Vet Immunol Immunopathol 2006; 114(3/4): 320–34.
153. Lin TY, Rush LJ, London CA. Generation and characterization of bone marrow-derived cultured canine mast cells. Vet Immunol Immunopathol 2006; 113(1/2): 37–52.
154. Lin X, Li J, Ma S, Liu G et al. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Escherichia coli*: effects of particle size, crystal phase and water chemistry. PloS One 2014; 9(10): e110247 (8 str.) <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110247> (februar, 2016)
155. Lipowsky R. The conformation of membranes. Nature 1991; 349: 475–85.
156. Lipowsky R, Dobereiner HG. Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. Europhys Lett 1998; 43(2): 219–25.
157. Lodish HF, Rothman JE. The assembly of cell membranes. Sci Am 1979; 240(1): 48.
158. London CA, Kisseberth WC. Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. J Comp Pathol 1996; 115(4): 399–414.
159. London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu ZQ, Helfand SC, Geissler EN. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. Exp Hematol 1999; 27(4): 689–97.
160. London CA, Seguin B. Mast cell tumors in the dog. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003; 33(3): 473–89.
161. London CA, Malpas PB, Wood - Follis SL, et al. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. Clin Cancer Res 2009; 15(11): 3856–65.
162. Lowe R, Gavazza A, Impellizeri JA, Soden DM, Lubas G. The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. Vet Comp Oncol 2016 Mar 22 – online published first <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vco.12217/abstract;jsessionid=D30627718187B546FD46F660E098A5EC.f04t03> (februar, 2016)

163. Lucroy MD, Edwards BF, Madewell BR. Veterinary photodynamic therapy. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 1745–51.
164. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(38): 14265–70.
165. Lv MM, Zhu XY, Chen WX, et al. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumor Biol* 2014; 35(11): 10773–9.
166. Machado LE, Pinho JR, Sitnik R, et al. The detection of KIT mutations in acute myeloid leukemia. *Einstein (São Paulo)* 2012; 10(3): 286–91.
167. Maglennon GA, Murphy S, Adams V, et al. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2008; 6(4): 268–74.
168. Manivasagam G, Dhinasekaran D, Rajamanickam A. Biomedical implants: corrosion and its prevention: a review. *Recent Pat Corrosion Sci* 2010; 2: 40–54.
169. Martins V, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived micrvesicles as carriers of molecular information in cancer. *Curr Opin Oncol* 2013; 25: 66–75.
170. Mavcic B, Babnik B, Igljic A, Kanduser M, Slivnik T, Kralj - Igljic V. Shape transformation of giant phospholipid vesicles at high concentrations of C12E8. *Bioelectrochemistry* 2004; 63(1):183–8.
171. McConnell RE, Higginbotham JN, Shifrin DA, Tabb DL, Coffey RJ, Tyska MJ. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J Cell Biol* 2009; 185: 1285–98.
172. McNiel EA, Prink AL, O'Brien TD. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. *Vet Comp Oncol* 2006; 4(1): 2–8.
173. Mecke A, Majoros IJ, Patri AK, Baker JR, Holl MMB, Orr BG. Lipid bilayer disruption by polycationic polymers: the roles of size and chemical functional group. *Langmuir* 2005; 21(23): 10348–54.
174. Mederle O, Mederle N, Bocan EV, Ceaușu R, Raica M. VEGF expression in dog mastocytoma. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2010; 114(1): 185–8.

175. Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1): 327–37.
176. Mestdagh P, Feys T, Bernard N, et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: e143. <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkn725> (februar, 2016)
177. Mezouar S, Mege D, Darbousset R, et al. Involvement of platelet-derived microparticles in tumor progression and thrombosis. *Semin Oncol* 2014; 41(3): 346–58.
178. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 40: 41–5.
179. Mir LM, Orlowski S. Mechanisms of electrochemotherapy. *Adv Drug Deliver Rev* 1999; 35: 107–18.
180. Miranda KC, Bond DT, McKee M, et al. Nucleic acids within urinary exosomes are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int* 2010; 78 (2): 191–9.
181. Miyamoto M, Sasakawa S, Ozawa T, Kawaguchi H, Ohtsuka Y. Mechanisms of blood coagulation induced by latex particles and the roles of blood cells. *Biomaterials* 1990; 11(6): 385–8.
182. Mocan T. Hemolysis as expression of nanoparticles-induced cytotoxicity in red blood cells. *Biotechnol Mol Biol Nanomed* 2013; 1(1): 7–12.
183. Moghadam BY, Hou WC, Corredor C, Westerhoff P, Posner JD. Role of nanoparticle surface functionality in the disruption of model cell membranes. *Langmuir* 2012; 28(47): 16318–26.
184. Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 2012; 7(2): 779–86.
185. Moore LE, Garrett LD, Debey B, et al. Spinal mast cell tumor in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 2001; 38: 67–70.
186. Mrvar-Brečko A, Šustar V, Janša V et al. Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope. *Blood Cells Mol Dis* 2010; 44(4): 307–12.

187. Mullins MN, Dernell WS, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Thamm DH, Lana SE. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228(1): 91–5.
188. Muralidharan - Chari V, Clancy J, Plou C, et al. ARF6-regulated shedding of tumor-cell derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 2009; 19: 1875–85.
189. Muralidharan - Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D Souza- Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 2010; 123: 1603–11.
190. Murrow L, Debnath J. ATG12–ATG3 connects basal autophagy and late endosome function. *Autophagy* 2015; 11(6): 961–2.
191. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release* 2013; 166(2): 182–94
192. Naseroleslami M, Parivar K, Khoei S, Aboutaleb N. Magnetic resonance imaging of human-derived amniotic membrane stem cells using PEGylated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cell J* 2016; 18(3): 332–9.
193. Nel AE, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 2009; 8(7): 543–57.
194. Nemmar A, Yuvaraju P, Beegam S, et al. In vitro platelet aggregation and oxidative stress caused by amorphous silica nanoparticles. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2015; 7(1):27–33.
195. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 823–39.
196. Ogorevc E, Štukelj R, Bedina - Zavec A, et al. A 32 month follow-up study of concentration of nanovesicles in isolates from blood in 12 patients treated with imatinib due to gastrointestinal stromal tumor. *Biochem Soc Trans* 2013; 41(1): 303–8.
197. Ohno S, Ishikawa A, Kuroda M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 398–401.
198. O’Keefe DA. Canine mast cell tumours. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990; 20: 1105–15.

199. Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry A* 2010; 77(6): 502–14.
200. Ortlieb M. White giant or white dwarf?: particle size distribution measurement of TiO₂. *GIT Lab J Eur* 2010; 14(9/10): 42–3.
201. Osmond MJ, McCall MJ. Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology* 2010; 4(1): 15–41.
202. Ozaki K, Yamagami T, Nomura K, Narama I. Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. *Vet Pathol* 2002; 39(5): 557–64.
203. Pajnič M, Drašler B, Šuštar V, et al. Effect of carbon black nanomaterial on biological membranes revealed by shape of human erythrocytes, platelets and phospholipid vesicles. *J Nanobiotechnol* 2015; 13: e28 (17 str.)
<https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-015-0087-3>
(februar, 2016)
204. Pap E. The role of microvesicles and malignancies In: Dittmar T, Zänker KS, eds. *Cell fusion in health and disease. II: cell fusion and disease. Adv Exp Med Biol* 2011; 950: 183–99 (Book series).
205. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* 2008; 180: 222–9.
206. Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(49): 34211–22.
207. Pastrello B, Paracatu LC, de Carvalho Bertozo L, Paino IM, Lisboa - Filho PN, Ximenes VF. Synthesis and evaluation of the potential deleterious effects of ZnO nanomaterials (nanoneedles and nanoflowers) on blood components, including albumin, erythrocytes and human isolated primary neutrophils. *J Nanopart Res* 2016; 18(7): 216 (12 str.)
208. Patnaik AK, MacEwen EG, Black AP, Luckow S. Extracutaneous mast cell tumor in the dog. *Vet Pathol* 1982; 19: 608–15.
209. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 1984; 21(5): 469–74.
210. Patra SK. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1785(2): 182–206.

211. Pavlič JI, Genova J, Zheliaskova A, Iglič A, Mitov MD. Electroformation of neutral and negatively charged phospholipid giant vesicles under physiological conditions. *Compte Rendu Acad Bulg Sci* 2010; 63: 497–502.
212. Pavlin D, Cemazar M, Kamensek U, Tozon N, Pogacnik A, Sersa G. Local and systemic antitumor effect of intratumoral and peritumoral IL-12 electrogene therapy on murine sarcoma. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(22): 2114–22.
213. Pavlin D, Cemazar M, Cör A, Sersa G, Pogacnik A, Tozon N. Electrogenic therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors. *Radiol Oncol* 2011; 45(1): 31–9.
214. Pavlin D, Čemažar M, Tozon N. Electrochemogenic therapy as an effective and safe treatment of canine cutaneous mast cell tumors. In: Jaram T, Kramar T, eds. *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies*. Portorož, 2015: 429–32. (Book series IFMBE Proceedings 2015; 53: 429–32).
215. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012; 18(6): 883–91.
216. Penglis F, Michal F. The induction of blood platelet aggregation by divalent cations. *Experientia* 1969; 25: 745–6.
217. Perkumas KM, Hoffman EA, McKay BS, Allingham RR, Stamer WD. Myocilin-associated exosomes in human ocular samples. *Exp Eye Res* 2007; 84(1): 209–12.
218. Peters JA. Canine mastocytoma: excess risks as related to ancestry. *Natl Cancer Inst* 1969; 42: 435–43.
219. Peterlin P, Arrigler V. Electroformation in a flow chamber with solution exchange as a means of preparation of flaccid giant vesicles. *Colloid Surf B Biointerfaces* 2008; 64: 77–87.
220. Peterlin P, Jaklič G, Pisanski T. Determining membrane permeability of giant phospholipid vesicles from a series of videomicroscopy images. *Meas Sci Technol* 2009; 20: e055801 (7 str.)
<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-0233/20/5/055801> (februar, 2015).
221. Peterlin P, Arrigler V, Haleva E, Diamant H. Law of corresponding states for osmotic swelling of vesicles. *Soft Matter* 2012; 8(7): 2185–93.

222. Poirier VJ, Adams WM, Forrest LJ, Green EM, Dubielzig RR, Vail DM. Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 2006; 42(6): 430–4.
223. Ponomareva AA, Nevzorova TA, Mordakhanova ER, Andrianova IA, Litvinov RI. Structural characterization of platelets and platelet derived microvesicles. *Tsitologija* 2016; 58: 105–14.
224. Pratschke KM, Atherton MJ, Sillito JA, Lamm CG. Evaluation of a modified proportional margins approach for surgical resection of mast cell tumors in dogs: 40 cases. *J Am Vet Med Assoc* 2013; 243(10): 1436–41.
225. Premanatha M, Karthikeyank K, Jeyasubramanian K, Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2011; 7(2): 184–92.
226. Prokopi M, Pula G, Mayr U, et al. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood* 2009; 114: 723–32.
227. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemos* 2010; 36(8): 888–906.
228. Rassnick KM, Bailey DB, Russell DS, et al. A phase II study to evaluate the toxicity and efficacy of alternating CCNU and high-dose vinblastine and prednisone (CVP) for treatment of dogs with high-grade, metastatic or nonresectable mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2010; 8: 138–52.
229. Ratajczak MZ. Microvesicles: from "dust to crown". *Blood* 2006; 108(9): 2885–6.
230. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska - Wiczorek A, Ratajczak MZ. Membrane derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell to cell communication. *Leukemia* 2006; 20(9): 1487–95.
231. Reguera MJ, Rabanal RM, Puigdemont A, Ferrer L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *Am J Dermatopathol* 2000; 22: 49–54.
232. Reijnders L. Human health hazards of persistent inorganic and carbon nanoparticles. *J Mater Sci* 2012; 47: 5061–73.
233. Rogers KS. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996 ;26(1): 87–102.
234. Rossi C, Randi M, Zerbinati P, Cella G, Girolami A. Thrombocytosis in malignancy: a paraneoplastic syndrome? *Hematology* 1997; 2(3): 229–33.

235. Rothwell TL, Howlett CR, Middleton DJ, Griffiths DA, Duff BC. Skin neoplasms of dogs in Sydney. *Aust Vet J* 1987; 64(6): 161–4.
236. Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* 2012; 379(9826): 1591–601.
237. Ruh H, Köhl B, Brenner - Weiss G, Hopf C, Diabaté S, Weiss C. Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *Toxicol Lett* 2012; 208: 41–50.
238. Sadjadpour S, Safarian S, Zargar SJ, Sheibani N. Antiproliferative effects of ZnO, ZnO-MTCP, and ZnO-CuMTCP nanoparticles with safe intensity UV and X-ray irradiation. *Biotechnol Appl Biochem* 2016; 63(1): 113–24.
239. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1595–604.
240. Sakashita A, Urakami N, Zihel P, Imai M. Three-dimensional analysis of lipid vesicle transformations. *Soft Matter* 2012; 8(33): 8569–81.
241. Samuel SP, Santos - Martinez MJ, Medina C, et al. CdTe quantum dots induce activation of human platelets: implications for nanoparticle hemocompatibility. *Int J Nanomed* 2015; 10: 2723–34.
242. Scase TJ, Edwards D, Miller J, et al. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 151–8.
243. Schlieben P, Meyer A, Weise C, et al. Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet J* 2012; 194(2): 210–4.
244. Schmidt J, Vogelsberger W. Dissolution kinetics of titanium dioxide nanoparticles: the observation of an unusual kinetic size effect. *J Phys Chem B* 2006; 110(9): 3955–63.
245. Schusser EGBCG. Immunotherapy for a mast-cell neoplasm in a dog. *Wien Tierärztl Monatsschr* 1990; 77: 334–6.
246. Schultheiss PC, Gardiner DW, Rao S, Olea - Popelka F, Tuohy JL. Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 238(11): 1464–9.

247. Scott MD, Van den Berg JJ, Repka T, et al. Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. *J Clin Invest* 1993; 91(4): 1706–12.
248. Scott MA, Stoskham SL. Basophils and mast cells. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds. *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed. Philadelphia : Lippincott, Williams and Wilkins, 2000: 308–17.
249. Séguin B, Leibman NF, Bregazzi VS, et al. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996–1999). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218(7): 1120–3.
250. Séguin B, Besancon MF, McCallan JL, et al. Recurrence Rate, Clinical Outcome, and Cellular Proliferation: Indices as Prognostic Indicators after Incomplete Surgical Excision of Cutaneous Grade II Mast Cell Tumors: 28 Dogs (1994–2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006; 20(4): 933–40.
251. Serša G, Čemazar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum (II) in mice. *Cancer Res* 1995; 55: 3450–5.
252. Serša G, Čemazar M, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy of tumours. *Radiol Oncol* 2006; 40: 163–74.
253. Setyawati MI, Khoo PK, Eng BH, et al. Cytotoxic and genotoxic characterisation of titanium dioxide, gadolinium oxide, and poly (lactic-to-glycolic acid) nanoparticles in human fibroblast. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101: 633–40.
254. Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnol* 2014; 12: e5. (11 str.)
<https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-3155-12-5>
(februar, 2016)
255. Shannahan JH, Kodavanti UP, Brown JM. Manufactured and airborne nanoparticle cardiopulmonary interactions: a review of mechanisms and the possible contribution of mast cells. *Inhal Toxicol* 2012; 24(5): 320–39.
256. Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials. *Chem Soc Rev* 2012; 41(6): 2323–43.
257. Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* 2003; 63(15): 4331–7.

258. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zahao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle Fibre Toxicol* 2013; 10: e15 (33. str.)
<http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-10-15>
(februar, 2015).
259. Shoop SJ, Marlow S, Church DB, et al. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. *Canine Genet Epidemiol* 2015; 26; 2: e1 (10 str.)
<https://cgejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2052-6687-2-1> (februar, 2016)
260. Simak J. Nanotoxicity in blood: effects of engineered nanomaterials on platelets. In: Sahu SC, Casciano DA, eds. *Nanotoxicity*. Chichester : John Wiley and Sons, 2009: 192–225.
261. Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* 2000; 290(5497): 1721–6.
262. Simpson AM, Ludwig LL, Newman SJ, Bergman PJ, Hottinger HA, Patnaik AK. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 236–40.
263. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175(4023): 720–31.
264. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10(12): 1470–6.
265. Smithies O, Lawrence M, Testen A, et al. Stable oligomeric clusters of gold nanoparticles: preparation, size distribution, derivatization, and physical and biological properties. *Langmuir* 2014; 30(44): 13394–404.
266. Spaet TH, Zucker MB. Mechanism of platelet plug formation and role of adenosine diphosphate. *Am J Physiol* 1964; 206: 1267–74.
267. Steffey M, Rassnick KM, Porter B, Njaa BL. Ureteral mast cell tumor in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 82–5.
268. Stone RL, Nick AM, McNeish IA, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(7): 610–8.
269. Suwalsky M, Novoa V, Villena F, et al. Structural effects of Zn(2+) on cell membranes and molecular models. *J Inorg Biochem* 2009; 103(5): 797–804.
270. Svetina S, Žekš B. Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells. *Eur Biophys J* 1989; 17(2): 101–11.

271. Svetina S, Kuzman D, Waugh RE, Zihlerl P, Zeks B. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry* 2004; 62(2): 107–13.
272. Šimundić M, Drašler B, Šustar V, et al. 2013. Effect of engineered TiO₂ and ZnO nanoparticles on erythrocytes, platelet-rich plasma and giant unilamellar phospholipid vesicles. *BMC Vet Res* 2013; 9: e7 (13 str)
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/7> (februar, 2016).
273. Šuštar V, Bedina - Zavec A, Štukelj R, et al. Nanoparticles isolated from blood: a reflection of vesiculability of blood cells during the isolation process. *Int J Nanomed* 2011; 6: 2737–48.
274. Šuštar V, Bedina - Zavec A, Štukelj R, et al. Post-prandial rise of microvesicles in peripheral blood of healthy human donors. *Lipids Health Disease* 2011; 10: e47 (11 str.) <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-10-47> (februar, 2016)
275. Tabone - Eglinger S, Subra F, El Sayadi H, et al. KIT mutations induce intracellular retention and activation of an immature form of the KIT protein in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2008; 14(8): 2285–94.
276. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, et al. Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: a retrospective cohort study. *Vet J.* 2013 ;196(3): 492–8.
277. Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 2014; 24(6): 766–9.
278. Thamm DH, Vail DM. Mast cell tumors. In: Withrow DJ, MacEwen EG, eds. *Small animal clinical oncology*. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 2001: 261–82.
279. Thamm DH, Turek MM, Vail DM. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *J Vet Med Sci* 2006; 68(6): 581–7.
280. Thamm DH, Vail DM. Mast cell tumors. In: Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. 4th ed. St. Louis : Saunders Elsevier, 2007: 402–24.
281. Thams TR, Macy DW. Canine mast cell tumor. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1981; 27: 259–63.

282. Thompson JJ, Pearl DL, Yager JA, Best SJ, Coomber BL, Foster RA. Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Vet Pathol* 2001; 48: 156–68.
283. Thompson JJ, Yager JA, Best SJ, et al. Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. *Vet Pathol* 2011; 48(1): 169–81.
284. Thrall DE, Dewhirst MW. Use of radiation and/or hyperthermia for treatment of mast cell tumours and lymphosarcoma in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1985; 15: 835–43.
285. Toyooka T, Amano T, Ibuki Y. Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat Res* 2012; 742(1/2): 84–91.
286. Tozon N, Sersa G, Cemazar M. Electrochemotherapy: potentiation of local antitumour effectiveness of cisplatin in dogs and cats. *Anticancer Res* 2001; 21: 2483–8.
287. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008; 319: 1244–7.
288. Tripathy N, Ahmad R, Ko HA, Khang G, Hahn YB. Enhanced anticancer potency using an acid-responsive ZnO-incorporated liposomal drug-delivery system. *Nanoscale* 2015; 7(9): 4088–96.
289. Trybulec M, Kowalska MA, McLane MA, Silver L, Lu W, Niewiarowski S. Exposure of platelet fibrinogen receptors by zinc ions: role of protein kinase C. *Exp Biol Med* 1993; 203: 108–16.
290. Turrel JM, Kitchell BE, Miller LM, Théon A. Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 15: 193(8): 936–40.
291. Urbanija J, Tomšič N, Lokar M, et al. Coalescence of phospholipid membranes as a possible origin of anticoagulant effect of serum proteins. *Chem Phys Lipids* 2007; 150(1): 49–57.
292. Valenti R, Huber V, Filipazzi P, et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* 2006; 66(18): 9290–8.
293. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 2010; 6(1): 12–21.
294. Vermylen J, Nemmar A, Nemery B, Hoylaerts FM. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2005; 3(9): 1955–61.

295. Viet Long N, Minh Thi C, Nogami M. The recent patents and highlights of functionally engineered nanoparticles for potential applications in biology, medicine, and nanomedicine. *Curr Phys Chem* 2014; 4(2): 173–94.
296. Vinardell MP, Mitjans M. Antitumor activities of metal oxide nanoparticles. *Nanomaterials* 2015; 5(2): 10042–1.
297. Wang B, Zhang L, Bae SC, Granick S. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105: 18171–5.
298. Warland J, Amores - Fuster I, Newbury W, Brearley M, Dobson J. The utility of staging in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2014; 12(4): 287–98.
299. Webster JD, Kiupel M, Kaneene JB, Miller RA, Yuzbasiyan - Gurkan V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 2004; 41(3): 371–7.
300. Webster JD, Yuzbasiyan - Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol* 2007; 44(3): 298–308.
301. Webster JD, Yuzbasiyan - Gurkan V, Thamm DH, Hamilton E, Kiupel M. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BCM Vet Res* 2008; 4: e32 (8 str.)
<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-4-32> (februar, 2016).
302. Weisse C, Shofer FS, Sorenmo K. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002; 38: 71–3.
303. White CR, Hohenhaus AE, Kelsey J, Procter-Gray E. Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011; 47(3): 210–6.
304. Winski SL, Carter DE. Arsenate toxicity in human erythrocytes: characterization of morphologic changes and determination of the mechanism of damage. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 53(5): 345–55.
305. Wolfram J, Zhu M, Yang Y, et al. Safety of nanoparticles in medicine. *Curr Drug Targets* 2015; 16(14): 1671–81.

306. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Scope of nanotechnology in ovarian cancer therapeutics. *J Ovarian Res* 2010; 3: e19 (10 str.)
<http://ovarianresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-2215-3-19> (februar, 2016).
307. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015; 4: e27066 (60 str.)
<http://journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev/article/view/27066> (februar, 2016)
308. Yeates DB, Mauderly JL. Inhaled environmental/occupation irritants and allergens: mechanisms of cardiovascular and systemic responses: introduction. *Environ Health Persp* 2001; 109: 479–81.
309. Yong KT, Law WC, Hu R, Ye L, Liu L, Swihart MT, Prasad PN. Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies. *Chem Soc Rev* 2013; 42(3): 1236–50.
310. Yu Y, Granick S. Pearling of lipid vesicles induced by nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2009; 131(40): 14158–9.
311. Xia XR, Monteiro-Riviere NA, Mathur S, et al. Mapping the surface adsorption forces of nanomaterials in biological systems. *ACS Nano* 2011; 5(11): 9074–81.
312. Xia TA, Zhao Y, Sager T, et al. Decreased dissolution of ZnO by iron doping yields nanoparticles with reduced toxicity in the rodent lung and zebrafish embryos. *ACS Nano* 2011; 5: 1223–35.
313. Zanna G, Fondevila D, Bardagi M, Docampo MJ, Bassols A, Ferrer L. Cutaneous mucinosis in shar-pei dogs is due to hyaluronic acid deposition and is associated with high levels of hyaluronic acid in serum. *Vet Dermatol* 2008; 19(5): 314–8.
314. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan - Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol* 2002; 39(5): 529–35.
315. Ziemba B, Halets I, Shcharbin D, et al. Influence of fourth generation poly (propyleneimine) dendrimers on blood cells. *J Biomed Mater Res Part A* 2012; 100(11): 2870–80.
316. Zihlerl P, Svetina S. Nonaxisymmetric phospholipid vesicles: rackets, boomerangs, and starfish. *Europhys Lett (EPL)* 2005; 70(5): 690.

317. Zook JM, MacCuspie RI, Locascio LE, Halter MD, Elliott JT. Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology* 2011; 5(4): 517–30.
318. Zucchella M, Dezza L, Pacchiarini L, et al. Human tumor cells cultured “in vitro” activate platelet function by producing ADP or thrombin. *Haematologica* 1989; 74: 541–5.
319. Zupanc J, Valant J, Drobne D, Kralj Igljč V, Igljč A. A new approach to analyse effects of nanoparticles on lipid vesicles. *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol* 2010 1(1): 34–51.
320. Zupanc J, Dobnikar A, Drobne D, Valant J, Erdogmus D, Bas E. Biological reactivity of nanoparticles: mosaics from optical microscopy videos of giant lipid vesicles. *J Biomed Opt* 2011; 16(2): e026003 (10 str.)
<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1166681>
(februar, 2016).
321. Zupanc J, Drobne D, Drašler B, et al. Experimental evidence for the interaction of C-60 fullerene with lipid vesicle membranes. *Carbon* 2012; 50(3): 1170–8.
322. Zupanc J, Drašler B, Boljte B, et al. Lipid vesicle shape analysis from populations using light video microscopy and computer vision. *Plos One* 2014; 9(11): e0113405 (14 str.)
<http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0113405.PDF>
(februar, 2016).
323. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer res* 2009; 15(22): 6830–40.

11 PRILOGE

Tabela 9: Podatki o starosti psov, spolu, pasmi, lokaciji in velikosti MCT, kliničnem izgledu, kliničnem stadiju in histološki stopnji malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu, vzorcu KIT-barvanja in proliferacijskem indeksu Ki-67 pri psih z MCT pred zdravljenjem.

Table 9: Data on dog's age, sex, breed, location and size of MCT, clinical presentation, clinical stage and histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik and Kiupel, KIT-staining pattern and proliferative index Ki-67 in dogs with MCT before treatment.

| Zaporedna številka psa | Starost (let) | Spol | Pasma | Lokacija MCT | Premer tumorja (cm) | Klinični izgled tumorja | Klinični stadij | Histološka stopnja malignost | | Imunohistokemija | |
|------------------------|---------------|------|-------|--------------------|---------------------|-------------------------|-----------------|------------------------------|------|------------------|----------|
| | | | | | | | | Pat | Kiup | C-KIT | PI Ki-67 |
| 1 | 5 | m | NB | trebuh | 2 | alopecija, pigment | 1 | 2 | 0 | 2 | 4,9 |
| 2 | 6 | ž | VPP | noga sp.l. | 3 | np | 1 | 2 | 0 | 1 | 1,32 |
| 3 | 3 | ž | SP | noga z.d. | np | np | 1 | 2 | 0 | 1 | 0,29 |
| 4 | 9 | m | NT | komolec | 5 | alopecija,ulceracija | 1 | 2 | 0 | 1 | 8,64 |
| 5 | 6 | m | JRT | vrata | 1 | pod kožo | 1 | 2 | 0 | 2 | 16,2 |
| 6 | 12 | m | PRT | aksilarno področje | 0,5 | pod kožo | 1 | 2 | 0 | 1 | 31,1 |
| 7 | 12 | ž | LAB | noga sp.l. | 2 | alopecija,ulceracija | 1 | 3 | 1 | 2 | 18,2 |
| 8 | 5 | m | NB | rama | 3 | ulceracija | 2 | 3 | 1 | 3 | 14,1 |
| 9 | 8 | ž | M | plečka | 15 | ulceracija, nekroza | 2 | 3 | 1 | 2 | 31,1 |
| 10 | 3 | ž | NB | vulva | 1 | ulceracija | np | 3 | np | np | |
| 11 | 12 | m | M | koleno | np | np | 1 | np | np | np | |
| 12 | 10 | ž | ZP | prst | post op | np | 2 | np | np | np | |
| 13 | 8 | m | BPP | nosnica | 3 | depigment | np | np | np | np | |
| 14 | 9 | m | M | kontrola | | | | | | | |
| 15 | 1 | m | GR | kontrola | | | | | | | |
| 16 | 2 | ž | EB | kontrola | | | | | | | |
| 17 | 0,7 | ž | M | kontrola | | | | | | | |
| 18 | 3 | m | V | kontrola | | | | | | | |
| 19 | 4 | ž | M | kontrola | | | | | | | |
| 20 | 8 | m | M | kontrola | | | | | | | |
| 21 | 4 | m | BC | kontrola | | | | | | | |

Legenda: pasma: NB = nemški bokser, VPP = veliki planšarski pes, SP = shar-pej, NT = nemški terier, JRT = jack russel terier, PRT = parson russel terier, LAB = labradorec, M = mešanec, ZP = zlati prinašalec, BPP = bernski planšarski pes, G = greyster, EB = epagneul breton, V = vižla, BC = border collie; pigment = pigmentacija; depigment = depigmentacija; np = ni podatka; histološka stopnja malignosti MCT po Patnaiku (1 = I, 2 = II, 3 = III) in Kiupelu (0 – nizko maligen, 1 – visoko maligen); Pat = Patnaik; Kiup = Kiupel; PI Ki-67 = proliferacijski indeks Ki-67; klinični stadij: 1 = brez zasevkov, 2 = z zasevki v regionalni bezgavki

Legend: breed: NB = Boxer, VPP = Great Swiss Mountain Dog, SP = Shar Pei, NT = German Hunting Terrier, JRT = Jack Russell Terrier, PRT = Parson Russell Terrier, LAB = Labrador Retriever, M = mixed breed, ZP = Golden Retriever, BPP = Bernese Mountain Dog, G = Greyster, EB = Epagneul Breton, V = Vizsla, BC = Border Collie; pigment = pigmentation; depigment = depigmentation; np = no data; histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik (1 = I, 2 = II, 3 = III) and Kiupel (0 – low-grade, 1 – high-grade); Pat = Patnaik; Kiup = Kiupel; PI Ki-67 = proliferative index Ki-67; clinical stage: 1 = nonmetastatic, 2 = metastases in the regional lymph node

Tabela 10: Podatki o pasmi, številski koncentraciji MV v izolatih periferne krvi in trombocitov v periferni krvi, kliničnem stadiju, histološki stopnji malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu, vzorcu KIT-barvanja in proliferacijskem indeksu Ki-67 pri psih z MCT pred zdravljenjem.

Table 10: Data on breed, concentration of MVs in isolates from peripheral blood and platelets in peripheral blood, clinical stage, histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik and Kiupel, KIT-staining pattern and proliferative index Ki-67 in dogs with MCT before treatment.

| Zaporedna številka psa | Pasma | Koncentracija mikroveziklov (µl/l) | Trombociti (143,3-400 x10 ⁹ /l) | Klinični izgled | Klinični stadij | Histološka stopnja malignosti | | Imunohistokemija | |
|------------------------|-------|------------------------------------|--|-------------------------|-----------------|-------------------------------|--------|------------------|----------|
| | | | | | | Patnaik | Kiupel | KIT-barvanje | PI Ki-67 |
| 1 | NB | 134 | 169 | alopecija, pigmentacija | 1 | 2 | 0 | 2 | 4,9 |
| 2 | VPP | 264 | 218 | alopecija | 1 | 2 | 0 | 1 | 1,32 |
| 3 | SP | 338 | 284 | alopecija | 1 | 2 | 0 | 1 | 0,29 |
| 4 | NT | 187 | 340 | alopecija, ulceracija | 1 | 2 | 0 | 1 | 8,64 |
| 5 | JRT | 158 | 420 | pod kožo | 1 | 2 | 0 | 2 | 16,2 |
| 6 | PRT | 87,9 | 282 | pod kožo | 1 | 2 | 0 | 1 | 31,1 |
| 7 | LAB | 456 | 341 | alopecija, ulceracija | 1 | 3 | 1 | 2 | 18,2 |
| 8 | NB | 330 | 286 | ulceracija | 2 | 3 | 1 | 3 | 14,1 |
| 9 | M | 446 | 1114 | ulceracija, nekroza | 2 | 3 | 1 | 2 | 31,1 |
| 10 | NB | 151 | 264 | ulceracija | np | np | | np | |
| 11 | M | np | 285 | np | np | np | | np | |
| 12 | ZP | np | np | np | 2 | np | | np | |
| 13 | BPP | np | np | depigment | np | np | | np | |

Legenda: np = ni podatka; pasma: NB = nemški bokser, VPP = veliki planšarski pes, SP = shar-pej, NT = nemški terier, JRT = jack russel terier, PRT = parson russel terier, LAB = labradorec, M = mešanec, ZP = zlati prinašalec, BPP = bernski planšarski pes; pigment = pigmentacija; depigment = depigmentacija; PI Ki-67 = proliferacijski indeks Ki-67; klinični stadij: 1 = brez zasevkov, 2 = z zasevki v lokalni bezgavki; histološka stopnja malignosti MCT po Patnaiku (1 = I, 2 = II, 3 = III) in Kiupelu (0 – nizko maligen, 1 – visoko maligen)

Legend: np = no data; breed: NB = Boxer, VPP = Great Swiss Mountain Dog, SP = Shar Pei, NT = German Hunting Terrier, JRT = Jack Russell Terrier, PRT = Parson Russell Terrier, LAB = Labrador Retriever, M = mixed breed, ZP = Golden Retriever, BPP = Bernese Mountain Dog; pigment = pigmentation; depigment = depigmentation; PI Ki-67 = proliferative index Ki-67; clinical stage: 1 = nonmetastatic, 2 = metastases in the regional lymph node; histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik (1 = I, 2 = II, 3 = III) and Kiupel (0 – low-grade, 1 – high-grade)

Tabela 11: Podatki o kliničnem izgledu MCT, številski koncentraciji MV in trombocitov v izolatih periferne krvi pred zdravljenjem, med in po zdravljenju, kliničnem stadiju, histološki stopnji malignosti MCT po Patnaiku in Kiupelu, vzorcu KIT-barvanja in proliferacijskem indeksu Ki-67 pri psih z MCT.

Table 11: Data on MCT's clinical presentation, concentration of MVs in isolates from peripheral blood and platelets in peripheral blood before, during and after treatment, clinical stage, histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik and Kiupel, KIT-staining pattern and proliferative index Ki-67 in dogs with MCT.

| Zaporedna številka psa | Klinični izgled | Koncentracija mikroveziklov pred zdravljenjem (/μl) | Čas (tedni) | Zdravljenje in odgovor na zdravljenje | Koncentracija mikroveziklov po zdravljenju (/μl) | Trombociti (143,3-400 x10 ⁹ /l) | Klinični stadij | Histološka stopnja malignosti | | Imunohistokemija | |
|------------------------|-------------------------|---|-------------|---------------------------------------|--|--|-----------------|-------------------------------|--------|------------------|----------|
| | | | | | | | | Patnaik | Kiupel | KIT-barvanje | PI Ki-67 |
| 1 | alopecija, pigmentacija | 134 | 0 | krg | | 169 | 1 | 2 | 0 | 2 | 4,9 |
| 2 | alopecija | 264 | 0 | krg | | 218 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1,32 |
| | | | 4 | CR | 414 | np | | | | | |
| | | | 16 | | 133 | 199 | | | | | |
| | | | 17 | recidiv | | | | | | | |
| 3 | alopecija | 338 | 0 | krg | | 284 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0,29 |
| 4 | alopecija, ulceriracija | 187 | 0 | krg, ECT, EGT | | 340 | 1 | 2 | 0 | 1 | 8,64 |
| | | | 4 | ECT, EGT | 153 | 336 | | | | | |
| | | | 8 | CR | 167 | 352 | | | | | |
| 5 | pod kožo | 158 | 0 | krg | | 420 | 1 | 2 | 0 | 2 | 16,2 |
| 6 | pod kožo | 87,9 | 0 | krg | | 282 | 1 | 2 | 0 | 1 | 31,1 |
| 7 | alopecija, ulceriracija | 456 | 0 | krg | | 341 | 1 | 3 | 1 | 2 | 18,2 |
| | | | 4 | CR | 247 | np | | | | | |
| 8 | ulceriracija | 330 | 0 | krg, kemo | | 282 | 2 | 3 | 1 | 3 | 14,1 |
| | | | 9 | ECT, EGT | 216 | 282 | | | | | |
| | | | 12 | masitinib | np | np | | | | | |
| | | | 14 | | 52 | 282 | | | | | |
| | | | 20 | evt. multiorgan odpoved | np | np | | | | | |
| 9 | ulceriracija, nekroza | 446 | 0 | kemo | | 1114 | 2 | 3 | 1 | 2 | 31,1 |
| | | | 5 | krg paliat | 612 | 940 | | | | | |
| | | | 12 | meta.lnn | np | 486 | | | | | |
| | | | 13 | masitinib | np | np | | | | | |
| 10 | ulceracija | 151 | 0 | ECT | | 264 | np | 3 | np | np | |
| | | | 8 | CR | np | np | | | | | |
| 11 | np | | 0 | post krg | | 285 | np | np | | np | |
| | | | | recidiv, | | | | | | | |
| | | | | kemo | | | | | | | |
| | | | 1 | | 107 | 211 | | | | | |
| | | | 2 | NC | 221 | | | | | | |
| | | | 15 | evt, PD | np | np | | | | | |
| 12 | np | np | 0 | krg brez var. robov | | np | 2 | np | | np | |
| | | | 5 | kemo | 104 | 247 | | | | | |
| | | | 10 | recidiv | 723 | 281 | | | | | |
| | | | 28 | pogin | np | np | | | | | |
| 13 | depigment | np | 0 | kemo | | 211 | np | np | | np | |
| | | | 3 | ECT | np | 236 | | | | | |
| | | | 7 | | 160 | 366 | | | | | |
| | | | 8 | | 127 | 320 | | | | | |
| | | | 12 | kemo lomustin | np | 158 | | | | | |
| | | | 13 | evt | np | np | | | | | |

Legenda: krg = kirurško zdravljenje; krg brez var. robov = kirurgija brez varnostnih robov; np = ni podatka; kemo = kemoterapija z vinblastinom in prednisolonom; kemo lomustin = kemoterapija z lomustinom; ECT = elektrokemoterapija; EGT = elektrogenska terapija; krg paliat = paliativna kirurgija; evt = evtanazija; multiorgan odpoved = multiorganska odpoved; CR = popoln odgovor na zdravljenje (angl. complete response); PD = napredujoča bolezen (angl. progressive disease); NC = ni spremembe (angl. no change); pigment = pigmentacija; depigment = depigmentacija; PI Ki-67 = proliferacijski indeks Ki-67; klinični stadij: 1 = brez zasevkov, 2 = z zasevki v lokalni bezgavki; histološka stopnja malignosti MCT po Patnaiku (2 = II, 3 = III) in Kiupelu (0 – nizko malign, 1 – visoko malign); meta lnn = zasevki v bezgavki

Legend: krg = surgery; krg brez var. robov = surgery without safety margins; np = no data; kemo = chemotherapy with vinblastine and prednisolone, kemo lomustin = chemotherapy with lomustine; ECT = electrochemotherapy; EGT = electrogene therapy; krg paliat = palliative surgery; evt = euthanasia; multiorgan odpoved = multiorgan failure; CR = complete response; PD = progressive disease; NC = no change; pigment = pigmentation; depigment = depigmentation; PI Ki-67 = proliferative index Ki-67; clinical stage: 1 = nonmetastatic; 2 = metastases in the regional lymph node; histological grade of malignancy of MCT according to Patnaik (1 = I, 2 = II, 3 = III) and Kiupel (0 – low-grade, 1 – high-grade); meta lnn = metastases in lymph node