

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Neža REPAR

**VPLIV SUPERPARAMAGNETNIH
NANODELCEV NA HUMANE
ENDOTELIJSKE CELICE *IN VITRO***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2022

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Neža REPAR

**VPLIV SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV
NA HUMANE ENDOTELIJSKE CELICE *IN VITRO***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE INFLUENCE OF SUPERPARAMAGNETIC
NANOPARTICLES ON HUMAN ENDOTHELIAL CELLS
*IN VITRO***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2022

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 24.9.2018 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje nanoznanosti. Za mentorja je bila imenovana prof. dr. Damjana Drobne.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Pretočna citometrija je bila izvedena na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Sinteza in karakterizacija nanodelcev je bila izvedena na Odseku za sintezo materialov na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Presevna elektronska mikroskopija je bila izvedena na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Infrardeča spektroskopija je bila izvedena na sinhrotronu Elettra v Trstu.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter VERANIČ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Član: izr. prof. dr. Alenka MAČEK-LEBAR
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

Član: prof. dr. Boris TURK
Inštitut Jožef Stefan, Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo

Datum zagovora:

Neža Repar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 620.3:577(043.3)
KG	celice, nanotoksikologija, superparamagnetni nanomateriali, lipidne kaplje, ferroptaza, maščobne kisline
AV	REPAR, Neža, mag. farm.
SA	DROBNE, Damjana (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje Nanoznanosti
LI	2022
IN	VPLIV SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV NA HUMANE ENDOTELIJSKE CELICE <i>IN VITRO</i>
TD	Doktorska disertacija
OP	XI, 85 str., 26 sl., 115 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Superparamagnetni nanodelci železovega oksida (SPIONi) imajo velik potencial za uporabo v medicini, vendar lahko zaradi oksidativnega stresa povzročajo neželene učinke. V naši študiji smo preučevali učinke SPIONov na endotelijske celice in ugotavljali, ali lahko oleinska kislina (OK) zaščiti celice pred njihovimi škodljivimi učinki. Uporabili smo teste viabilnosti, pretočno citometrijo, imunodetekcijo proteinov, infrardečo spektroskopijo, fluorescenčno mikroskopijo in presewno elektronsko mikroskopijo. Naši rezultati kažejo, da celice HUVEC internalizirajo SPIONe, ki povzročajo oksidativni stres, lipidno peroksidacijo in celično smrt. Izpostavljenost SPIONom v celicah povzroča kopičenje lipidnih kapelj (LK), ki ni odvisno od biogeneze LK, posredovane z diacilglicerol aciltransferazo (DGAT), kar nakazuje, da SPIONi zavirajo razgradnjo LK. Dodatek OK v celicah inducira sintezo LK in zmanjša s SPIONi povzročen oksidativni stres, lipidno peroksidacijo in celično smrt. OK ščiti celice pred kvarnimi učinki SPIONov tudi ob prisotnosti zaviralcev DGAT, kar kaže, da vgradnja OK v LK ni nujna za njeno zaščitno delovanje. Molekulski fenotip celic, določen z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo, je potrdil kvarni učinek SPIONov in zaščitno vlogo OK v primeru oksidativnega stresa. OK torej ščiti endotelijske celice pred oksidativnim stresom, lipidno peroksidacijo in celično smrtjo, ki jo povzročajo SPIONi, pri čemer je njena zaščitna vloga neodvisno od njene zaestritve v trigliceride.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 620.3:577(043.3)
CX cells, nanotoxicology, superparamagnetic nanomaterials, lipid droplets, ferroptosis, fatty acids
AU REPAR, Neža
AA DROBNE, Damjana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific Field Nanosciences
PY 2022
TI THE INFLUENCE OF SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES ON HUMAN ENDOTHELIAL CELLS *IN VITRO*
DT Doctoral dissertation
NO XI, 85 p., 26 fig., 115 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) have great potential for use in medicine, but they may cause side effects due to oxidative stress. In our study, we investigated the effects of SPIONs on endothelial cells and whether oleic acid (OA) can protect the cells from their harmful effects. We used viability assays, flow cytometry, protein immunodetection, infrared spectroscopy, fluorescence microscopy, and transmission electron microscopy. Our results show that SPIONs are internalized by HUVEC cells, where they induce oxidative stress and lipid peroxidation and cause cell death. Exposure to SPIONs induced accumulation of lipid droplets (LD) that was not dependent on diacylglycerol acyltransferase (DGAT)-mediated LD biogenesis, suggesting that SPIONs suppress LD degradation. Addition of exogenous OA promoted LD biogenesis and reduced SPION-dependent increases in oxidative stress, lipid peroxidation, and cell death. However, exogenous OA protected cells from SPION-induced cell damage even in the presence of DGAT inhibitors, suggesting that LDs are not required for the protective effect of exogenous OA. The molecular phenotype of cells determined by Fourier transform infrared spectroscopy confirmed the destructive effect of SPIONs and the ameliorative role of OA in the case of oxidative stress. Thus, exogenous OA protects endothelial cells from SPION-induced oxidative stress, lipid peroxidation, and cell death independent of its incorporation into triglycerides.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 NANOMATERIALI.....	3
2.1.1 Definicija nanomaterialov	3
2.1.2 Nanomateriali v medicini	3
2.1.3 Superparamagnetni nanodelci železovih oksidov	6
2.2 LIPIDNE KAPLJE	12
2.2.1 Sinteza lipidnih kapelj	13
2.2.2 Razgradnja lipidnih kapelj	13
2.2.3 Funkcija lipidnih kapelj	14
2.3 FEROPTOZA	16
2.3.1 Ferroptaza in lipidne kaplje	17
2.3.2 Ferroptaza in železooksidni nanodelci.....	18
2.3.3 Občutljivost različnih celic na ferroptozo	19
2.4 MAŠČOBNE KISLINE KOT REGULATORJI CELIČNE SMRTI	20
2.4.1 Oleinska kislina in celična smrt.....	21
2.5 IZVENSINAPTIČNA ACETILHOLINESTERAZA.....	21
2.5.1 Izoforme acetilholinesteraze	21
2.5.2 Acetilholinesteraza in celična smrt.....	22
3 MATERILI IN METODE.....	24
3.1 NANOMATERIALI.....	24
3.1.1 Sinteza nanomaterialov	24
3.1.2 Karakterizacija nanomaterialov	24

3.1.3	Priprava suspenzij nanomaterialov	25
3.2	PRIPRAVA RAZTOPIN OLEINSKE KISLINE	25
3.3	GOJENJE CELIC HUVEC	25
3.4	POSTTRANSKRIPCISKO UTIŠANJE GENA ZA ATGL Z UPORABO MALE INTERFERENČNE RNA	26
3.5	TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI.....	26
3.5.1	Test z resazurinom.....	26
3.5.2	Test privzema barvila nevtralnno rdeče	27
3.5.3	Test CyQuant	27
3.4	DOLOČANJE AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE	28
3.5	DOLOČANJE PRISOTNOSTI SPIONov V CELICAH.....	28
3.6	PRETOČNA CITOMETRIJA	29
3.6.1	Določanje mrtvih celic z barvilom 7-AAD ter kvantifikacija lipidnih kapelj z barvilom BODIPY 493/503	30
3.6.2	Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti v živih celicah z barvili CM- H₂DCFDA in 7-AAD.....	30
3.6.3	Določanje lipidne peroksidacije z barvilom BODIPY 581/591 C11.....	31
3.7	IMUNODETEKCIJA PROTEINOV	31
3.7.1	Priprava celic za imunodetekcijo proteinov	31
3.7.2	Priprava celičnih lizatov	32
3.7.3	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS	32
3.7.4	Prenos western	32
3.7.5	Označevanje s protitelesi.....	32
3.8	FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA	33
3.8.1	Barvanje lipidnih kapelj z barvilom BODIPY 493/503 in celičnih jeder s Hoechst 33342.....	33
3.9	INFRARDEČA SPREKTROSKOPIJA Z UPORABO FURIERJEVE TRANSFORMACIJE	33
3.9.1	Uporaba infrardeče spektroskopije pri analizi bioloških vzorcev	34
3.9.2	Priprava vzorcev za infrardečo spektroskopijo	35
3.9.3	Infrardeča spektroskopija vzorcev.....	35
3.9.4	Obdelava podatkov	35
4	REZULTATI.....	37
4.1	LASTNOSTI SPIONov	37

4.2	PRISOTNOST SPIONov V CELICAH HUVEC.....	37
4.3	CITOTOKSIČNOST SPIONov.....	38
4.4	VPLIV SPIONov NA KOLIČINO REAKTIVNIH KISI KOVIH ZVRSTI V ŽIVIH CELICAH	40
4.5	VPLIV SPIONov NA KOLIČINO LIPIDNIH KAPELJ V ŽIVIH CELICAH	42
4.6	VPLIV INHIBICIJE ENCIMOV DGAT NA KOLIČINO LIPIDNIH KAPELJ PRI CELICAH, IZPOSTAVLJENIH SPIONom	44
4.7	VPLIV OLEINSKE KISLINE NA TVORBO LIPIDNIH KAPELJ V CELICAH	45
4.8	VPLIV OLEINSKE KISLINE NA CELIČNO SMRT IN KOLIČINO REAKTIVNIH KISI KOVIH ZVRSTI	46
4.9	VPLIV OLEINSKE KISLINE NA S SPIONi POVZROČENO CELIČNO SMRT IN OKSIDATIVNI STRES	47
4.10	VPLIV INHIBICIJE ENCIMOV DGAT NA TVORBO LIPIDNIH KAPELJ OB DODATKU OLEINSKE KISLINE	48
4.11	POMEN RAZGRADNJE LIPIDNIH KAPELJ ZA ZAŠČITNO DELOVANJE OLEINSKE KISLINE	50
4.11.1	Preverjanje uspešnosti utišanja gena za ATGL.....	51
4.11.2	Vpliv utišanja gena za ATGL na količino lipidnih kapelj ob dodatku oleinske kisline.....	51
4.11.3	Vpliv utišanja gena za ATGL na zaščitno delovanje oleinske kisline ob dodatku s SPIONov.....	53
4.12	POMEN TVORBE LIPIDNIH KAPELJ ZA ZAŠČITNO DELOVANJE OLEINSKE KISLINE	53
4.13	VPLI OLEINSKE KISLINE IN SPIONov NA MOLEKUSLKI PROFIL CELIC	54
4.14	VPLIV SPIONov NA LIPIDNO PEROKSIDACIJO	56
4.14	VPLIV OLEINSKE KISLINE NA S SPIONi POVZROČENO LIPIDNO PEROKSIDACIJO.....	57
4.15	VPLIV α -TOKOFEROLA IN FEROSTATINA-1 NA S SPIONi POVZROČENO CELIČNO SMRT, OKSIDATIVNI STRES IN LIPIDNO PEROKSIDACIJO.....	58
4.16	VPLIV SPIONov IN OLEINSKE KISLINE NA KOLIČINO GPX4.....	60
4.17	VPLIV CELIČNE SMRTI NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE	61
5	RAZPRAVA	62
5.1	UČINKI SPIONov NA ENDOTELIJSKE CELICE	62

5.2	ZAŠČITNA VLOGA OLEINSKE KISLINE.....	64
5.3	POMEN VGRADNJE OLEINSKE KISLINE V LIPIDNE KAPLJE	66
5.4	VPLIV SPIONov IN OLEINSKE KISLINE NA FEROPTOZO	67
5.5	VPLIV CELIČNE SMRTI NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE	68
6	SKLEPI.....	70
7	POVZETEK (SUMMARY)	71
7.1	POVZETEK.....	71
7.2	SUMMARY	74
8	VIRI.....	78

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba LK.	12
Slika 2: Signalna pot ferroptoze.....	17
Slika 3: Lastnosti SPIONov.....	37
Slika 4: Endotelijske celice učinkovito privzemajo SPIONE.	38
Slika 5: Citotoksičnost SPIONov.	39
Slika 6: Vpliv SPIONov na celično smrt.....	40
Slika 7: Vpliv SPIONov na količino ROS v živih celicah.	41
Slika 8: Vpliv N-acetilcisteina in α -tokoferola na količino ROS in celično smrt pri celicah, izpostavljenih SPIONom.....	42
Slika 9: Vpliv SPIONov na količino LK v živih celicah.....	43
Slika 10: Vpliv SPIONov na količino LK po različnih časih izpostavitve.	44
Slika 11: Vpliv inhibicije encima DGAT na celično smrt in količino LK pri celicah, izpostavljenih SPIONom.....	45
Slika 12: Vpliv OK na količino LK v živih celicah.	46
Slika 13: Vpliv OK na celično smrt in količino ROS v živih celicah.	47
Slika 14: Vpliv OK na s SPIONi povzročeno celično smrt in oksidativni stres.	48
Slika 15: Vpliv inhibicije encimov DGAT na celično smrt in tvorbo LK z OK.....	49
Slika 16: Vpliv inhibicije encimov DGAT1 in DGAT2 na tvorbo LK ob dodatku OK.	50
Slika 17: Uspešnost utišanja gena za ATGL z uporabo siRNA.	51
Slika 18: Vpliv utišanja gena za ATGL na količino LK.	52
Slika 19: Vpliv utišanja gena za ATGL na zaščitno delovanje OK ob dodatku SPIONov.....	53
Slika 20: Pomen vgradnje OK v LK za njeno protektivno delovanje.	54
Slika 21: IR spektri in razmerja določenih absorpcijskih pasov.	56
Slika 22: Vpliv SPIONov na lipidno peroksidacijo v celicah.	57
Slika 23: Vpliv OK na lipidno peroksidacijo, povzročeno s SPIONi ali z induktorjem ferroptoze RSL3.	58
Slika 24: Vpliv α -tokoferola in ferostatina-1 na s SPIONi povzročeno celično smrt, oksidativni stres in lipidno peroksidacijo.	59
Slika 25: Vpliv SPIONov na ekspresijo proteina GPX4.	60
Slika 26: Vpliv celične smrti na aktivnost AChE v endotelijskih celicah.....	61

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACAT	acil-CoA:holesterol aciltransferaza (ang. Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase)
ACSL	acil-CoA sintetaza dolgoverižnih maščobnih kislin
ACh	acetilholin
AChE	acetilholinesteraza
AChE-E	eritrocitna acetilholinesteraza
AChE-R	ang. readthrough acetylcholinesterase
AChE-S	sinaptična acetilholinesteraza
ANOVA	analiza variance (ang. analysis of variance)
ATGL	adipozna trigliceridna lipaza (ang. adipose triglyceride lipase)
CM-H ₂ DCFDA	5-klorometil-2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
CoQ10	koencim Q10
DAG	diacilglicerol
DGAT	diacilglicerol-aciltransferaza (ang. diacylglycerol acyltransferase)
DLS	dinamično sipanje svetlobe (ang. dynamic light scattering)
DMEM	Eaglovo gojišče po Dulbeccu (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DPBS	Dulbeccov fosfatni pufer (ang. Dulbecco's phosphate-buffered saline)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
ER	endoplazemski retikulum
FBS	serum govejega zarodka (ang. fetal bovine serum)
FSP1	feroptozni supresorski protein 1 (ang. ferroptosis suppressor protein 1)
GPX4	glutation peroksidaza 4
GSH	glutation
HBSS	Hanksova solna raztopina (ang. Hanks' Balanced Salt solution)
HSL	hormonsko odvisna lipaza (ang. hormone sensitive lipase)
HUVEC	humane celice žilnega endotelija, izolirane iz vene popkovnice
IR	infrardeč
LK	lipidne kaplje
MAG	monoacilglicerol
MGL	monoacilglicerol lipaza
MK	maščobna kislina
MMP	mitochondrijski membranski potencial

MRI	slikanje z magnetno resonanco (ang. magnetic resonance imaging)
NAC	N-acetilcistein
N-AChE	acetilholinesteraza, podaljšana na N-koncu
ND	nanodelci
NM	nanomaterial
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NR	nevtralnno rdeče
OK	oleinska kislina
PCA	analiza glavnih komponent (ang. principal component analysis)
PEG	polietilenglikol
PK	palmitinska kislina
PLIN2	gen za perilipin 2
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species)
SD	standardni odklon (ang. standard deviation)
SE	sterolni estri
SEM	standardna napaka povprečja (standard error of the mean)
siRNA	mala interferenčna RNA (ang. small interfering RNA)
SPIONi	superparamagnetni nanodelci železovega oksida (ang. superparamagnetic iron oxide nanoparticles)
TAG	triacilglicerol
TEM	presevna elektronska mikroskopija (ang. transmission electron microscopy)
TEOS	tetraetilortosilikat
UPR	nezviti proteinski odziv (ang. unfolded protein response)
VDAC	napetostno odvisni anionski kanali (ang. voltage-dependent anion channels)
WBR	blokirna raztopina (ang. Western Blocking Reagent)
7-AAD	7-amino-aktinomycin D (ang. 7-amino-actinomycin D)

1 UVOD

Superparamagnetni nanodelci železovega oksida (SPIONi) so skupina nanodelcev (ND), ki imajo jedro iz železovega oksida velikosti od 5 nm do 15 nm in so lahko obdani z različnimi prevlekami (Dulińska-Litewka in sod., 2019). Zaradi svojih superparamagnetnih lastnosti imajo SPIONi velik potencial za uporabo v medicini kot magnetni nosilci zdravil, pri zdravljenju z magnetno hipertermijo, kot kontrastna sredstva pri slikanju z magnetno resonanco in za slikanje s superparamagnetnimi ND (Waddington in sod., 2020; Hedayatnasab in sod., 2020; Samrot in sod., 2021). SPIONi na splošno veljajo za varne in biokompatibilne, vendar nedavne *in vitro* študije kažejo, da imajo lahko na celice kvarne učinke, kot so na primer poškodbe DNK, oksidativni stres, disfunkcija mitohondrijske membrane, spremembe v izražanju genov in lipidna peroksidacija (Patil in sod., 2018; Vakili-Ghartavol in sod., 2020; Wu in sod., 2022). Podrobno razumevanje interakcij med SPIONi in celicami ter novi pristopi za zmanjšanje njihovih neželenih učinkov bi lahko izboljšali njihovo klinično uporabnost.

SPIONi se za medicinske namene običajno aplicirajo intravensko, zato so endotelijske celice, ki prekrivajo krvne žile, med prvimi, ki pridejo v stik z njimi. SPIONi s hidrodinamskim premerom med 10 in 50 nm se v krvnem obtoku lahko zadržujejo do 30 ur (Neuwelt in sod., 2009), zato so učinki SPIONov na endotelijske celice in sposobnost celic, da se spopadejo z izpostavljenostjo SPIONom, zelo pomembni.

Lipidne kaplje (LK) so zelo dinamični citosolni organeli, ki jih najdemo v večini evkariontskih celic. So zelo različne velikosti (od 0,1 do 100 μm). Njihovo jedro je sestavljeno iz nevtralnih lipidov, obdano pa je s fosfolipidnim monoslojem, v katerega so usidrane različne beljakovine (Walther in Farese, 2009). LK nastajajo v endoplazemskem retikulumu (ER) in se lahko prek membranskih kontaktnih mest povežejo tudi z večino drugih celičnih organelov (Olzmann in Carvalho, 2019). Glavna funkcija LK v celici je uravnavanje presnove lipidov, poleg tega pa imajo še številne druge funkcije (Welte in Gould, 2017). Njihova sinteza se v celicah poveča takrat, kadar so celice izpostavljene energijskemu ali redoks neravnovesju, kar nakazuje, da so LK bistvene za obvladovanje celičnega stresa (Jarc in Petan, 2019). Eden glavnih načinov, kako LK nadzorujejo celični stres, je uravnavanje razporejanja, shranjevanja in sproščanja maščobnih kislin (MK) (Petan, 2020). LK na primer nadzorujejo promet z nenasičenimi MK, da ohranijo ustrezno zasičenost membran in preprečijo stres ER med hipoksijo (Ackerman in sod., 2018).

Številne študije so pokazale, da različne vrste ND, med njimi tudi SPIONi, povzročajo kopičenje LK v različnih vrstah celic (Khatchadourian in Maysinger, 2009; Maysinger, 2007; Przybytkowski in sod., 2009; Davoren in sod., 2007; Babele in sod., 2018; Cao in sod., 2014b; Tsukahara in Haniu, 2011; Guo in sod., 2018; Bayat in sod., 2014; Long in sod., 2019; Yang in sod., 2019; Marmorato in sod., 2011; Jarockyte in sod., 2016; Wu in

sod., 2022), obstajajo pa tudi študije, ki kažejo, da ND zmanjšujejo količino LK (Dogra in sod., 2019) ali pa na količino LK nimajo vpliva (Kononenko in sod., 2017). Vesterdal in sod. (2014) so v svoji študiji pokazali, da je bilo povečanje vsebnosti znotrajceličnih lipidov po izpostavljenosti jetrnih celic ND opaženo le, če so bile celice hkrati izpostavljene tudi oleinski kislini (OK) in palmitinski kislini.

Le malo študij, ki so preučevale učinek ND na kopičenje LK, je preučevalo tudi mehanizme, ki kopičenje povzročajo. Rezultati nekaterih študij kažejo, da prihaja do kopičenja lipidov zaradi oksidativnega stresa (Khatchadourian in Maysinger, 2009; Vesterdal in sod., 2014; Yang in sod., 2019; Cao in sod., 2014), medtem ko druge kažejo, da je to lahko povezano z destabilizacijo lizosomov in motnjami lipofagije (Zhao in sod., 2020) ter ER stresom (Long in sod., 2019; Yang in sod., 2019).

Če so LK celični organeli, ki celici pomagajo obvladovati stres, bi lahko domnevali, da so celice, v katerih je sinteza LK predhodno stimulirana z dodajanjem presežka lipidov, bolj zaščitene pred stresom. To sta raziskovala Khatchadourian in Maysinger (2009) in dokazala, da se preživetje celic feokromocitoma, ki so bile izpostavljene ND iz kadmijevega telurida (CdTe), poveča, če so bile celice predhodno izpostavljene OK, ki v celicah spodbuja sintezo LK.

Namen doktorskega dela je bil raziskati, kako SPIONi vplivajo na viabilnost, oksidativni stres, lipidno peroksidacijo in kopičenje LK v endotelijskih celicah *in vitro*. Poleg tega nas je zanimalo, ali lahko predhodno inducirana sinteza LK s pomočjo OK zaščiti endotelijske celice pred kvarnimi učinki SPIONov.

Hipoteze:

1. Predvidevamo, da bodo SPIONi v endotelijskih celicah *in vitro* inducirali sintezo LK.
2. Predvidevamo, da bo OK v celicah HUVEC inducirala sintezo LK in da bodo te LK celice zaščitile pred kvarnimi učinki SPIONov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANOMATERIALI

2.1.1 Definicija nanomaterialov

Nanomateriali (NM) so naravni, naključno nastali ali namensko proizvedeni materiali, katerih osnovni gradniki so nevezani, agregirani ali aglomerirani delci, izmed katerih jih vsaj 50 % v številski porazdelitvi meri med 1 nm in 100 nm v vsaj eni dimenziji. V posebnih primerih, ko je skrb glede okolja, zdravja, varnosti ali konkurenčnosti upravičena, se sme 50 % prag nadomestiti s pragom med 1 in 50 %. Kljub odstopanju od osnovne definicije se kot NM upošteva tudi fullerene, luske grafena in enoplastne ogljikove nanocevke, ki imajo vsaj eno dimenzijo pod 1 nm (Rauscher in sod., 2012).

Pogosto za NM uporabljamo izraze, ki jih je definirala Mednarodna organizacija za standardizacijo, in sicer ND (ang. nanoparticles) za delce katerekoli oblike s tremi zunanjimi dimenzijami med 1 in 100 nm, nanovlakna (ang. nanofibers) za delce katerekoli oblike z dvema zunanjima dimenzijama med 1 in 100 nm ter nanoploščice in nanocevke (ang. nanoplates and nanotubes) za delce katerekoli oblike z eno zunanjo dimenzijo med 1 in 100 nm.

Zaradi svoje majhnosti in posledično visokega razmerja med površino in prostornino, imajo NM specifične optične, magnetne, električne in kemijske lastnosti, ki se razlikujejo od lastnosti večjih delcev z enako kemijsko zgradbo. Prav zaradi svojih specifičnih lastnosti so NM tako močno zastopani na praktično vseh področjih industrije (farmacevtska, kemijska, živilska, avtomobilska, letalska, elektrotehnična, tekstilna, gradbena, naftna itd.) (Prakash Sharma in sod., 2018).

2.1.2 Nanomateriali v medicini

Nanomedicina je veja medicine, ki znanje in orodja nanotehnologije uporablja za diagnosticiranje, preprečevanje in zdravljenje bolezni (Moghimi in sod., 2005). Z uporabo ND in nanotehnologije lahko izboljšamo farmakokinetiko zdravil ter tako povečamo njihovo učinkovitost in varnost (Bobo in sod., 2016; Ventola, 2017). Za namene medicinskega slikanja se NM lahko uporabijo kot kontrastna sredstva pri ultrazvočnem pregledu in slikanju z magnetno resonanco (ang. magnetic resonance imaging, MRI), lahko pa se uporabljajo tudi pri označevanju celic in tkiv za mikroskopijo. Poleg številnih prednosti, ki jih prinaša uporaba nanotehnologije na področju zdravil, prinašajo nanozdravila tudi tveganja. Največje težave predstavljajo pomanjkanje specifične zakonodaje za nanozdravila, njihova neustrezna karakterizacija, vprašljiva

stroškovna učinkovitost ter pomanjkanje natančnega razumevanja njihovega delovanja *in vivo* na sistemski, tkivni in celični ravni (Ventola, 2017; Cegnar, 2012; Bertrand in sod., 2017).

2.1.2.1 Prednosti nanozdravil

Nanozdravila imajo v primerjavi s klasičnimi zdravili številne prednosti. Večino nanozdravil, ki so trenutno v uporabi, predstavljajo predhodno obstoječa zdravila, ki so konjugirana z ND z namenom izboljšanja njihove farmakokinetike in/ali farmakodinamike (Ventola, 2017).

Z zmanjševanjem učinkovine do nanometrskih velikosti lahko pospešimo njeno hitrost raztapljanja in povečamo njeno topnost, s čimer povečamo biološko uporabnost zdravila ter se izognemo uporabi organskih topil, ki so pogosto toksična. Poleg tega z zmanjševanjem velikosti učinkovine povečamo specifično površino delcev in s tem dosežemo večjo reaktivnost, zaradi česar za enak terapevtski učinek potrebujemo manjši odmerek zdravila. Po drugi strani lahko zdravilno učinkovino vgradimo v ND in jo s tem zaščitimo pred encimsko razgradnjo ter upočasnimo njeno izločanje skozi ledvice, saj so ND večji v primerjavi s prosto molekulo učinkovine. S tem podaljšamo razpolovni čas učinkovine in omogočimo manj pogosto aplikacijo zdravila. Vgradnja učinkovine v ND omogoča tudi bolj ciljno dostavo učinkovine. Majhne molekule učinkovine lahko prosto difundirajo skozi stene kapilar, medtem ko lahko ND prehajajo endotelno steno samo takrat, kadar je prepustnost žilnega endotelija povečana, kar se zgodi pri vnetju in v rakavem tkivu. Pojav, da se ND bolj kopičijo in dlje časa zadržujejo v določenem tkivu, imenujemo učinek povečane prepustnosti in zadrževanja ali učinek EPR (ang. Enhanced Permeation and Retention). Tarčno dostavo v druga tkiva in organe lahko dosežemo z vezavo specifičnih ligandov na ND, zaradi česar se ND specifično vežejo na receptorje na tkivu ali organu (Cegnar, 2012).

Poleg zgoraj opisanih vplivov na farmakokinetiko, lahko ND izboljšajo tudi farmakodinamiko zdravil. Nekateri ND lahko vplivajo na imunski odziv in povečajo učinkovitost cepiv. Z vezavo antigenov na ND lahko povečamo njihov privzem v dendritične celice, ki antigen predstavijo na svoji površini in s tem sprožijo imunski odziv preko limfocitov T (Zupančič in sod., 2017; Ventola, 2017).

2.1.2.2 Pomembne lastnosti nanodelcev za medicinsko uporabnost

Glavne lastnosti ND, ki vplivajo na njihovo medicinsko uporabnost, so predvsem kemijska sestava, velikost, oblika, površinska prevleka in naboj, saj te lastnosti ND po aplikaciji zdravila v človeškem telesu vplivajo na vezavo proteinov na ND, na

farmakokinetiko ND in na njihov privzem v celice (Ventola, 2017). Z variiranjem omenjenih lastnosti lahko izdelamo take ND, ki so najbolj primerni za določen namen. Za očistek ND je zelo pomembna njihova velikost. Manjši ND (< 10 nm) se iz telesa izločajo preko ledvic, večji ND (> 10 nm) pa preko mononuklearnega fagocitnega sistema. Pri kontrastnih sredstvih si navadno želimo, da je izločanje ND čim hitreje, saj je pomembno, da je signal ozadja čim manjši. Pri večini zdravilnih učinkovin pa želimo čim daljši razpolovni čas, zato je pomembno, da so uporabljeni ND dovolj veliki.

V biološkem okolju se na ND adsorbirajo različne biomolekule, med katerimi največji delež predstavljajo proteini, ki na ND tvorijo t.i. proteinsko korono. Številne študije so potrdile, da proteinska korona močno vpliva na interakcijo med ND in celicami ter posledično na vpliv, ki ga imajo ND na celice. Z izbiro površinske prevleke na ND lahko vplivamo na zgradbo proteinske korone. Funkcionalizacija ND s hidrofilnimi skupinami z visoko molekularno maso (npr. pegiliranje in glikozilacija) zmanjša količino ter spremeni sestavo vezanih proteinov, posledično pa podaljša razpolovni čas ND (Hadjidemetriou in Kostarelos, 2017). Do sedaj so zmanjšan plazemski očistek pegiliranih ND pripisovali predvsem zmanjšani vezavi opsoninov na ND (Partikel in sod., 2019), nekatere študije pa so pokazale, da so pri tem udeleženi tudi apolipoproteini (Bertrand in sod., 2017).

Na renalni očistek pomembno vpliva tudi naboj ND. ND, ki imajo samo kationski ali samo anionski naboj, zelo dobro adsorbirajo serumske proteine, zaradi česar se močno poveča njihov hidrodinamski premer; večja velikost ND pa ima za posledico zmanjšano glomerulno filtracijo. Površinske prevleke ND, ki imajo ionski značaj dvojčkov (ang. zwitterion), preprečujejo vezavo serumskih proteinov, kar olajša glomerulno filtracijo. Primerjava enako velikih molekul z različnimi naboji je pokazala, da se z glomerulno filtracijo v največji meri izločajo kationske molekule, sledijo nevtralne molekule, pri anionskih molekulah pa je delež filtracije najmanjši (Longmire., 2008).

2.1.2.3 Nanozdravila na tržišču in v fazi kliničnih testiranj

Večino nanozdravil, ki so že v klinični uporabi, predstavljajo protimikrobna in onkološka zdravila. Trenutno je zelo veliko nanozdravil v fazi kliničnega preizkušanja, med njimi pa so poleg protimikrobnih in onkoloških zdravil tudi zdravila za zdravljenje avtoimskih bolezni, anestetiki, zdravila za metabolne bolezni, oftalmološka zdravila ter zdravila za nevrološke in psihične bolezni (Ventola, 2017). Pri večini so osnova liposomi ali polimerni ND, vse več pozornosti pa se namenja micelom, dendrimerom in ND na proteinski osnovi. Formulacije z nanokristali in anorganiskimi ND so večinoma funkcionalizirane tako, da zunanja prevleka čim bolj preprečuje vezavo biomolekul, torej nastanek »biokorone«. Pri tem zlati standard še vedno predstavlja vezava PEG, velik potencial pa kažejo tudi ioni-dvojčki (ang. zwitterions) in fluorirane molekule (Sanchez-

Cano in Carril, 2020). Medtem ko večina že obstoječih nanozdravil za doseg tarčnega tkiva ali organa uporablja predvsem pasivno ciljanje preko EPR učinka, se pri nanozdravilih v razvoju vedno več poslužujejo tudi aktivnega ciljanja z vezavo specifičnih ligandov (npr. protiteles) (Ventola, 2017).

2.1.3 Superparamagnetni nanodelci železovih oksidov

SPIONi predstavljajo skupino ND, ki imajo železooksidno jedro velikosti med 5 nm in 15 nm, obdani pa so lahko z različnimi prevlekami (Dulińska-Litewka in sod., 2019). Sredico SPIONov lahko tvorijo trije različni železovi oksidi: magnetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) in hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Superparamagnetizem je oblika magnetizma, značilna za dovolj majhne feromagnetne ali ferimagnetne ND. Superparamagnetni delci v prisotnosti zunanega magnetnega polja izkazujejo magnetne lastnosti, v njegovi odsotnosti pa ne (Bobnar, 2018). SPIONi imajo zaradi svojih superparamagnetnih lastnosti velik potencial za uporabo v medicini, saj jih lahko uporabimo kot magnetne nosilce učinkovin, pri zdravljenju z magnetno hipertermijo, kot kontrastna sredstva pri slikanju z magnetno resonanco ter za metodo slikanja s superparamagnetnimi nanodelci (Dulińska-Litewka in sod., 2019). Večina študij je pokazala, da so SPIONi biokompatibilni in da imajo ugoden varnostni profil, hkrati pa zaenkrat ni mogoče izključiti možnih zakasnenih toksičnih učinkov zaradi povečanega oksidativnega stresa (Patil in sod., 2018; Wei in sod., 2021). Trenutno je v klinični uporabi nanoterapevtik s SPIONi ferumoksitol (zaščiteni imeni Feraheme® in Rienso®), ki je indiciran za zdravljenje anemije zaradi pomanjkanja železa pri odraslih bolnikih s kronično ledvično boleznijo (Farjadian in sod., 2019). Od leta 2011 je uradno odobrena terapija NanoTherm® podjetja MagForce AG za zdravljenje možganskih tumorjev v vseh državah članicah Evropske unije. Terapija NanoTherm temelji na magnetni hipertermiji s SPIONi, prevlečenimi s silicijevim dioksidom (Maier-Hauff in sod., 2011). Poleg tega Nekateri SPIONi so še v fazi kliničnih testiranj, nekaj pa je takih, ki so že bili v klinični uporabi, a so bili zaradi stranskih učinkov umaknjeni s tržišča (Wahajuddin in Arora, 2012; Mahmoudi in sod., 2011).

2.1.3.1 Farmakokinetika in farmakodinamika SPIONov

SPIONE, namenjene medicinski uporabi, se najpogosteje aplicira intravensko. Po intravenski aplikaciji se SPIONi v krvnem obtoku obdajo s številnimi biomolekulami. Največji delež predstavljajo proteini, ki tvorijo t.i. proteinsko korono. Med proteini, ki sestavljajo proteinsko korono, so tudi opsonini (proteini komplementa, fibrinogen, imunoglobulini). Opsonizirane SPIONE hitro prepoznajo in fagocitirajo makrofagi, s čimer se SPIONi izločijo iz krvnega obtoka in vstopijo v mononuklearno fagocitni sistem (Nguyen in Lee, 2017; Feng in sod., 2018; Sakulku in sod., 2014). Farmakokinetika in farmakodinamika SPIONov sta v veliki meri odvisni od njihovih fizikalno-kemijskih

lastnosti. Pri njihovi porazdelitvi po telesu in izločanju iz telesa ima zelo pomembno vlogo njihov hidrodinamski premer. SPIONe, katerih hidrodinamski premer presega 100 nm, zelo hitro fagocitirajo makrofagi in jih uskladiščijo v jetra in vranico, za tiste, pri katerih je hidrodinamski premer manjši od 10 nm, pa velja, da se bodo verjetno hitro izločili iz telesa preko ledvic. Delci, katerih hidrodinamski premer znaša med 10 in 50 nm, zaradi počasnejše opsonizacije dlje časa ostanejo v krvnem obtoku, kasneje pa se tudi počasneje izločijo iz jeter in vranice (Feng in sod., 2018). Poleg velikosti je izrednega pomena tudi površinska prevleka delcev. Neprevlečeni SPIONi so koloidno izjemno nestabilni, zato se za njihovo stabilizacijo uporabljajo prevleke iz različnih materialov (dekstran, citronska kislina, Pluronic®, PEG, polietilenimin, silicijev dioksid). Od prevleke ND, ki vpliva na njihov ζ -potencial (razlika v potencialu med disperzijskim medijem in stacionarno plastjo tekočine na dispergiranjem delcu) in tudi na večino ostalih kemijskih lastnosti ND, je v veliki meri odvisno, kako hitro bo potekla opsonizacija ND, kakšen bo privzem ND v celice in kakšni bodo njihovi toksični učinki (Feng in sod., 2018; Wu in sod., 2010; Orlando in sod., 2015). Framakokinetične študije so pokazale, da Pluronic® in PEG na površini SPIONov precej zmanjšata njihov očistek (Longmire in sod., 2008).

Tako kot pri farmakokinetiki ND tudi pri njihovi farmakodinamiki, torej učinku na organizem, bistveno vlogo igrajo lastnosti ND, kot na primer sestava sredice, velikost, oblika, površinska prevleka in naboj. Študija z različnimi železooksidnimi ND je pokazala, da ND z jedrom iz Fe_2O_3 povzročajo manj apoptoze zarodnih celic kot ND z jedrom iz Fe_3O_4 ali Fe_2O_4 (Elkhenany in sod., 2020). Vloga velikosti SPIONov na njihov učinek na celice ostaja nepojasnjena. Nedavna študija (Wu in sod., 2022) je preučevala vpliv velikosti zelo majhnih Fe_3O_4 ND na povzročanje oksidativnega stresa pri humani celični liniji raka dojke MCF-7. Ugotovili so, da zelo majhni Fe_3O_4 ND velikosti 2,3 in 4,2 nm v celicah povzročajo oksidativni stres zaradi tvorbe izredno reaktivnih hidrokislinskih radikalov $\bullet\text{OH}$, medtem ko pri Fe_3O_4 ND velikosti 9,3 nm nismo zaznali kvarnih učinkov na celice. Mahmoudi in sod. (2009) so pokazali, da na toksičnost SPIONov neposredno vpliva tudi njihova oblika. SPIONi v obliki kroglic so bili bolj toksični za celice kot SPIONi v obliki paličic. Po drugi strani so Lee in sod. (2014) pokazali, da so železooksidni ND v obliki paličic bolj strupeni kot železooksidni ND v obliki kroglic.

2.1.3.2 SPIONi in celice: privzem, metabolizem, izločanje

Hitrost privzema SPIONov v celice *in vitro* je koncentracijsko odvisna in poteka hitreje pri višjih koncentracijah SPIONov. Količina privzetih SPIONov s časom narašča, hitrost privzema pa se po 24 urah precej zmanjša. Vloga velikosti SPIONov na njihov privzem ostaja nepojasnjena, saj so rezultati študij nasprotujoči (Wei in sod., 2021). Privzem

SPIONov je odvisen predvsem od njihove prevleke in posledično naboja; privzem je najbolj učinkovit pri pozitivno nabitih delcih, sledijo negativno nabiti delci, najslabši pa je privzem nevtralnih delcev (Fröhlich, 2012). Za privzem je pomembna tudi oblika; študija s sferičnimi železooksidnimi ND in železooksidnimi nanožičkami je pokazala, da je privzem sferičnih ND petkrat večji (Sherwood in sod., 2016). SPIONi lahko vstopajo v celice preko različnih tipov endocitoze, pri čemer je tip endocitoze odvisen predvsem od velikosti SPIONov. Nastali endocitotski vezikel se v celici zlije z zgodnjim endosomom, ki v procesu zorenja prehaja skozi več zaporednih stopenj in se postopoma spremeni v lizosom (Wei in sod., 2021). Kisli pH lizosoma (~ 4,5) povzroči raztapljanje železooksidnega jedra (Gutiérrez in sod., 2015), prosti železovi ioni pa se nato preko transporterja dvovalentnih kovin 1 transportirajo v citosol (Huang in sod., 2013; Singh in sod., 2010). V citosolu se večji del železa v nereaktivni obliki (Fe^{3+}) veže na feritin, ki je glavna beljakovina za shranjevanje železa na celični in organski ravni, lahko pa se veže tudi v hem ali železovo-žveplove klastre (Mackenzie in sod., 2008; Hohnholt in Dringen, 2013). Curcio in sod. (2019) so v svoji študiji pokazali, da lahko v humanih zarodnih celicah pride do ponovne sinteze magnetnih ND iz železovih ionov *in situ*. Pri celicah, ki skladiščijo ali prenašajo železo, lahko železovi Fe^{2+} ioni zapustijo celico preko transmembranskega proteina feroportina (Hohnholt and Dringen, 2013; Dunn et al., 2007).

2.1.3.3 Učinki železooksidnih nanodelcev na endotelijske celice *in vitro*

SPIONE za biomedicinsko uporabo se navadno aplicira intravensko ali intraarterijsko, zato so endotelijske celice ene izmed prvih celic, ki pridejo v stik z njimi. SPIONi s hidrodinamskim premerom med 10 in 50 nm se lahko dolgo zadržujejo v krvnem obtoku (razpolovni čas za ferumoksitol je 14 ur, za ferumokstran 24-30 ur (Neuwelt in sod., 2009)), zato je smiselno preveriti, kakšna je interakcija med SPIONi ter drugimi železooksidnimi ND in endotelijskimi celicami.

Študija z neprevlečenimi maghemitnimi ND s hidrodinamskim premerom med 100 in 700 nm je pokazala, da je pri endotelijskih celicah, ki so bile izpostavljene tem ND s koncentracijo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ od 10 minut do 5 ur, prišlo do preoblikovanja mikrotubulov zaradi oksidativnega stresa (Apopa in sod., 2009). Druga študija z neprevlečenimi železooksidnimi ND s primarno velikostjo (primarna velikost je velikost najmanjšega diskretnega elementa v sistemu delcev; najpogosteje jo določamo s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM)) od 20 do 40 nm je pokazala, da so delci s koncentracijo 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ po 24 urah v endotelijskih celicah sprožili sintezo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), kar je porušilo aktinski citoskelet in spremenilo morfologijo celic (Buyukhatipoglu in Clyne, 2011).

Neprevlečeni železooksidni ND so v vodnem mediju koloidno nestabilni, zato se pri

tistih, ki so namenjeni medicinski aplikaciji, uporabljajo različni tipi prevlek (npr. citronska kislina, PEG, polisaharidi). Tip prevleke ima velik vpliv na fizikalno-kemijske lastnosti ND, zato študije na endotelijskih celicah pogosto preverjajo vpliv železooksidnih ND z določeno prevleko ali pa primerjajo vpliv različnih prevlek. Spodaj so opisane tri različne študije, ki so preverjale, kako prevleka ND vpliva na njihovo celično internalizacijo in citotoksičnost.

V prvi študiji so testirali dvoje različno prevlečenih SPIONov: eni so bili prevlečeni le z amfifilnim polimerom in so imeli hidrodinamski premer 16 nm, drugi pa so bili še dodatno prevlečeni s PEG in so imeli hidrodinamski premer 23 nm. Rezultati študije so pokazali, da so ND prevlečeni s PEG v manjši meri vstopali v endotelijske celice in bili posledično zanje tudi manj toksični (Orlando in sod., 2015).

Druga študija je testirala 3 različno prevlečene SPIONE, in sicer SPIONE prevlečene z lavrinsko kislino in stabilizirane v raztopini BSA (SPION-LA), SPIONE prevlečene z lavrinsko kislino in BSA (SPION-LA-BSA) in SPIONE prevlečene z dekstranom (SPION-Dex). Ko so SPIONE testirali pri klasičnih statičnih *in vitro* pogojih, so SPIONi-LA pri koncentraciji 50 µg/mL po 24 urah zmanjšali viabilnost endotelijskih celic, medtem ko SPIONi-LA-BSA in SPIONi-Dex tudi po 72 urah pri koncentraciji 100 µg/mL niso vplivali na njihovo viabilnost. Če so bile endotelijske celice izpostavljene SPIONom v toku, so enako dobro prenašale vse tri vrste SPIONov. Avtorji študije to pojasnjujejo s hitrejšo sedimentacijo SPIONov-LA pri statičnih pogojih, zaradi česar je njihova efektivna koncentracija v bližini celičnega monosloja večja kot v primeru SPIONov-LA-BSA in SPIONov-Dex (Matuszak in sod., 2015a).

Podobne rezultate so dobili tudi v študiji, kjer so testirali tri različno prevlečene SPIONE, in sicer SPIONE prevlečene z lavrinsko kislino (SPION-LA) s hidrodinamskim premerom 45 nm, SPIONE prevlečene z lavrinsko kislino in humanim serumskim albuminom (SPION-LA-HSA) s hidrodinamskim premerom 57 nm ter SPIONE prevlečene z dekstranom (SPION-Dex) s hidrodinamskim premerom 79 nm. Pokazali so, da je privzem in citotoksičnost SPIONov pri celicah HUVEC močno odvisna od prevleke na SPIONih. Pri najvišji testirani koncentraciji SPIONov (75 µg/mL) je bil privzem SPIONov-LA po 24 urah do 6-krat višji od privzema SPIONov-LA-HSA in SPIONov-Dex. Rezultati testov viabilnosti so pokazali, da je bila viabilnost HUVEC celic po 24-urni izpostavljenosti najvišji koncentraciji SPIONov (75 µg/mL) pri SPIONih-LA-HSA in SPIONih-Dex približno 60 %, viabilnost pri izpostavljenosti SPIONom-LA pa je znašala manj kot 20 %. Podobno kot v prej opisani študiji (Matuszak in sod., 2015a) so omenjene razlike verjetno vezane predvsem na *in vitro* pogoje, saj avtorji študije razliko v privzemu in toksičnosti pripisujejo predvsem večji hitrosti sedimentacije SPIONov-LA v primerjavi s SPIONi-LA-HSA in SPIONi-Dex pri danih eksperimentalnih pogojih (celice HUVEC so gojili v mediju z 2 % V/V FBS) (Poller in sod., 2017).

V nadaljevanju so opisane študije, ki so poročale o različnih učinkih železooksidnih ND na endotelijske celice *in vitro*.

Wu in sodelavci (2010) so na endotelijskih celicah testirali SPIONe prevlečene s citratom in SPIONe prevlečene z dekstranom, katerih primarna velikost je znašala 38 nm in 31 nm. Ugotovili so, da SPIONi pri koncentracijah od 0,1 do 1 mM po 1 uri povzročajo koncentracijsko odvisno zmanjšanje viabilnosti celic in zmanjšujejo njihovo sposobnost angiogeneze.

Vpliv SPIONov na sposobnost angiogeneze so testirali tudi Mulens-Arias in sodelavci (2019). Pokazali so, da SPIONI prevlečeni s polietileniminom pri koncentraciji 6,25 $\mu\text{g/mL}$ v mišjih in humanih endotelijskih celicah spodbujajo vnetni odziv ter zmanjšujejo sposobnost angiogeneze.

Su in sod. (2012) so v svoji študiji preučevali vpliv magnetitnih ND in ugotovili, da se ND po 48 urah internalizirajo v celice HUVEC. Pri koncentracijah od 1 do 200 $\mu\text{g/mL}$ ND na celice niso imeli vpliva, pri koncentraciji 400 $\mu\text{g/mL}$ pa so zmanjšali proliferacijo celic.

V eni izmed študij so testirali vpliv kontrastnega sredstva Endorem®, ki je bil v preteklosti na voljo za klinično uporabo. Gre za SPIONe s hidrodinamskim premerom 150 nm, prevlečene z dekstranom. Pri testiranju *in vivo* relevantnih koncentracij so ugotovili, da se SPIONi hitro internalizirajo v endotelijske celice. Pri koncentraciji 2 mM po 24 urah sicer ne povzročajo citotoksičnosti, lahko pa oslabijo integriteto endotelija, saj povečujejo razmak med celicami. Povzročajo tudi strukturne spremembe v celicah, kar zmanjša sintezo NO, ki ima citoprotektivno in protivnetno funkcijo (Astana in sod., 2014).

Študija s SPIONi, prevlečenimi z lavrinsko kislino (SPION-LA) in hidrodinamskim premerom 126 nm, je pokazala, da SPIONi-LA ne vplivajo na viabilnost endotelijskih celic, se je pa pri najvišji testirani koncentraciji (60 $\mu\text{g/mL}$) pokazalo, da zmanjšujejo adherentnost celic (Matuszak in sod., 2015b).

Wen in sod. (2019) so testirali maghemitne ND $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, prevlečene s poliglukoza sorbitol karboksimetilnim etrom (PSC- Fe_2O_3) in hidrodinamskim premerom 58 nm. Pri testiranih koncentracijah do 600 $\mu\text{g/mL}$ PSC- Fe_2O_3 niso zmanjšali celične viabilnosti pri HUVEC celicah, so pa signifikantno spremenili morfologijo celic in spodbudili njihovo transformacijo v mezenhimske celice.

Toropova in sod. (2017) so testirali tri različne železooksidne ND: neprevlečene ND s premerom 43 nm, $\text{Fe}_m\text{O}_n\text{-SiO}_2$ kompozite kosmičaste oblike s premerom 98 nm in $\text{Fe}_m\text{O}_n\text{-}$

SiO₂ kompozite kroglaste oblike s premerom 101 nm pri treh različnih odmerkih (0,7 µg, 7 µg in 70 µg). Rezultati testiranja celične viabilnosti po 48-urni izpostavljenosti ND so pokazali, da prisotnost SiO₂ povečuje citotoksičnost. Vsi trije ND v najvišjem odmerku so znižali sposobnost citokeneze.

Poller in sod. (2018) so preverjali vpliv zelo majhnih železooksidnih ND s premerom od 4 do 8 nm s koncentracijama 0,4 in 0,8 mM. Po 24, 48 in 72 urah ND pri celicah HUVEC niso vplivali na celično viabilnost, je pa po 48 urah zaradi sproščanja železovih ionov v celicah prišlo do močnega povečanja koncentracije feritina, ki v evkariontskih celicah predstavlja poglavitno mesto za skladiščenje železa.

V eni izmed študij poročajo o zaščitnem delovanju SPIONov, prevlečenih z dekstranom (SPION-Dex). Pokazali so, da se SPIONi internalizirajo v celice HUVEC, pri čemer nimajo citotoksičnih učinkov, sprožijo pa avtofagijo. Preko sprožanja avtofagije lahko SPIONi-Dex zmanjšajo negativne učinke H₂O₂, kot je zmanjšana viabilnost celice in povečana sinteza NO (Duan in sod., 2019).

V nadaljevanju sta opisani dve študiji, kjer SPIONi na endotelijske celice niso imeli vpliva ali pa je bil vpliv zelo majhen.

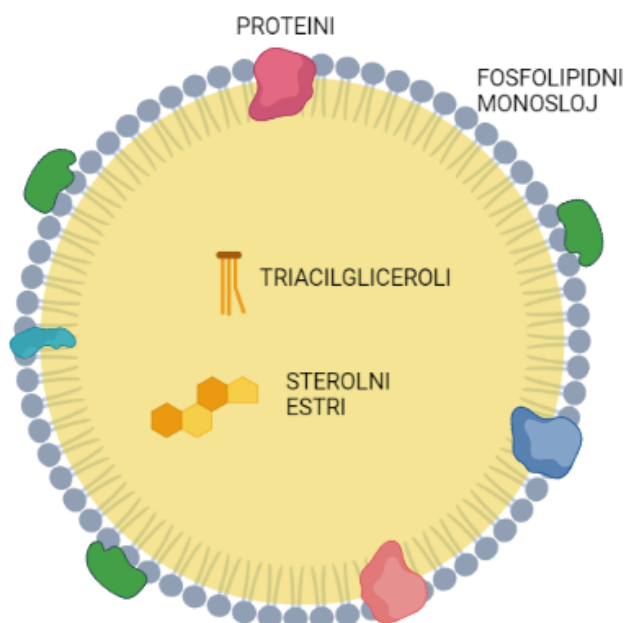
Prva študija je testirala SPIONE prevlečene s kopolimerom akrilne in maleinske kisline (SPION-PAM) s hidrodinamskim premerom 129 nm. Celice HUVEC so po 48-urni izpostavljenosti SPIONom-PAM s koncentracijo 30 µg Fe/mL privzele veliko ND, kljub temu pa niso izmerili statistično značilnih razlik pri meritvah integritete celične membrane, celične smrti in vpliva na celični cikel (Friedrich in sod., 2016).

V študiji, ki je proučevala vpliv železooksidnih ND premera 10 nm z vezanim metronidazolom pri koncentracijah do 150 µg/mL, so po 48 urah opazili le majhen učinek na celično viabilnost, proliferacijo in metabolizem (Filippi in sod., 2019).

Rezultate navedenih študij je med sabo težko primerjati, saj se preiskovani železooksidni ND med sabo precej razlikujejo v fizikalno-kemijskih lastnostih. Tudi njihove koncentracije in izpostavitveni časi se med posameznimi študijami razlikujejo. Kljub temu lahko na podlagi rezultatov navedenih študij zaključimo, da imajo SPIONi potencialen vpliv na endotelijske celice. Njihov vpliv na celice je v veliki meri pogojen z njihovo velikostjo in tipom prevleke, vendar pa so potrebne nadaljnje študije, da bi lahko zaključili, kakšen pomen ima posamezna lastnost ND na njihov biološki vpliv.

2.2 LIPIDNE KAPLJE

LK so celični organeli, ki v svojem jedru shranjujejo nevtralne lipide, kot so triacilgliceroli (TAG) in sterolni estri (SE). Celice energijo najbolj učinkovito shranjujejo v obliki maščob, zato praktično vsi evkarionti in prokarionti tvorijo energetske zaloge v obliki kapljic, napoljenih z lipidi. Ker je notranjost LK hidrofobna, so obdane s fosfolipidnim monoslojem, pri čemer so hidrofobne acilne verige fosfolipidov v stiku z jedrom LK, polarne glave fosfolipidov pa so obrnjene proti citosolu. V fosfolipidni monosloj so usidrani različni integralni proteini, na površini pa se nahajajo periferni proteini. Najpomembnejši proteini na LK so perilipini. Gre za družino proteinov, ki uravnavajo interakcije LK z drugimi organeli in lipolizo. Poleg perilipinov so na LK prisotni tudi drugi proteini, ki uravnavajo sintezo in razgradnjo LK.



Slika 1: Zgradba LK.

LK so sestavljene iz nevtralnega jedra, ki ga sestavljajo predvsem TAG in SE. Nevtralno jedro obdaja fosfolipidni monosloj, v katerega so usidrani številni proteini. Periferni proteini se nahajajo na površini LK.

LK so dinamični celični organeli, katerih sestava, velikost in število se v celici spreminjajo glede na metabolično stanje celice. V zadnjih nekaj letih se je izkazalo, da LK niso zgolj zaloga lipidov, ampak imajo tudi pomembno vlogo pri vzdrževanju celične homeostaze. Udeležene so v različne celične procese, in sicer pri metabolizmu lipidov in proteinov, imunskem odzivu, celični signalizaciji, uravnavanju izražanja genov in odzivu celice na različne stresorje. LK interagirajo s praktično vsemi celičnimi organeli, in sicer z endoplazemskim retikulumom (ER), jedrom, lizosomi, peroksisomi, Golgijevim aparatom, mitohondriji in z drugimi LK. Predpostavljajo celo, da lahko posamezna LK interagira z več organeli hkrati. Natančna zgradba stikov med LK in drugimi organeli še

ni povsem poznana; vključeni so proteini, ki se vežejo na zunanji fosfolipidni monosloj organelov in LK, lahko pa nastanejo tudi membranski mostički. Preko mostičkov lahko pride do direktnega in učinkovitega prenosa lipidov med organeli (Olzmann in Carvalho, 2019; Welte and Gould, 2017; Petan, 2020).

2.2.1 Sinteza lipidnih kapelj

Kljub temu, da za to še ni trdnih dokazov, trenutno velja, da sinteza LK poteka v ER, saj so encimi za sintezo nevtralnih lipidov, ki tvorijo jedro LK, lokalizirani predvsem v ER, membrane ER pa pogosto najdemo v bližini LK. Tvorba LK ne poteka na naključnih mestih v membrani ER, ampak gre za točno določena mesta na membrani s specifično sestavo lipidov, ukrivljenostjo in nabojem, na kar vpliva protein FIT2 (ang. fat storage-inducing transmembrane protein 2). V sesalskih celicah končni korak sinteze TAG iz diacilglicerola (DAG) katalizirata encima diacilglicerol-aciltransferaza 1 in 2 (DGAT1 in DGAT2), končni korak sinteze SE pa katalizirata encima acil-CoA:holesterol aciltransferaza 1 in 2 (ACAT1 in ACAT2). Sintetizirani TAG in SE nalagajo v sredici membranskega dvosloja ER in oblikujejo t.i. lipidno lečo. Lipidna leča lahko raste na dva načina, in sicer preko sinteze nevtralnih lipidov blizu nastajajoče LK ali preko rasti večjih lipidnih leč na račun manjših po principu Ostwaldove rasti (večje kapljice ali delci rastejo na račun manjših). Pri rasti lipidne leče je udeležen seipin, to je integralni protein, ki se nahaja v membrani ER. Ko je površinska napetost monosloja na LK primerljiva s površinsko napetostjo dvosloja ER, se lipidna leča spontano preoblikuje v sferično LK in obdana z enim slojem membranskega dvosloja ER vzbrsti ter se odcepi v citosol. Pogosto se zgodi, da se LK ne odcepi v celoti, ampak ostane povezana z ER. Novonastale LK imajo običajno premer od 100 do 200 nm, kasneje pa lahko dosežejo tudi do 5 μm , v adipocitih celo do 100 μm (Jackson, 2019; Gao in sod., 2019).

2.2.2 Razgradnja lipidnih kapelj

Razgradnja LK poteka na dva načina, in sicer z lipolizo ali z lipofagijo. Prevladujoči mehanizem razgradnje LK je odvisen od razpoložljivosti hranil in pogojev, v katerih se celica nahaja.

Lipoliza LK je hormonsko reguliran proces, pri katerem s pomočjo lipaz poteka hidroliza TAG, pri tem pa se sprostijo glicerol in tri MK. V prvem koraku adipozna trigliceridna lipaza (ATGL) katalizira hidrolizo TAG na MK in DAG. Delovanje ATGL omejuje perilipin 1, ki se nahaja na membrani LK. V obdobju stradanja proteinska kinaza A fosforilira perilipin, njegova fosforilacija pa sproži lipolizo. V drugem koraku lipolize hormonsko odvisna lipaza (ang. "hormone sensitive lipase", HSL) katalizira hidrolizo DAG na MK in monoacilglicerol (MAG). V tretjem koraku monoacilglicerol lipaza

(MGL) katalizira hidrolizo MAG na MK in glicerol. Med procesom lipolize se LK skrčijo, njihova površina pa zmanjša. Zaenkrat še ni znano, kaj se zgodi z odvečnimi proteini in fosfolipidi iz fosfolipidnega monosloja. Možno je, da se resorbirajo v ER ali da pride do njihove razgradnje. Najbolje preučena je lipoliza v adipocitih. Zanj velja, da jo inducirajo hormoni glukagon, adrenalin, noradrenalin, rastni hormon in kortizol, zavirajo pa jo inzulin, inzulinu podobni rastni faktorji in nekatere snovi, kot na primer laktat, adenozin in niacin (Walther in Farese, 2009; Tuohetahuntala in sod., 2016; Rabhi in sod., 2016).

Lipofagija je tip selektivne avtofagije. Pri lipofagiji pride do zajetje LK v avtofagosom, nato pa do zlivanja avtofagosoma z lizosomi, pri čemer nastane avtolizosom. V avtolizosomu poteka encimska razgradnja LK. Lipide razgrajuje lizosomska lipaza, lizosomske fosfolipaze in peptidaze pa razgradijo fosfolipide in proteine LK (Kounakis in sod., 2019). Encim ATGL, ki ima glavno vlogo pri lipolizi LK, je udeležen tudi pri lipofagiji. Poleg tega so v procesu lipofagije pomembni tudi GTPazo aktivirajoči regulacijski proteini Rab, in sicer Rab7 in Rab10 (Shin, 2020).

2.2.3 Funkcija lipidnih kapelj

Najbolj poznana naloga LK v celicah je skrb za metabolizem maščob, saj usmerjajo njihov privzem, razporejanje, skladiščenje in porabo. Poleg tega so LK udeležene tudi pri odzivu celice na različne tipe stresa, uravnavajo jedrno funkcijo in ekspresijo genov ter predstavljajo pomembno zalogo lipidnih mediatorjev (tj. bioaktivnih lipidov) in njihovih prekurzorjev.

V obdobjih, ko celici primanjkuje hranil, ter v času celične rasti, ko se količina celične membrane povečuje in je pospešena sinteza fosfolipidov, LK predstavljajo pomembno zalogo energije in gradnikov za sintezo membran. MK, ki so v obliki TAG shranjene v sredici LK, se ob povečanih potrebah celice lahko mobilizirajo preko dveh katabolnih poti, in sicer z lipolizo ali lipofagijo. Ob pomanjkanju glukoze proste MK vstopajo v mitohondrije, kjer poteka β -oksidacija.

LK ščitijo celice pred presežkom MK, ki v celicah povzročajo t.i. lipotoksičnost. Proste MK namreč lahko delujejo kot detergenti, ki poškodujejo celično membrano, ali pa se vgradijo v lipide, ki v visokih koncentracijah delujejo citotoksično (npr. ceramid, acilkarnitin in DAG). Če se proste MK v obliki TAG vgradijo v LK, to prepreči njihove škodljive učinke na celico (Welte in Gould, 2017; Olzmann in Carvalho, 2019).

Med oksidativnim stresom LK ščitijo celico tako, da uskladiščijo poškodovane in oksidirane lipide (Bailey in sod., 2015; Liu in sod., 2015) ter polineneasičene MK, ki bi se sicer vgradile v celično membrano in bile tam bolj podvržene lipidni peroksidaciji

(Bailey in sod., 2015).

LK so vključene tudi v odziv celice na ER stres. ER ima v celici osrednjo vlogo pri sintezi, shranjevanju in izločanju beljakovin in lipidov, pomemben pa je tudi za dinamiko kalcija. Kadar pride v celici do neravnovesja v zvijanju proteinov, privzemu kalcija ali sestavi lipidov, to povzroči stres ER. Celice se s stresom ER spopadajo tako, da aktivirajo t.i. nezviti proteinski odziv (ang. unfolded protein response, UPR). Aktivacijo UPR v sesalskih celicah povzročijo tudi motnje v sintezi TAG in LK, mehanizem pa zaenkrat še ni znan. Ena od možnosti je, da bi lahko nepravilno shranjevanje MK aktiviralo UPR in zaradi spremenjene homeostaze ER povzročilo okvare pri zvijanju beljakovin in shranjevanju kalcija v ER. Druga možnost je, da bi neustrezno skladiščenje MK povzročilo nepravilno lipidno sestavo membrane ER, kar neposredno aktivira UPR in ni odvisno od sprememb v zvijanju proteinov. Čeprav trenutno velja, da je aktivacija UPR pri motnjah sinteze LK posledica motenj lipidov, ne moremo izključiti obstoja drugih mehanizmov. Povezava med LK in ER stresom ni le enosmerna; tudi ER stres namreč vpliva na dinamiko LK. Količina LK v celicah se poveča kot odziv na induktorje UPR (npr. tunikamicin in ditiotreitol) in na genetske motnje, ki zmanjšajo razgradnjo proteinov v ER, kar nakazuje na možnost, da se v celicah sinteza LK inducira z namenom, da bi ublažile ER stres. LK lahko omilijo ER stres preko skladiščenje prostih MK in odstranitve specifičnih fosfolipidov iz membrane ER, kar spremeni lipidno sestavo membrane ER. Možno je tudi, da LK sodelujejo pri odstranjevanju napačno zvitih proteinov, ki se lahko vgradijo v LK, te pa se kasneje razgradijo v procesu mikrolipofagije. Stres ER povzroča tudi sproščanje kalcija iz ER v citosol, kar lahko vodi do celične smrti. LK lahko celico zaščitijo tako, da kalcij vgradijo in tako znižajo njegovo koncentracijo v citosolu (Lee in sod., 2012) (Welte in Gould, 2017)(Bosma in sod., 2014).

Med procesom avtofagije LK ščitijo celico pred okvarami mitohondrijev. Pomanjkanje hranil v celicah stimulira avtofagijo, ki povzroči sproščanje večje količine aminokislin in lipidov. Del sproščenih lipidov se takoj vgradi v LK, kar naj bi preprečilo lipotoksične učinke teh lipidov na mitohondrije. Inhibicija sinteze LK med avtofagijo, ki je izzvana s stradanjem, zniža mitohondrijski membranski potencial (MMP) in celično dihanje ter povzroča celično smrt. Kadar celica sproščenih MK ne vgradi v LK, pride do prekomerne vgradnja MK v acilkarnitin. Acilkarnitin je ester karnitina in MK, ki nastane na zunanji membrani mitohondrija in je odgovoren za vstop MK v mitohondrije. Visoke koncentracije acilkarnitina so citotoksične, saj acilkarnitin poškoduje mitohondrijsko membrano (Ogasawara in sod., 2020).

LK regulirajo tudi jedrno funkcijo, pri čemer so pomembne tako citosolne LK, kot tudi LK, ki se nahajajo v jedru. Citosolne LK se pogosto nahajajo v neposredni bližini jedra in vplivajo na njegovo delovanje preko različnih mehanizmov. LK si z jedrom lahko izmenjujejo proteine, vplivajo pa tudi na sestavo kromatina in regulacijo genske

transkripcije. Za jedrske LK se je izkazalo, da so vključene v sintezo fosfolipidov, ki je pomembna za vzdrževanje membranske homeostaze ob odzivu na ER stres (Olzmann in Carvalho, 2019; Jarc and Petan, 2019; Welte and Gould, 2017).

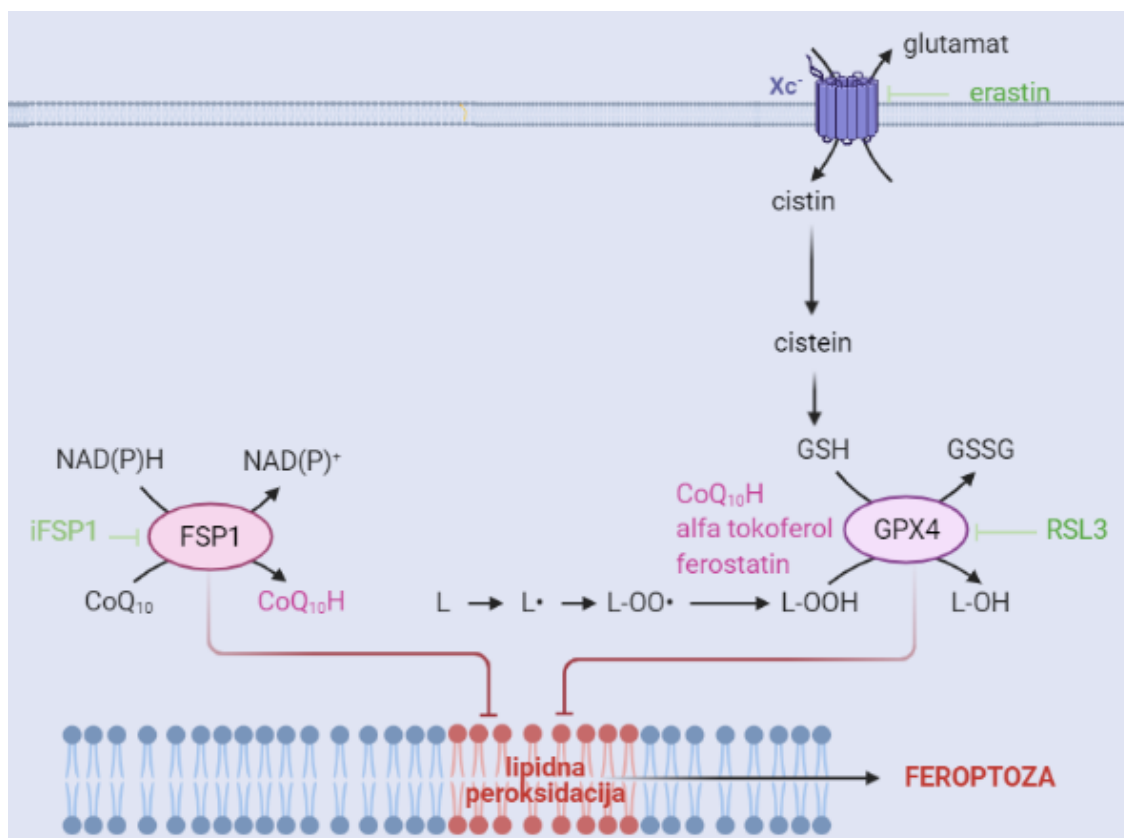
Pogosto spregledana funkcija LK je njihova vloga pri celični signalizaciji, ki usmerja celično presnovo, imunski odziv in vnetje. Lipidi, sproščeni iz LK (npr. MK), lahko delujejo neposredno kot signalne molekule, ali pa služijo kot predhodniki za sintezo drugih bioaktivnih lipidnih mediatorjev, kot so na primer eikozanoidi, retinojska kislina, endokanabinoidi in ceramidi. Po drugi strani pa lahko LK uskladiščijo lipide in beljakovine, s čimer zmanjšajo njihovo razpoložljivost za sodelovanje v signalnih poteh (Jarc in Petan, 2020).

2.3 FEROPTOZA

Ferroptozo je z železom posredovan tip programirane celične smrti, ki jo je prvi predlagal Dixon leta 2012 (Dixon in sod., 2012). Za ferroptozo je značilna povečana raven znotrajceličnega železa in inaktivacija encima glutation peroksidaza 4 (GPX4), zaradi česar pride v celici do lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je reakcija, ki jo povzročajo prosti radikali in ki poteka predvsem na polinenasičenih MK v celični membrani ter na membranah mitohondrijev, ER, lizosomov in LK. Začetni produkti lipidne peroksidacije so lipidni hidroperoksidi (LOOH), končni produkti pa reaktivni aldehidi, kot sta na primer malondialdehid (MDA) in 4-hidroksinonenal (4HNE), katerih koncentracija se med ferroptozo povečuje (Tang in sod., 2020). Ferroptoze ni mogoče preprečiti s kemičnimi ali genetskimi zaviralci drugih tipov regulirane celične smrti, kar kaže na to, da je njen mehanizem edinstven. Pri večini ferroptotičnih celic običajno opazimo nekrotično morfologijo, in sicer povečanje celic in poškodbe plazemske membrane (Chen in sod., 2021). V nekaterih primerih ferroptozo spremlja tudi odcepljanje celic od podlage, zaokrožitev celic ter povečanje števila avtofagosomov (Tang in sod., 2020). Poleg tega so za ferroptozo značilne še druge ultrastrukturne spremembe, kot so krčenje mitohondrijev, povečanje gostote mitohondrijskih membran in zmanjševanje mitohondrijskih krist (Li in sod., 2020).

Odkar je bila ferroptozo opisana leta 2012, so odkrili več signalnih poti, povezanih s ferroptozo. Induktorje ferroptoze lahko razdelimo na sistemske zaviralce cistin-glutamatnega antiportereja Xc- (npr. erastin), zaviralce GPX4 (npr. RSL3), spojine, ki delujejo prek napetostno odvisnih anionskih kanalov (ang. voltage-dependent anion channels, VDAC) (npr. erastin), spojine, ki olajšajo razgradnjo GPX4 in znižujejo nivo koencima Q10 (CoQ10) (npr. FIN56) ter spojine, ki povzročajo oksidacijo železa, posredno inaktivacijo GPX4 in lipidno peroksidacijo (npr. FINO2). Večina zaviralcev ferroptoze deluje preko zaviranja znotrajceličnega kopičenja železa (npr. deferoksamin) in preko zaviranja tvorbe lipidnih peroksidov (npr. ferostatin-1, liproxstatin-1, α -

tokoferol) (Li in sod., 2020; Bai in sod., 2020; Chen in sod., 2021; Yu in sod., 2017). Dve nedavni študiji sta odkrili še en zaviralec ferroptoze, in sicer ferroptozni supresorski protein 1 (ang. ferroptosis suppressor protein 1, FSP1), ki je bil prej znan kot mitohondrijski faktor indukcije apoptoze 2 (AIFM2) (Doll in sod., 2019; Bersuker in sod., 2019). FSP1 katalizira regeneracijo CoQ10 in deluje neodvisno od GPX4. CoQ10 preprečuje verižno reakcijo lipidne peroksidacije z neposrednim zmanjšanjem lipidnih radikalov ali z regeneracijo α -tokoferola (Conrad in sod., 2020).



Slika 2: Signalna pot ferroptoze.

Ferroptozo v celicah nadzorujeta dva glavna mehanizma, in sicer GPX4 signalna pot ter ubikinonska signalna pot, ki jo uravnava FSP1. Preprečevanje ferroptoze preko GPX4 poteka po ključnih korakih privzema oziroma redukcije cistina, biosinteze glutationa (GSH) in nazadnje z GPX4 katalizirana redukcija oksidiranih fosfolipidov (PL-OOH) v ustrezne alkohole (PL-OH), pri čemer se kot substrat uporablja GSH. V sistemu NAD(P)H/FSP1/CoQ10 je antiferoptična vloga FSP1 posledica njegove oksidoreduktazne aktivnosti, saj reducira ekstramitohondrijski CoQ10 v ubikinol s pomočjo NAD(P)H/H⁺. Ubikinol preprečuje lipidno peroksidacijo bodisi neposredno z zmanjšanjem lipidnih radikalov, bodisi posredno preko α -tokoferola. Na shemi so z zeleno označeni ferroptozni induktorji (erastin, RSL3 in iFSP1), z vijolično pa ferroptozni inhibitorji (ferostatin, α -tokoferol in CoQ10).

2.3.1 Ferroptozoza in lipidne kaplje

Občutljivost celic na ferroptozo je tesno povezana z metabolizmom lipidov in LK. LK lahko preprečujejo lipidno peroksidacijo z vgrajevanjem membranskih polinenasičenih MK (Bailey in sod., 2015). Po drugi strani pa lahko razgradnja LK ter njihova

onemogočana sinteza v nekaterih celicah inducirata ferroptozo (Bai in sod., 2019). Možna razlaga je, da razgradnja LK predstavlja vir polinenasičenih MK, ki se vgrajujejo v membranske fosfolipide, dovzetne za lipidno peroksidacijo (Dixon, 2012).

Zaenkrat še ni dobro pojasnjeno, kako se med procesom ferroptoze spreminjajo velikost, količina in celična porazdelitev LK. Proizvodnja ROS med ferroptozo spodbuja kopičenje LK (Bailey in sod., 2015). Študija na mišjih in humanih hepatocitih je pokazala, da se količina LK v zgodnji fazi (2-6 ur) ferroptoze, inducirane z RSL3, poveča, v pozni fazi (8-12 ur) pa zmanjša. Skladno s tem so opazili tudi povečano ekspresijo perilipina 2, specifičnega markerja LK, po 4 urah in zmanjšanje njegove ekspresije po 12 urah (Bai in sod., 2019). Dong in sod. (2020) so v svoji študiji pokazali, da se viskoznost LK med procesom ferroptoze, inducirane z erastinom, v HeLa celicah poveča. Če so bile celice sočasno izpostavljene induktorju ferroptoze (erastinu) in inhibitorju ferroptoze (ferostatinu-1), praktično ni prišlo do sprememb v viskoznosti LK. Podoben porast viskoznosti LK so med procesom ferroptoze potrdili tudi že pri nekaterih drugih rakavih celicah.

2.3.2 Ferroptaza in železooksidni nanodelci

Številne študije so potrdile, da ima ferroptaza pomembno vlogo pri patogenezi različnih bolezni, kot so tumorji, kardiovaskularne, nevrološke, pljučne, ledvične, jetrne in nalezljive bolezni. Zato lahko indukcija ali inhibicija ferroptoze zagotovi obetavno terapevtsko strategijo za številne bolezni (Kobayashi in sod., 2018; Bai in sod., 2020; Conrad in sod., 2020; Shen in sod., 2020).

Pri zdravljenju raka velik problem predstavlja odpornost rakavih celic na kemoterapijo. Večina trenutno uporabljenih kemoterapevtikov inducira apoptozo, pri čemer pa niso dovolj učinkoviti. Ker je ferroptaza popolnoma drugačen proces celične smrti od apoptoze, predstavljajo induktorji ferroptoze obetavno strategijo pri premagovanju odpornosti rakavih celic na zdravila (Xu in sod., 2019).

Med NM so za induciranje ferroptoze pri rakavih boleznih najbolj primerni železooksidni ND. ND na osnovi železa v kisljih lizosomih sproščajo železove ione Fe^{2+} in Fe^{3+} , ki vstopajo v Fentonovo reakcijo. Produkti Fentonove reakcije so ROS, ki inducirajo lipidno peroksidacijo na membranah in povzročajo ferroptozo. Železove ND se na mesto tumorja navadno usmerja z zunanjim magnetnim poljem, pri čemer je zanimivo, da že sama prisotnost magnetnega polja pri številnih rakavih celicah zvišuje koncentracijo ROS ter posledično zavira proliferacijo celic in rast tumorja. Poleg tega lahko prisotnost magnetnega polja poveča privzem ND v celice. Pri SPIONih, ki so izpostavljeni zunanemu izmeničnemu magnetnemu polju, lahko v terapevtske namene uporabljamo tudi pojav magnetne hipertermije. Zaradi izmeničnega zunanjega polja magnetni moment ali pa celoten delec spreminja orientacijo, kar ob primerni izbiri frekvence zunanjega

polja privede do segrevanja ND. Zaradi toplotnih izgub ND pride do lokalnega segrevanja tkiva, kar vodi v nekrozo. Z usmerjanjem in internalizacijo železovih ND v rakave celice ter izpostavljanjem rakavih celic lokalnemu magnetnemu polju lahko torej dosegamo sinergistične učinke pri zdravljenju raka (Wang in sod., 2018). Čeprav so nekatere študije pokazale, da lahko železovi ND učinkovito zmanjšajo viabilnost rakavih celic *in vitro* ter zmanjšajo velikost tumorja *in vivo*, železovi ND še niso v klinični uporabi za namen zdravljenja s ferroptozo (Liu in sod., 2019).

2.3.3 Občutljivost različnih celic na ferroptozo

Ferroptaza je bila prvotno identificirana v rakavih celicah z mutacijo v genih RAS. Številni različni tipi rakavih celic z mutacijo RAS kažejo občutljivost na indukcijo ferroptoze (Yang in Stockwell, 2008), vendar so nadaljnje študije pokazale, da mutirani gen RAS ni pogoj za sprožitev ferroptoze in da so tudi nekateri tipi raka brez mutacije gena RAS občutljivi na indukcijo ferroptoze. Rezultati kasnejših raziskav so pokazali, da je občutljivost za ferroptozo tkivno specifična. Najbolj občutljive za ferroptozo so se izkazale celične linije raka, ki so bile pridobljene iz hematopoetskega tkiva, limfoidnega tkiva, centralnega živčevja, avtonomnih ganglijev, jajčnikov, mehkih tkiv, ledvic in kostnega tkiva, medtem ko so bile celične linije, ki izhajajo iz požiralnika, zgornjih dihal, želodca, trebušne slinavke, dojk, kože in debelega črevesa na splošno neobčutljivi (Multari in sod., 2018).

Dodatne informacije o tem, katera tkiva so bolj občutljiva za ferroptozo, so pridobili s študijami na transgenih miših. Tkivno specifične študije utišanja gena *Gpx4* so razkrile, da so nevroni v hipokampusu, glutamatergičnimi nevroni, internevroni v možganski skorji, Purkinjejeva vlakna in motorični nevroni močno odvisni od funkcionalnega GPX4, medtem ko so nevroni hipotalamusa in dopaminergični nevroni odporni na izgubo GPX4. Zunaj možganov so za ferroptozo najbolj občutljive proksimalne celice ledvic, saj utišanje *Gpx4* povzroči akutno poškodbo ledvic. Izražanje GPX4 je nujno tudi za hemostazo CD8-pozitivnih celic T, zorenje retikulocitov ter za limfocite B. V endotelijskih celicah in hepatocitih, ki so za ferroptozo manj občutljivi, lahko izgubo GPX4 nadomestimo z dodajanjem α -tokoferola. Miši z utišanim genom *Gpx4* v endoteliju, ki so jim v prehrano dodajali velike količine α -tokoferola, so bile fenotipsko normalne, medtem ko je pri tistih, ki so uživale prehrano z nizko vsebnostjo α -tokoferola, smrt endotelijskih celic povzročila trombozo, številne mikroinfarkte in smrt (Conrad in sod., 2020). Podobne rezultate so Sakai in sod. (2017) dobili tudi pri *in vitro* poskusih na endotelijskih celicah. Pokazali so, da je GPX4 v endotelijskih celicah bistveni antioksidativni encim za zaščito celic pred lipidno peroksidacijo in posledično regulator ferroptoze. α -tokoferol in ekstrakt rjavega riža, ki vsebuje visoko raven α -tokoferola, lahko znižata lipidno peroksidacijo in citotoksičnost, do katere pride zaradi utišanja gena *Gpx4*.

2.4 MAŠČOBNE KISLINE KOT REGULATORJI CELIČNE SMRTI

V zadnjih letih se je veliko raziskav osredotočilo na preučevanje vloge lipidov v različnih fizioloških in patoloških stanjih (Pakiet in sod., 2019; Schoeler in Caesar, 2019; Leuti in sod., 2020; Luo in sod., 2018). Lipidi delujejo kot bistveni gradniki membran, služijo kot gorivo za energetsko intenzivne procese ter imajo ključno vlogo kot signalne molekule in regulatorji številnih celičnih funkcij. Lipidi so tudi pomembni regulatorji celične smrti. V celicah sesalcev lahko apoptotične in neapoptotične poti celične smrti inducirajo, modulirajo ali zavirajo različni lipidi, vključno s prostimi MK in kompleksnejšimi lipidi, kot so sfingolipidi, glicerofosfolipidi in glicerolipidi (Magtanong in sod., 2016).

Obstajajo številna poročila o tem, da lahko MK sprožijo različne vrste regulirane celične smrti. Palmitinska kislina (PK) v humanih jetrnih celicah povzroča stres ER in posledično inducira apoptozo (Cao in sod., 2012). V humanih celicah mlečne žleze OK, sproščena iz TAG, sproži permeabilizacijo lizosomov in uhajanje intralizosomskih katepsinov B in L v citosol, kjer sprožijo od kaspaz neodvisno celično smrt (Sargeant in sod., 2014). V človeških celicah fibrosarkoma HT-1080 izpostavljenost CIL56 povzroči kopičenje MK in od kaspaze neodvisno regulirano celično smrt (Dixon in sod., 2015). Kopičenje ene ali več MK v celici je lahko samo po sebi toksično, saj MK delujejo kot detergenti in poškodujejo membrane organelov ali plazemsko membrano. MK lahko sprožijo tudi celično smrt s trajno aktivacijo signalnih poti, kot na primer UPR odziv (Olzmann and Carvalho, 2019).

Celice so dobro opremljene za spopadanje s škodljivimi učinki, ki jih lahko povzročajo MK. Škodljivo delovanje MK in njihovih derivatov celice preprečujejo tako, da MK v obliki TAG vgrajujejo v LK (Onal in sod., 2017). Ko se MK vgradijo v TAG in nato v LK, postanejo relativno inertne, stabilne in neškodljive za celico (Welte, 2015). Lipidi, ki se uskladiščijo v pogojih, ko so hranila v presežku, se mobilizirajo iz LK, ko so potrebni za proizvodnjo energije, sintezo sestavin membrane, prenos signalov ali proizvodnjo vnetnih mediatorjev. Oslabljeno skladiščenje MK v LK ali presežena zmogljivost za skladiščenje lahko vodita do bolezni, povezanih z lipotoksičnostjo (Olzmann in Carvalho, 2019).

Nasičene in nenasičene MK se bistveno razlikujejo po svojem prispevku k lipotoksičnosti. Študije so pokazale, da je lipotoksičnost zaradi kopičenja dolgoveričnih MK značilna za nasičene MK (Nolan in Larter, 2009). Poleg tega se je izkazalo, da lahko dodatek nenasičenih MK zmanjša lipoapoptozo, ki jo povzročajo nasičene MK. Študija Listenbergerja in sod. (2003) je pokazala, da je različna toksičnost nasičenih in nenasičenih MK neposredno povezana z njihovo sposobnostjo vgrajevanja v TAG. Potrdili so, da dodatek OK zmanjšuje apoptozo, povzročeno s PK, saj OK spodbudi vgradnjo PK v TAG. Hkrati so ugotovili tudi, da tako OK kot PK povzročata toksične

učinke v celicah z zmanjšano sposobnostjo sinteze TAG. Njihovi rezultati potrjujejo model celične presnove lipidov, v katerem nenasičene MK ščitijo pred lipotoksičnostjo s spodbujanjem kopičenja TAG. Podobno so dokazali tudi Ahn in sodelavci (2013), ki so potrdili, da OK preko stimulacije kopičenja TAG ščiti celice trebušne slinavke AR42J pred apoptozo, povzročeno s PK.

2.4.1 Oleinska kislina in celična smrt

OK je mononenasičena omega-9 MK, ki jo najdemo v različnih živalskih in rastlinskih virih in je glavna sestavina oljčnega olja. OK je zelo odporna proti oksidaciji in lahko poveča aktivnost drugih antioksidantov, kot so tokoferoli (Sales-Campos in sod., 2013). Študija Magtanonga in sodelavcev (2019) je pokazala, da OK učinkovito zavira proces ferroptoze in da je ta zaščitni učinek povezan z zaviranjem kopičenja lipidnih peroksidov v plazemski membrani ter zmanjšanjem deleža fosfolipidov, ki vsebujejo polinenasičene MK. Pri mišjih fibroblastih 3T3-L1 ima OK zaščitni učinek pred citotoksičnostjo, ki jo povzroča induktor oksidativnega stresa terc-butil hidroperoksid (Haeiwa in sod., 2014). V podganjih celicah hepatoma dRLh-84 OK preprečuje apoptozo, ki jo povzroča trans-10, cis-12 konjugirana linolna kislina (Yamasaki in sod., 2008). V humanih celicah hepatoma HepG2 OK zmanjša lipotoksičnost povzročeno s PK, saj zavira stres ER in piroptozo (Zeng in sod., 2020).

2.5 IZVENSINAPTICNA ACETILHOLINESTERAZA

Glavne komponente človeškega holinergičnega sistema so acetilholin (ACh), holin acetiltransferaza, acetilholinesteraza (AChE) ter muskarinski in nikotinski ACh receptorji. V grobem lahko holinergični sistem pri ljudeh razdelimo na sinaptični in izvensinaptični (ne-nevronske). Najpomembnejša funkcija sinaptične AChE je hidrolitska razgradnja nevrotansmitorja ACh in s tem prekinitev signala, ki ga povzroči ACh na holinergičnih sinapsah ter na živčno-mišičnih stikih. Vse komponente holinergičnega sistema so bile dokazane tudi v človeških ne-nevronske celicah in tkivih, med drugim v keratinocitih, imunskih celicah, sečnem mehurju, epitelijskih celicah dihalnih poti, endotelijskih celicah žil in reproduktivnih organih (Kawashima in Fujii, 2008). Vloga ne-nevronskega holinergičnega sistema je regulacija številnih celičnih funkcij, kot so proliferacija, diferenciacija, migracija ter prehod ionov in vode (Wessler in Kirkpatrick, 2008).

2.5.1 Izoforme acetilholinesteraze

Rezultati raziskav kažejo, da so različne funkcije AChE v veliki meri povezane z njeno obliko, pri čemer AChE opravlja številne biološke funkcije, ki so neodvisne od njene katalitične aktivnosti. V človeškem telesu se AChE pojavlja v več različnih izoformah,

od katerih so pretežno prisotne tri. Prepisi gena ACHE so na svojem 3' koncu podvrženi alternativnemu spajanju, pri čemer nastanejo katalitično aktivne izoforme z različnimi C-konci. Osrednji del človeške AChE je skupen vsem različicam in je sestavljen iz 543 aminokislin, ki jih kodirajo eksoni E2, E3 in E4 gena ACHE.

Sinaptična AChE (AChE-S) je najbolj znana izoforma AChE, ki nastane s spajanjem eksona 4 z eksonom 6. Iz zapisa mRNA E1-E2-E3-E4-E6 nastane beljakovina s C-končnim podaljškom iz 40 aminokislinskih ostankov, ki vsebuje cistein, zaradi katerega lahko pride do dimerizacije. AChE-S se lahko pojavlja kot monomer in v različnih polimernih oblikah, najdemo pa jo predvsem v možganih in mišicah.

Transkript, ki nastane z neprekinjeno transkripcijo prek introna I4 (E1-E2-E3-E4-I4-E5-E6), kodira izoformo AChE-R (ang. AChE-readthrough). Ta topna monomerna izoforma AChE se lahko izloča iz celice ali ostane v celici. Sodeluje pri proliferaciji, apoptozi in razvoju različnih vrst celic in organov, na primer možganov in krvotvornih celic.

Izoformo AChE-E (eritrocitna AChE) kodira zapis E1-E2-E3-E4-E5-E6. Na C-koncu AChE-E izoforme je peptid iz 43 aminokislinskih ostankov, ki se kasneje odcepi in tako omogoči, da se AChE poveže z glikozilfosfatidilinozitolom. Ta lipidni del se lahko vključi v membrane eritrocitov in sidra AChE na njihove površine (Grisaru in sod., 1999).

Poleg izoform z različnimi C-konci se s transkripcijo, ki se začne z dveh alternativnih mest v promotorju ACHE, ustvarijo transkripti, ki kodirajo »klasično« AChE ali »podaljšano« AChE, ki ima dodatno zaporedje aminokislin na svojem N-koncu (N-AChE). »Klasična« človeška beljakovina AChE vsebuje na svojem N-koncu signalni peptid z 31 aminokislinskimi ostanki, ki se med zorenjem beljakovine odcepi. N-AChE v svojem podaljšanem N-koncu vsebuje hidrofobno zaporedje nekdanjega signalnega peptida, ki postane transmembranska domena in omogoča neposredno sidranje AChE v celično membrano. Katalitična aktivnost N-AChE je v primerjavi s "klasičnimi" izoformami nespremenjena.

2.5.2 Acetilholinesteraza in celična smrt

Izvensinaptična AChE ima pomembno vlogo v procesu celične smrti. Ugotovili so, da je izražanje AChE v številnih neholinergičnih celicah inducirano med procesom apoptoze, sodelovala pa naj bi pri nastanku apoptosoma (Park in sod., 2004). Apoptozo je mogoče zavreti z utišanjem gena za AChE z siRNA ali z inhibitorji AChE, kot sta BW284c51 in eserin (Zhang in sod., 2002). Povečana ekspresija gena za AChE poveča občutljivost celic za apoptozo, vendar ne inducira apoptoze (Jin in sod., 2016). V študiji na endotelijskih celicah so pokazali, da se je količina AChE povečala med apoptozo, ki so jo izzvali s stradanjem. Poleg tega so ugotovili, da se AChE pri normalnih pogojih nahaja v

citoplazmi, med apoptozo pa se akumulira v jedru (Xie in sod., 2011). V drugi študiji so v endotelijskih celicah s TNF- α spodbudili vnetje in ugotovili, da se je pri tem količina celokupne AChE povečala, pri čemer je bilo povečanje najbolj izrazito po 12 urah. Med vnetjem se je povečalo tudi izražanje mRNA za celokupno AChE, AChE-R in AChE-S (De Oliveira in sod., 2012).

AChE pa ni udeležena le v procesu apoptoze. Blohberger in sod. (2015) so ugotovili, da AChE-R preko neencimskih mehanizmov povzroča nekroptozo v primarnih celicah človeških jajčnikov.

3 MATERILI IN METODE

3.1 NANOMATERIALI

3.1.1 Sinteza nanomaterialov

Vodni raztopini Fe^{2+} ionov (0,027 mol/L) in Fe^{3+} ionov (0,023 mol/L) smo v dveh korakih dodali koncentriran NH_3 (25 %). V prvi stopnji smo z dodatkom NH_3 pH vrednost raztopine dvignili na 3 in jo pri tej vrednosti vzdrževali 30 min, pri čemer se je oboril železov hidroksid. V drugi stopnji smo pH še dodatno zvišali na 11,6, pri čemer je prišlo do oksidacije oborjenega železovega (II) hidroksida s kisikom iz zraka ter nastanka magnetne spinelne faze Fe_2O_3 . Po 30 minutah smo sintetizirane ND sprali z razredčeno raztopino NH_3 s pH 10,5. Oborjene ND smo nato uporabili za pripravo stabilne vodne suspenzije. Med konstantnim intenzivnim mešanjem smo suspenziji ND (približno 2 g nanodelcev v 60 mL vode) dodali 5 mL vodne raztopine citronske kisline (0,5 g/mL) ter uravnali pH na 5,2 z dodatkom koncentrirane raztopine NH_3 . Pri tem pH sta dve karboksilni skupini citronske kisline disociirani, kar omogoča dobro adsorpcijo kisline na delce. Adsorpcijo so še dodatno spodbudili s segrevanjem na 80 °C. Po 90 minutah smo pH še dodatno dvignili do vrednosti 10,1. Pri tem pH disociira tudi tretja karboksilna skupina na citrinski kislini, kar poveča naboj na ND. Med ND pride do elektrostatskega odboja, kar preprečuje njihovo aglomeracijo in omogoča stabilnost delcev v vodni suspenziji. Tako pripravljenim ND smo nato dodali še silikatno prevleko, debeline približno 4 nm. Za tvorbo prevleke smo uporabili tetraetilortosilikat (TEOS). TEOS, ki smo ga predhodno raztopili v vodi, smo dodali vodni suspenziji ND. Z dodatkom NH_3 ali KOH smo dvignili pH na 11,0 ali 12,0, da je prišlo do hidrolize TEOS in nukleacije SiO_2 na ND. Reakcijska mešanica je bila podvržena močnemu mešanju 3 ure, nato pa smo s silikatom prevlečene ND sprali in dispergirali v destilirani vodi. Na ta način smo dobili maghemitne ND, prevlečene s silicijevim dioksidom ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{+SiO}_2$), za katere v nadaljevanju uporabljamo kratico SPIONi.

SPIONE sta z metodo obarjanja sintetizirala prof. dr. Darko Makovec in dr. Slavko Kralj na Odseku za sintezo materialov na Inštitutu Jožef Stefan.

3.1.2 Karakterizacija nanomaterialov

SPIONE smo karakterizirali s TEM, z metodo dinamičnega sipanja svetlobe (DLS) in meritvami zeta potenciala. Vzorci za TEM, s katero smo določali primarno velikost delcev, so bili pripravljene tako, da smo na prosojne ogljikove plasti na bakrenih podpornih mrežicah nanесли vodno suspenzijo SPIONov in jo posušili pri sobni temperaturi. Slike vzorcev so bile posnete s TEM (JEOL 2100, Tokyo, Japonska) pri 200 kV. Suspenzijo SPIONov v mediju brez seruma smo spremljali z elektrokinetičnimi

meritvami zeta potenciala (Anton Paar GmbH, Litesizer 500, Gradec, Avstrija), porazdelitev hidrodinamskega premera pa je bila določena z DLS (Anton Paar GmbH, Litesizer 500, Gradec, Avstrija).

SPIONE sta karakterizirala dr. Slavko Kralj in Sebastjan Nemeč na Odseku za sintezo materialov na Inštitutu Jožef Stefan.

3.1.3 Priprava suspenzij nanomaterialov

Založne suspenzije SPIONov s koncentracijo 10 mg/mL smo pripravili v deionizirani vodi (MilliQ, Millipore, Billerica, MA, ZDA [pH = 5.7, $\rho = 18.5 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$]) in jih avtoklavirali. Shranjevali smo jih v hladilniku zaščitene pred svetlobo. Neposredno pred poskusi smo pripravili ustrezne koncentracije ND v celičnem mediju.

3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN OLEINSKE KISLINE

OK je lipofilna molekula, ki je v vodi slabo topna, zato jo na celicah običajno preučujemo vezano na albumine, kot je na primer BSA. Konjugacija OK z albuminom poveča njen vstop v celice, zmanjša neželene lipotoksične učinke (prosta OK lahko podobno kot detergenti raztaplja membrane) in je tudi *in vivo* relevantna, saj je velik del nezaestrenih MK v krvi, od koder MK vstopajo v endotelijske celice, vezanih na albumine (Abumrad in sod., 2021).

Pri naših poskusih zato OK nikoli nismo dodali direktno celicam, ampak smo jo pred tem vedno eno uro inkubirali s proteini na sobni temperaturi. Ker smo pri izpostavitvah za celice uporabljali medij brez FBS, smo mediju dodali 0,02 % (m/v) BSA brez MK (Sigma Aldrich #A7511). Nato smo želene koncentracije OK pripravili v celičnem mediju z dodatkom BSA in pripravljene raztopine inkubirali na sobni temperaturi eno uro, da je prišlo do kompleksacije OK in BSA.

3.3 GOJENJE CELIC HUVEC

Kot model endotelijskih celic smo uporabljali humane celice žilnega endotelija, izolirane iz vene popkavnice (ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC). Celice smo gojili v gojišču DMEM, ki smo mu dodali 10 % (v/v) FBS in 4 mM L-glutamin. Celice smo gojili v nadzorovanih pogojih (37 °C, atmosfera s 5 % CO₂, visoka zračna vlažnost) in jih presajali trikrat tedensko. Pri presajanju smo jih najprej sprali s fosfatnim pufrom (ang. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*, DPBS, Sigma-Aldrich), nato pa izpostavili raztopini za disociacijo adherentnih celic TrypLE Select (Gibco). Po približno 10 minutah, ko so se celice odlepile od podlage, smo dodali celično gojišče in celice presadili v novo gojilno posodico v volumskem razmerju 1:6.

S kitom MycoAlert™ (Lonza, Basel, Švica) smo redno preverjali, da naše celice niso okužene z mikoplazmo.

3.4 POSTTRANSKRIPCIJSKO UTIŠANJE GENA ZA ATGL Z UPORABO MALE INTERFERENČNE RNA

Utišanje gena za ATGL smo izvedli z reverzno transfekcijo celic HUVEC z malo interferenčno RNA (siRNA). V epicah smo najprej pripravili transfekcijske komplekse tako, da smo po navodilih proizvajalca v epicah zmešali medij za transfekcijo Opti-MEM (Life Technologies, ZDA), Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Life Technologies, ZDA) in dve različni siRNA za utišanje ATGL (siRNA₁ in siRNA₂ (Qiagen) ali siRNA brez tarče v človeškem genomu (Allstars Negative Control siRNA (Qiagen)). Končna koncentracija siRNA je bila 10 nM v primeru, ko smo uporabili eno siRNA, in 20 nM, če smo uporabili kombinacijo dveh različnih siRNA. Za pretočno citometrijo smo uporabljali prozorne plošče s 24 vdolbinicami, za imunodetekcijo proteinov pa plošče s 6 vdolbinicami. Reagente smo premešali in jih nanесли na prozorno ploščo s 24 vdolbinicami (100 µL/ vdolbinico) ali s 6 vdolbinicami (500 µL/ vdolbinico). V primerih, ko smo delali v ploščah s 24 vdolbinicami, smo v vsako vdolbinico dodali 4×10^4 celic v 400 µL kompletnega celičnega medija, pri ploščah s 6 vdolbinicami pa 12×10^4 celic v 500 µL kompletnega celičnega medija. Po 24 urah smo odstranili medij in celice izpostavili OK in/ali SPIONom v mediju brez FBS. Celice smo analizirali najkasneje v 48 urah po transfekciji.

3.5 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI

Za testiranje citotoksičnosti SPIONov smo uporabili tri različne teste: test z resazurinom, test privzema barvila nevtralnno rdeče (NR) ter komercialni kit CyQuant® (Thermo Fisher Scientific).

3.5.1 Test z resazurinom

Resazurin v metabolično aktivnih celicah deluje kot akceptor elektronov v elektronski transportni verigi, pri čemer ne moti fiziološkega procesa prenosa elektronov. Pri sprejemu elektronov se nefluorescentno, modro barvilo resazurin irreverzibilno reducira v fluorescentno, rožnato obarvan resorufin. Koncentracijo resorufina, ki je sorazmerna s številom metabolično aktivnih celic, lahko določimo z merjenjem fluorescence pri 590 nm po vzbujanju s svetlobo valovne dolžine 560 nm.

Celice HUVEC smo z gostoto 3×10^4 celic/cm² (100 µL na vdolbinico) nasadili v prozorne mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami. Gojili smo jih v 100 µL kompletnega medija. Po 24-urni inkubaciji smo celice izpostavili SPIONom (koncentracije 5, 10, 25,

50, 75 in 100 $\mu\text{g/mL}$) v mediju brez dodatka FBS za 24 ur, 48 ur ali 72 ur. Po končani izpostavitvi smo v vsako vdolbinico dodali resazurin s končno koncentracijo 0,15 $\mu\text{g/mL}$ in 3 ure inkubirali na 37 °C. Nato smo 100 μL medija iz vsake vdolbinice prenesli v črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami. Koncentracijo resorufina smo izmerili spektrofotometrično (BioTek, Cytation 3, Bad Friedrichshall, Nemčija) z merjenjem fluorescence pri ekscitacijski valovni dolžini 560 nm in emisijski valovni dolžini 590 nm. Pri vsakem izmed testiranih pogojev smo izvedli vsaj štiri neodvisne biološke ponovitve.

3.5.2 Test privzema barvila nevtralnno rdeče

NR je barvilo, ki obarva lizosome v živih celicah. Žive celice lahko z aktivnim transportom privzamejo barvilo NR in ga vključijo v lizosome, nežive celice pa nimajo sposobnosti privzema. Iz količine barvila, ki ga iz lizosomov sprostimo z uporabo organskega topila, lahko določimo število živih celic. Koncentracijo NR določamo z merjenjem fluorescence pri 645 nm po vzbujanju s svetlobo valovne dolžine 530 nm.

Celice smo gojili in izpostavili SPIONom na enak način kot pri testu z resazurinom. Po končani izpostavitvi smo v vsako vdolbinico dodali NR s končno koncentracijo 40 $\mu\text{g/mL}$ in 2 uri inkubirali na 37 °C. Nato smo celice sprali s PBS in barvilo NR, ujeto v lizosomih, raztopili z dodatkom 100 μL organskega topila (50 % v/v etanol, 1 % v/v očetna kislina in 49 % v/v deionizirana voda). Koncentracijo NR smo izmerili spektrofotometrično (BioTek, Cytation 3, Bad Friedrichshall, Nemčija) z merjenjem fluorescence pri ekscitacijski valovni dolžini 530 nm in emisijski valovni dolžini 645 nm. Pri vsakem izmed testiranih pogojev smo izvedli vsaj štiri neodvisne biološke ponovitve.

3.5.3 Test CyQuant

Direktni test proliferacije CyQuant® (kljub imenu testa v resnici ne gre za test proliferacije, ampak test preživetja) kot merilo viabilnosti upošteva intaktnost celične membrane. Kit vsebuje dve komponenti, in sicer zeleno fluorescentno barvilo, ki obarva nukleinske kisline, in dušilec fluorescence. Proizvajalec ne navaja kemijske zgradbe komponent. Fluorescentno barvilo prehaja v vse celice in se koncentrira v njihovem jedru, kjer obarva deoksiribonukleinsko kislino (DNA). Dušilec fluorescence ne more prehajati v žive celice, ampak le v celice z okvarjeno membrano, zato po dodatku obeh komponent fluorescirajo le zdrave celice z nepoškodovano membrano. Fluorescentno barvilo ekscitiramo s svetlobo valovne dolžine 508 nm, emisijo pa merimo pri valovni dolžini 527 nm.

Celice smo gojili in izpostavili SPIONom na enak način kot pri testu z resazurinom. Medij z detekcijskim reagentom smo pripravili tako, da smo zmešali 11,7 mL DPBS, 48 μL fluorescentnega barvila (CyQuant Direct nucleic acid stain) in 240 μL dušilca

fluorescence (CyQuant Direct background suppressor I). Po končani inkubaciji celic s SPIONi (24, 48 ali 72 ur), smo v vsako vdolbinico dodali 100 μ L medija z detekcijskim reagentom in inkubirali 60 minut. Barvilo v celicah smo ekscitirali s svetlobo valovne dolžine 508 nm in na dnu vdolbinic merili intenziteto emitirane svetlobe pri valovni dolžini 527 nm.

3.4 DOLOČANJE AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE

Aktivnost AChE smo določali z modificirano Ellmanovo metodo, ki temelji na sposobnosti holinesteraz, da odcepijo acetilno skupino iz substrata acetiltioholina. Pri tem nastane tioholin, ki reagira z Ellmanovim reagentom (5 5'-ditiobis(2-nitro benzojska kislina) (DTNB)) in daje kot produkt rumeno obarvan 2-nitro-5-tiobenzoat (TNB), ki ga lahko določimo spektrofotometrično z merjenjem absorbanca pri 405 nm.

Celice HUVEC smo z gostoto 3×10^4 celic/ cm^2 (1000 μ L na vdolbinico) nasadili v prozorne plošče s 6 vdolbinicami. Gojili smo jih v 1000 μ L kompletnega medija. Po 24-urni inkubaciji smo odstranili medij in celice izpostavili kemikalijam in/ali SPIONom. Po 24 urah smo odstranili medij, celice sprali s DPBS in jih postrgali s silikonskim strgalom. Celice smo centrifugirali (200 g, 10 minut), jih resuspendirali v 300 μ L 0,1 % Triton-X 100 v 100 mM K-fosfatnem pufru s pH=8 in homogenizirali s paličnim sonikatorjem (Sonics VibraCell, Newtown, ZDA). Celični homogenat smo centrifugirali (10.000 g, 4 °C, 10 min). Nato smo v supernatantu določili koncentracijo proteinov z uporabo Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, ZDA). Glede na določeno koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu smo vzorce redčili tako, da je bila koncentracija proteinov v vseh vzorcih enaka 5 μ g proteinov v 100 μ L vzorca. Za določitev aktivnosti AChE smo v mikrotitrsko ploščo odpipetirali 100 μ L ustrezno redčenih vzorcev in dodali 100 μ L Ellmanovega reagenta. Nato smo z merjenjem absorbanca pri 405 nm spremljali hitrost reakcije. Reakcija se ustavi, ko se porabijo vsi endogeni substrati iz celic. Nato smo dodali substrat acetiltioholin tako, da je bila njegova končna koncentracija v reakcijski zmesi 10 mM. Hitrost reakcije smo nato spektrofotometrično spremljali 20 min. Za izračun aktivnosti encima smo uporabili linearni del krivulje na grafu absorbanca v odvisnosti od časa.

3.5 DOLOČANJE PRISOTNOSTI SPIONov V CELICAH

S TEM smo preverjali, ali se SPIONi internalizirajo v celice HUVEC, hkrati pa smo spremljali tudi, ali ob izpostavljenosti ND v celicah prihaja do ultrastrukturnih sprememb. Celice HUVEC smo z gostoto 3×10^4 celic/ cm^2 nasadili v plošče s 6 vdolbinicami, v katere smo predhodno vstavili inserte s polietilenskimi membranami (BD Falcon™ Cultureware, BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, ZDA). Po 24 urah smo celice izpostavili SPIONom (50 μ g/mL) v celičnem mediju brez FBS. Po 24-urni izpostavitvi

smo celice, pritrjene na polietilenske membrane, sprali z DPBS ter jih 3 h inkubirali v ohlajenem fiksativu (4 % paraformaldehid in 2 % glutaraldehid v 0,1 M kakodilatnem pufru; pH 7,3, 4 °C). Nato smo jih preko noči spirali v 0,2 M kakodilatnem pufru z 0,33 M saharozo. Temu je sledila sekundarna fiksacija celic (1 % OsO₄ v 0,1 M kakodilatnem pufru, 60 min). Celice na membranah smo dehidrirali v etanolni vrsti, jih prepojili v mešanici 100 % etanola in umetne smole Epon (1:1) in jih nato vklopili v umetno smolo Epon 812 (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Nemčija). Po polimerizaciji umetne smole v termostatu pri naraščajočih temperaturah (35-80 °C) smo eponske bloke s celicami zrezali na ultratanke rezine z ultramikrotomom (Leica EM UC6). Pripravljene vzorce smo pregledali s presevnim elektronskim mikroskopom Jeol 100 CX.

Tretiranje celic in primarno fiksacijo sem izvedla Neža Repar, postfiksacijo in nadaljnjo pripravo vzorcev pa je izvedla doc.dr.Andreja Erman na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Zajem slik je opravil dr. Veno Kononenko.

3.6 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je tehnika, ki se uporablja za merjenje fizikalnih in biokemičnih značilnosti populacije celic. Celice v suspenziji ena za drugo potujejo skozi pretočni citometer, kjer jih osvetljujemo z laserskim žarkom. Ko laserski žarek zadane ob celico, se svetloba razprši ali absorbira v fluorokrome, ki smo jih predhodno vezali na celico. Z detektorji lahko v pretočnem citometru izmerimo razpršenost svetlobe in intenziteto fluorescence za vsako celico posebej. Fluorokromi na celici absorbirajo lasersko svetlobo, nato pa oddajo svetlobo daljše valovne dolžine, ki ima nižjo energijo. Jakost svetlobe, ki jo celica sipa v smeri laserskega žarka (ang. forward scatter, FSC), je sorazmerna z velikostjo celice. Jakost svetlobe, ki jo celica sipa v smeri pravokotno na laserski žarek (ang. side scatter, SSC), je odvisna od granuliranosti celice – bolj granulirane celice bolj sipajo svetlobo in dajejo močnejši signal. Intenziteta fluorescence, ki jo izmerimo pri posamezni celici, pa je odvisna od števila fluorokromov, ki se vežejo na celico. S pomočjo fluorokromov, ki so vezani na protitelesa, lahko detektiramo določen protein v celici. Uporabljamo lahko tudi fluorokrome, ki se vežejo na določene strukture ali organele v celici, in preko intenzitete fluorescence merimo količino teh struktur ali organelov. Nekateri fluorokromi v različnih oksidacijskih stanjih emitirajo različne valovne dolžine svetlobe, zato lahko iz barve emitirane svetlobe sklepamo o redoks stanju celice. Z merjenjem fluorescence barvil, ki prehajajo le skozi poškodovano celično membrano, lahko določamo tudi viabilnost celic, saj je prepustnost celične membrane v veliki meri odvisna od stanja celice.

3.6.1 Določanje mrtvih celic z barvilom 7-AAD ter kvantifikacija lipidnih kapelj z barvilom BODIPY 493/503

7-AAD je fluorescentno barvilo, ki interkalira v DNA. Ker ne more prehajati skozi intaktno plazmalemo, ga lahko uporabljamo za določanje celične viabilnosti, saj obarva le mrtve celice. Če smo želeli določiti le delež mrtvih celic, smo ga uporabljali samostojno. BODIPY 493/503 je lipofilno barvilo ki se uporablja za barvanje nepolarnih lipidov, na primer LK. Na podlagi meritev fluorescence barvila BODIPY 493/503 s pretočno citometrijo lahko sklepamo o količini LK, ne moremo pa oceniti njihovega števila. Barvilo BODIPY 493/503 smo vedno uporabljali v kombinaciji z barvilom 7-AAD, da smo količino LK lahko ločeno kvantificirali v živih in mrtvih celicah.

Celice HUVEC smo z gostoto 3×10^4 celic/cm² (500 μ L na vdolbinico) nasadili v prozorne plošče s 24 vdolbinicami. Gojili smo jih v 500 μ L kompletnega medija. Po 24 urah smo celice izpostavili različnim kemikalijam (OK, DGAT inhibitorji, N-acetilcistein (NAC), α -tokoferol) in/ali SPIONom. Po končani izpostavitvi smo celice odlepili s TrypleSelect in jih prenesli v steklene epruvete za pretočno citometrijo ter jih centrifugirali. Nato smo celični pelet resuspendirali v 300 μ L raztopine BODIPY 493/503 (0,5 μ g/mL) v Hanksovi solni raztopini (HBSS) ter 10 minut inkubirali na sobni temperaturi. Nato smo dodali 7-AAD s končno koncentracijo 5 μ g/mL in inkubirali še nadaljnjih 5 minut ter celice prestavili na led. Analizirali smo jih s pretočnim citometrom FACSCalibur in programom CellQuest Pro. Za ekscitacijo fluorokromov smo uporabili laser z valovno dolžino 488 nm. Signal za barvilo 7-AAD smo zajemali s filtrom FL-3 (670/LP), signal za BODIPY 493/503 pa s filtrom FL-1 (530/30). Analizo smo izvedli na najmanj 20.000 dogodkih na vzorec. Vsak poskus smo ponovili najmanj dvakrat in vzorce pripravili v duplikatih.

3.6.2 Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti v živih celicah z barvili CM-H₂DCFDA in 7-AAD

Celice smo gojili in izpostavljali kemikalijam in SPIONom na enak način, kot je opisano v poglavju »Določanje mrtvih celic z barvilom 7-AAD ter kvantifikacija lipidnih kapelj z barvilom BODIPY 493/503«. Po končanih izpostavitvah smo odstranili celični medij in v vsako vdolbinico dodali 500 μ L barvila CM-H₂DCFDA (1 μ M) v mediju brez FBS in inkubirali v celičnem inkubatorju (37 °C, atmosfera s 5 % CO₂, visoka zračna vlažnost) 30 minut. Nato smo barvilo odstranili in celice v inkubatorju inkubirali z medijem brez FBS nadaljnji 2 uri. Celice smo odlepili s TrypleSelect in jih prenesli v steklene epruvete za pretočno citometrijo ter jih centrifugirali. Celični pelet smo resuspendirali v 400 μ L HBSS, dodali 7-AAD s končno koncentracijo 5 μ g/mL in inkubirali na sobni temperaturi 10 minut. Analizirali smo jih s pretočnim citometrom FACSCalibur in programom CellQuest Pro. Za ekscitacijo fluorokromov smo uporabili laser z valovno dolžino 488

nm. Signal za barvilo 7-AAD smo zajemali s filtrom FL-3 (670/LP), signal za CM-H₂DCFDA pa s filtrom FL-1 (530/30). ROS smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Analizo smo izvedli na najmanj 20.000 dogodkih na vzorec. Vsak poskus smo ponovili najmanj trikrat in vzorce pripravili v duplikatih.

3.6.3 Določanje lipidne peroksidacije z barvilom BODIPY 581/591 C11

Lipidno peroksidacijo smo določali s pretočno citometrijo z barvilom BODIPY 581/591 C11 (undekanojska kislina BODIPY 581/591). Undekanojska kislina BODIPY 581/591 se vgrajuje v membrane v celici in ostane v membranah tudi po oksidaciji. Neoksidirano barvilo fluorescira z valovno dolžino 590 nm, oksidacija večkrat nenasičenega butadienilnega dela barvila pa povzroči premik vrha fluorescenčne emisije s 590 nm na 510 nm.

Celice HUVEC smo z gostoto 3×10^4 celic/cm² (500 μ L na vdolbinico) nasadili v prozorne plošče s 24 vdolbinami. Gojili smo jih v 500 μ L kompletnega medija. Po 24 urah smo celice sprali s PBS in jih 30 min barvali s 300 μ L barvila BODIPY 581/591 C11 (1 μ M) v HBSS. Nato smo barvilo odstranili in celice izpostavljali kemikalijam in SPIONom. Po 24 urah smo in celice odlepili s TrypleSelect, jih prenesli v steklene epruvete za pretočno citometrijo, jih centrifugirali ter celični pelet resuspendirali v 300 μ L HBSS. Celice smo prestavili na led in jih analizirali s pretočnim citometrom FACSCalibur (Becton Dickinson, ZDA) in programom CellQuest Pro (Becton Dickinson, ZDA). Za ekscitacijo fluorokroma smo uporabili laser z valovno dolžino 488 nm. Signal za oksidirano obliko barvila BODIPY 581/591 smo zajemali z uporabo filtra FL-1 (530/30), signal za reducirano obliko pa z uporabo filtra FL-3 (670/LP). Analizo smo izvedli na najmanj 20.000 dogodkih na vzorec. Stopnjo lipidne peroksidacije smo izračunali kot razmerje intenzitet fluorescence oksidiranega barvila in reduciranega barvila.

3.7 IMUNODETEKCIJA PROTEINOV

3.7.1 Priprava celic za imunodetekcijo proteinov

V primerih, ko smo pri celicah izvedli transfekcijo z siRNA, je postopek gojenja opisan v poglavju 3.4 »Posttranskripcijsko utišanje gena za ATGL z uporabo male interferenčne RNA«. V vseh ostalih primerih smo celice z gostoto 3×10^4 celic/cm² (1000 μ L na vdolbinico) nasadili v prozorne plošče s 6 vdolbinami ter jih prvih 24 ur gojili v 1000 μ L kompletnega medija. Po 24 urah smo celice izpostavili različnim kemikalijam (OK, ferostatin-1, α -tokoferol, RSL3) in/ali SPIONom.

3.7.2 Priprava celičnih lizatov

Celice na ploščah smo prestavili na led in jih dvakrat sprali z ledeno mrzlim DPBS. Nato smo v vsako vdolbinico celicam dodali 100 μ L lizirnega pufru (sestava: Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Thermo Scientific, ZDA), 800 mM ditioneitol (DTT, Sigma Aldrich), fosfatni inhibitorji (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, ZDA) in proteazni inhibitorji (EDTA-Free Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, ZDA)). Celice smo postrgali s silikonskim strgalom, jih prenesli v epice ter jih denaturirali na 95 °C 10 min. Nato smo vzorce prestavili na led. Koncentracijo proteinov v vzorcih smo izmerili z uporabo kompleta Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific, ZDA) z dodatkom reagenta, ki omogoča delo z vzorci, v katerih je prisoten detergent natrijev dodecil sulfat (NaDS) (Ionic Detergent Compatible Reagent, Thermo Scientific, ZDA).

3.7.3 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS smo izvajali na 10 % poliakrilamidnih gelih v primeru določanja ATGL in 12,5 % gelih v primeru določanja GPX4. V obeh primerih je bila debelina gelov 1,5 mm. Količina nanešenega vzorca je ustrezala 10 μ g celokupnih proteinov v vzorcu. Elektroforeza je potekala pri stalnem toku 25 mA/gel.

3.7.4 Prenos western

Proteine smo po končani elektroforezi prenesli na nitrocelulozno membrano (Serva, Germany). Prenos je potekal 120 min pri konstantnem toku 200 mA v Towbinovem pufru (25 mM Tris-HCl, pH 8,4; 192 mM glicin, 0,1 % (m/v) NaDS, 20 % (v/v) metanol).

3.7.5 Označevanje s protitelesi

Po končanem prenosu western smo nezasedena mesta na membrani blokirali 1 h pri sobni temperaturi z rahlim stresanjem, in sicer v 5 % raztopini posnetega mleka v prahu v pufru TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) pri detekciji ATGL in GPX4 ter v 5 % blokirni raztopini (»Western Blocking Reagent« (WBR), Roche Applied Science, Nemčija) v pufru TBS z dodatkom 0,1 % Tween-20 (TBST) pri detekciji β -aktina, ki nam je služil kot nanašalna kontrola. Primarna zajčja monoklonska protitelesa proti humani ATGL (#2138, Cell Signaling Technology, ZDA) in GPX4 (#52455, Cell Signaling Technology, ZDA) smo redčili v razmerju 1 : 1000 v 5 % raztopini posnetega mleka v prahu v pufru TBST, primarna protitelesa proti β -aktinu (#NB600-532, Novus Biologicals, VB) pa v razmerju 1 : 5000 v 0,5 % WBR v pufru TBS. Membrane smo s primarnimi protitelesi inkubirali preko noči pri 4 °C z rahlim stresanjem. Po treh 10-

minutnih korakov spiranja membrane v pufru TBST oziroma štirih 15-minutnih korakov spiranja s TBST v primeru β -aktina smo membrane na sobni temperaturi z rahlim stresanjem 1 uro inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, ZDA), ki smo jih redčili v razmerju 1:10.000 v 0,5 % WBR v pufru TBS. Po treh 10-minutnih korakov spiranja v pufru TBST smo membrano 1 minuto inkubirali v raztopini substrata za kemiluminiscenčno reakcijo Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Applied Science, Nemčija) in jo nato fotografirali z aparaturo ChemiDoc XRS+ (Biorad, ZDA). Intenziteto lis smo analizirali s programom ImageJ (National Institutes of Health, ZDA).

3.8 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

3.8.1 Barvanje lipidnih kapelj z barvilom BODIPY 493/503 in celičnih jeder s Hoechst 33342

V primerih, ko smo pri celicah izvedli transfekcijo z siRNA, je postopek nasajanja in transfekcije opisan v poglavju »Posttranskripcijsko utišanje gena za ATGL z uporabo male interferenčne RNA«. V ostalih primerih smo celice HUVEC z gostoto 1×10^4 celic/cm² (500 μ L na vdolbinico) v kompletnem celičnem mediju nasadili na krovno stekelca v prozorni plošči s 24 vdolbinicami. Čez 24 ur smo celice v mediju brez FBS izpostavili različnim kemikalijam in/ali ND. Po koncu izpostavitve smo celice sprali z DPBS in jih fiksirali s 4 % formaldehidom v DPBS (10 min, 37 °C). Nato smo jih ponovno sprali z DPBS in jih 10 min na sobni temperaturi barvali z barvilom BODIPY 493/503 v DPBS s koncentracijo 1 μ g/mL. Po spiranju z DPBS smo jih 30 min na sobni temperaturi barvali z barvilom Hoechst 33342 s koncentracijo 2 μ g/mL ter na koncu še enkrat sprali z DPBS. Krovno stekelce s fiksiranimi celicami smo položili na objektno stekelce, na katerega smo pred tem nanесли kapljico reagenta proti bledenju fluorescentnih barvil (ProLong Gold Antifade Mountant, Life Technologies, ZDA). Posnetke smo zajemali z epifluorescentnim mikroskopom (Axio Imager.Z1; Carl Zeiss, Jena, Nemčija) z objektivom s 40-kratno povečavo. Za slikanje celičnih jeder, označenih z barvilom Hoechst 33342, smo uporabili set filtrov (Filter Set 01 – 488001, Zeiss), ki vsebuje vzbujevalni filter BP 365/12, dikroično zrcalo FT 395 in zaporni filter LP 397. Za slikanje LK smo uporabili set filtrov (Filter set 09 – 488009, Zeiss), ki vsebuje vzbujevalni filter BP 450-490, dikroično zrcalo FT 510 in zaporni filter LP 515. Mikroskopske posnetke smo pridobili s programom AxioVision (Carl Zeiss, Nemčija).

3.9 INFRARDEČA SPREKTROSKOPIJA Z UPORABO FURIERJEVE TRANSFORMACIJE

Infrardeča (IR) spektroskopija je nedestruktivna analizna metoda, pri kateri vzorec presvetlimo z žarkom IR svetlobe ter spremljamo količino svetlobe, ki jo vzorec

absorbira ali prepusti (transmitira). Absorbiran foton IR svetlobe v molekulah spremeni vibracijska ali rotacijska stanja kovalentnih vezi, pri čemer pride do spremenjenega dipola v molekuli. Za tekočine in trdne snovi je molekulska rotacija omejena, zato so v teh dveh primerih pogostejše vibracije. Različne vrste vibracij in rotacij absorbirajo na različnih frekvencah znotraj IR območja, zato molekule tvorijo edinstvene IR spektre (t.i. molekulski prstni odtis). IR spektroskopija se tako uporablja predvsem za identifikacijo spojin in določanje sestave vzorca. Poleg tega se jo lahko uporablja tudi za kvantitativno analizo, saj je višina vrhov sorazmerna koncentraciji molekul v vzorcu. Surovi podatki, ki jih dobimo pri meritvi z IR spektrofotometrom, niso primerni za interpretacijo, zato jih je potrebno z matematičnim postopkom, imenovanim Fourierjeva transformacija, pretvoriti v prepustnostni ali absorpcijski spekter, ki prikazuje količino prepuščene ali absorbirane svetlobe na navpični osi in valovno število v enotah recipročnih centimetrov (cm^{-1}) na vodoravni osi.

3.9.1 Uporaba infrardeče spektroskopije pri analizi bioloških vzorcev

IR spektroskopija predstavlja močno orodje za preučevanje bioloških molekul, vključno z beljakovinami, lipidi, ogljikovimi hidrati in nukleinskimi kislinami. Na podlagi IR spektrov lahko identificiramo biološke molekule in karakteriziramo spremembe v njihovi kemijski strukturi.

IR spekter lahko razdelimo na tri regije: daljne IR območje ($<400 \text{ cm}^{-1}$), srednje IR območje ($4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$) in bližnje IR območje ($13000\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$). Najbolj uporabni deli IR spektra za preučevanje bioloških sistemov so srednje in bližnje IR regije (Stuart, 2012). Vibracijska gibanja posameznih kemijskih vezi za vse molekule ležijo v območju valovnih dolžin $2\text{--}20 \mu\text{m}$ ($500\text{--}5000 \text{ cm}^{-1}$). To je območje absorpcije skoraj vseh znotraj-molekularnih gibanj v biomolekulah in je bogato z informacijami o njihovi sestavi, strukturi in konformaciji. Različna razmerja in / ali konformacije biomolekul v IR spektru povzročajo majhne razlike v absorpcijskih vrhovih (npr. spremenjena oblika krivulje, frekvenčni premik ali sprememba intenzitete), kar nakazuje na spremembe na celičnem ali tkivnem nivoju (Dumas in sod., 2007).

IR spektri bioloških vzorcev so precej kompleksni, vendar pa je vsem skupnih nekaj glavnih značilnosti, ki jih lahko prepoznamo na določenih območjih:

- amidno I območje (1650 cm^{-1}): $\nu(\text{C}=\text{O})$ valenčno nihanje v amidnih vezeh proteinov
- amidno II območje (1550 cm^{-1}): $\delta(\text{N-H})$ prečno in $\nu(\text{C-N})$ valenčno nihanje amidnih vezi
- $\nu(\text{C}=\text{O})$ valenčno nihanje lipidov (1740 cm^{-1})
- antisimetrično $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ valenčno nihanje fosfatnih skupin v nukleinskih kislinah in fosfolipidih ($1240 \text{ cm}^{-1}\text{--}1225 \text{ cm}^{-1}$)

- simetrično $\nu_s(\text{PO}_4^{2-})$ valenčno nihanje fosfatnih skupin v nukleinskih kislinah in fosfolipidih (1080 cm^{-1})

Klasična spektroskopska analiza je pri spektrih kompleksnih tkiv izjemno težka, zato si pri interpretaciji pomagamo z uporabo multivariatnih statističnih pristopov, kot je na primer analiza glavnih komponent (ang. principal component analysis, PCA) (Dumas in sod., 2007).

3.9.2 Priprava vzorcev za infrardečo spektroskopijo

Celice HUVEC smo z gostoto 3×10^4 celic/ cm^2 ($1000 \mu\text{L}$ na vdolbinico) nasadili v prozorne plošče s 6 vdolbinicami. Gojili smo jih v $1000 \mu\text{L}$ kompletnega medija. Po 24-urni inkubaciji smo odstranili medij in v vsako vdolbinico dodali $1000 \mu\text{L}$ pripravljene redčitve OK ($100 \mu\text{M}$) in/ali ND ($50 \mu\text{g/mL}$). Po 24-urni izpostavitvi smo odstranili medij in celice sprali s DPBS. Celice smo od podlage odlepili s TrypleSelect in jih centrifugirali (200 g , 10 min). Nato smo pelet resuspendirali v $700 \mu\text{L}$ DPBS in celice ponovno centrifugirali (200 g , 10 min). Po centrifugiranju smo odstranili DPBS in celice fiksirali tako, da smo pelet resuspendirali v 4% formaldehidu v DPBS. Po 30 minutah smo celice sprali z DPBS in nato resuspendirali v svežem DPBS. Celice smo na ledu transportirali do sinhrotrona Elettra v Bazovici, kjer so bile izvedene meritve in analize.

3.9.3 Infrardeča spektroskopija vzorcev

IR podatki so bili pridobljeni na sinhrotronu Elettra v Bazovici v okviru projekta 20175212, in sicer na žarkovni liniji SISSI, ki zajema IR in vidne komponente sinhrotronske emisije za izvajanje spektroskopije, mikrospektroskopije in slikanja. Spektri posameznih celic so bili posneti v hidriranih pogojih. Meritve so bile opravljene z IR/Vis mikroskopom Hyperion 3000 (BRUKER Optics, ZDA) z detektorjem MCT (ang. Mercury-Cadmium-Telluride) (Infrared Associates inc., ZDA), povezanim z Vertex70V v vakuumskem interferometru (BRUKER Optics, ZDA) in sinhrotronsko emisijo kot virom svetlobe. Parametri zajemanja so bili naslednji: 512 skeniranj pri spektralni ločljivosti 4 cm^{-1} , hitrost interferometra 120 kHz .

IR meritve je izvedel dr. Giovanni Birarda na sinhrotronu Elettra v Bazovici.

3.9.4 Obdelava podatkov

Pridobljenim podatkom smo najprej odšteli prispevek atmosfirske vode in ogljikovega dioksida ter prispevek pufru. Nato smo podatke obdelali s programom Quasar (quasar.codes) v območju $3100\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$, drugi odvod smo izračunali z algoritmom Savitzky-Golay z glajenjem v 21 točkah, za celotno območje pa je bila uporabljena

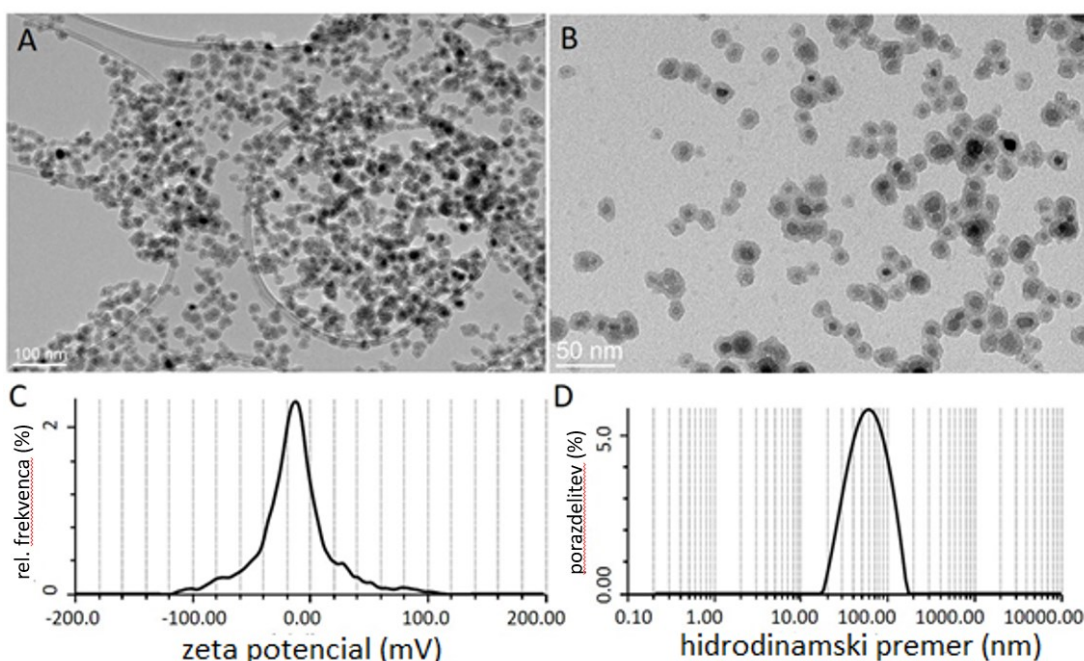
vektorska normalizacija. Izračunali smo integrale pasov, ki ustrezajo naslednjim komponentam: C=C, CH₃, CH₂, lipidom, C=O, proteinom in nukleinskim kislinam. Nato smo izračunali tudi razmerja med integrali določenih pasov. Razlike vrednosti integralov in njihovih razmerij so bile ovrednotene z enosmerno ANOVA s Tukeyjevim in Bonferronijevim testom v programu Origin 2021 (OriginLab).

Podatke FTIR ja analiziral in statistično obdelal dr. Giovanni Birarda na sinhrotronu Elettra v Bazovici.

4 REZULTATI

4.1 LASTNOSTI SPIONov

Povprečna velikost s silicijevim dioksidom prevlečenih SPIONov (v nadaljevanju SPIONov), določena s TEM, znaša $19,3 \pm 2,0$ nm (slika 1A, B). Debelina prevleke iz silicijevega dioksida je približno 4 nm. Izmerjena vrednost zeta potenciala v celičnem gojišču je $-18,7 \pm 1,6$ mV, meritve DLS pa so pokazale, da povprečni hidrodinamski premer v mediju znaša 57 nm (Slika 1C, D). Rentgenska kristalografija ND je pokazal eno samo spinelno fazo, medtem ko je Mossbauerjeva spektroskopija potrdila, da so SPIONI sestavljeni iz maghemita (Tadic in sod., 2014).

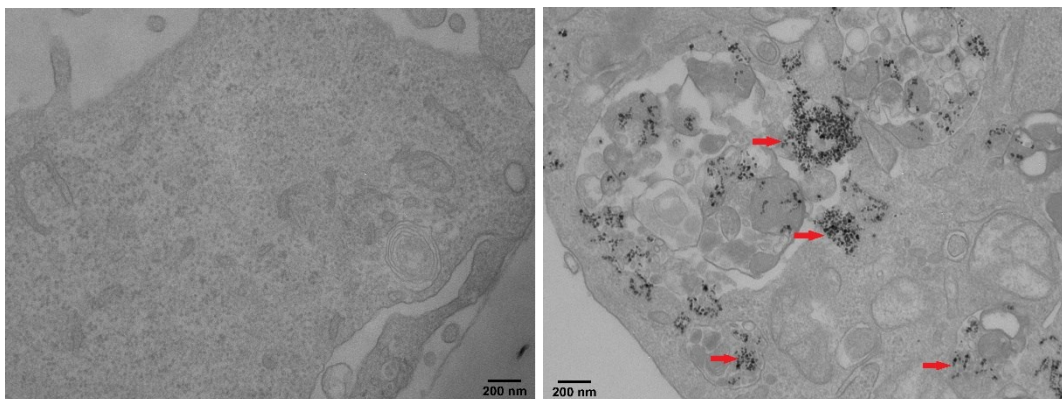


Slika 3: Lastnosti SPIONov.

Reprezentativna TEM slika SPIONov pri manjši (A) in večji povečavi (B). Porazdelitev zeta potenciala SPIONov v celičnem mediju (C). Porazdelitev hidrodinamskega premera SPIONov v celičnem mediju (D).

4.2 PRISOTNOST SPIONov V CELICAH HUVEC

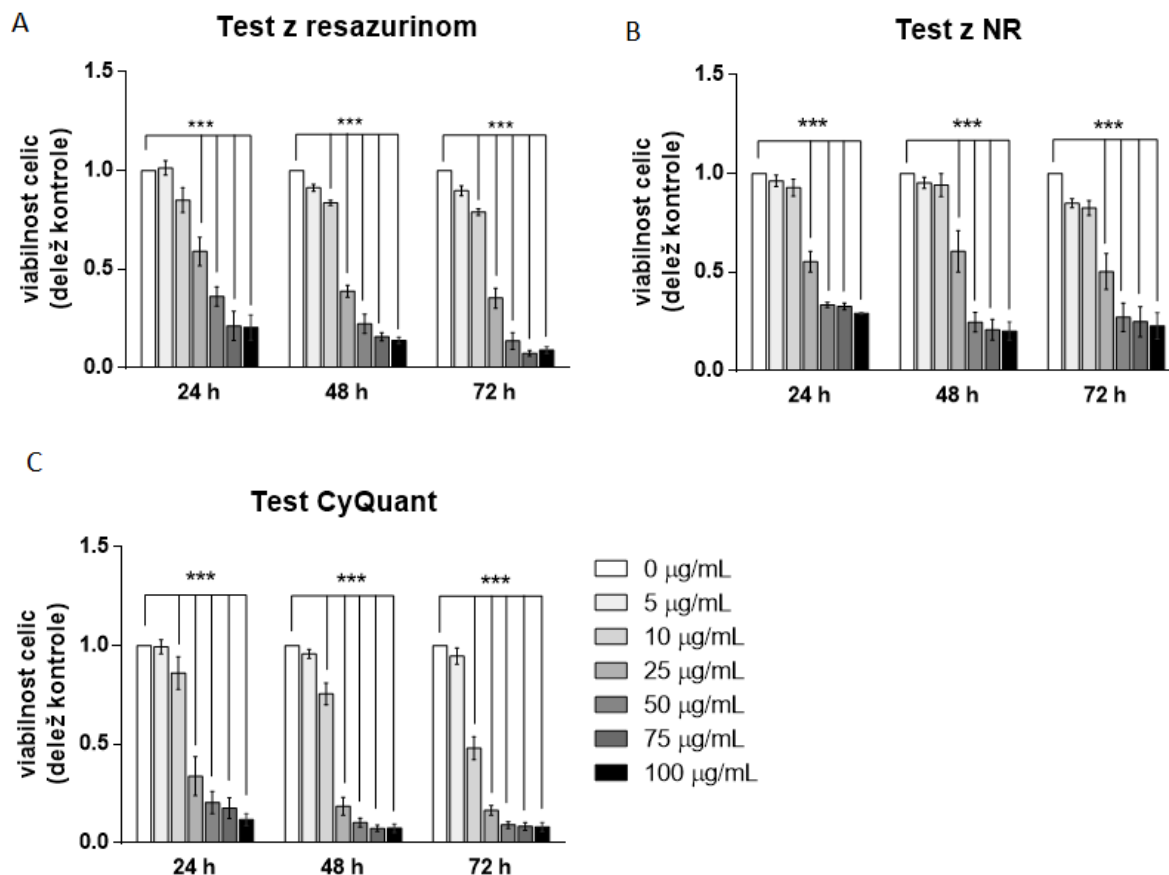
TEM slike celic HUVEC, izpostavljenih SPIONom, so pokazale, da se SPIONI pri koncentraciji $50 \mu\text{g/mL}$ po 24 urah internalizirajo v celice HUVEC. SPIONE smo opazili v endocitotskih veziklih in amfisomih (Slika 4), nismo pa jih opazili prosto v citoplazmi.



Slika 4: Endotelijske celice učinkovito privzemajo SPIONe. Reprezentativna TEM slika neizpostavljenih celic HUVEC (levo) in celic HUVEC, ki so bile 24 ur izpostavljene SPIONom pri koncentraciji 50 µg/mL (desno). Z rdečimi puščicami so označeni elektronsko gosti SPIONi v amfisosmih. Merilo: 200 nm.

4.3 CITOTOKSIČNOST SPIONov

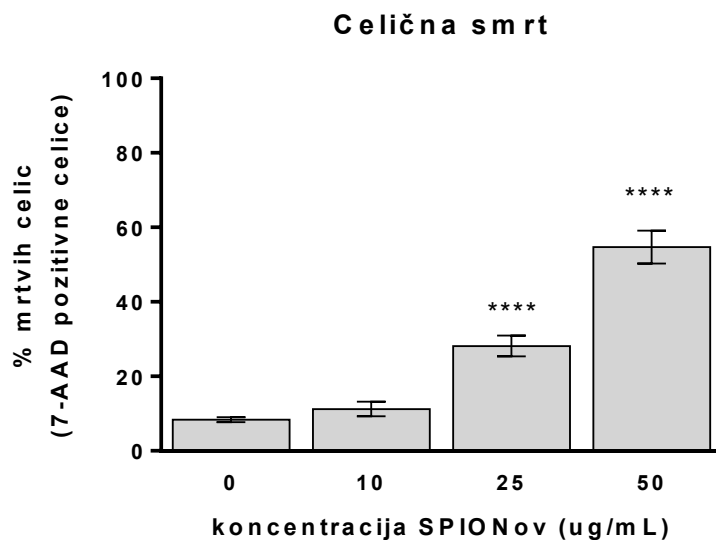
Citotoksičnost SPIONov smo določali s tremi različnimi testi viabilnosti. Test z resazurinom in test z NR sta po 24-urni izpostavitvi zaznala citotoksičnost pri koncentracijah SPIONov nad 25 µg/mL, test CyQunat pa že pri koncentracijah nad 10 µg/mL. Daljši časi izpostavitve niso bistveno povečali citotoksičnih učinkov, sta pa test z resazurinom in test z NR po 48-urni in 72-urni izpostavitvi citotoksičnost zaznala že pri koncentracijah nad 10 µg/mL. Grafični prikaz rezultatov je prikazan na Sliki 5.



Slika 5: Citotoksičnost SPIONov.

Celice HUVEC smo izpostavili SPIONom za 24 ur, 48 ur in 72 ur. Citotoksičnost smo vrednotili s testom z resazurinom (A), testom z NR (B) in testom CyQuant (C). Podatki na grafih so prikazani kot povprečni deleži viabilnosti kontrolnih (neizpostavljenih) celic (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev. Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

Ker testi viabilnosti pri različnih časih izpostavitve niso pokazali, da bi daljši čas izpostavitve (48 ur in 72 ur) bistveno vplival na citotoksičnost, smo v nadaljevanju celice SPIONom izpostavljali 24 ur. Citotoksičnost SPIONov po 24 urah smo določili še s pretočno citometrijo z barvilom 7-AAD. To metodo smo nato v nadaljnjih poskusih uporabljali za določitev odstotka mrtvih celic. Po 24-urni izpostavitvi je pri koncentraciji SPIONov 50 $\mu\text{g/mL}$ delež mrtvih celic znašal približno 60 %, ker je primerljivo z rezultati testa z resazurinom in testa z NR. Grafični prikaz rezultatov testa z barvilom 7-AAD je prikazan na Sliki 6.

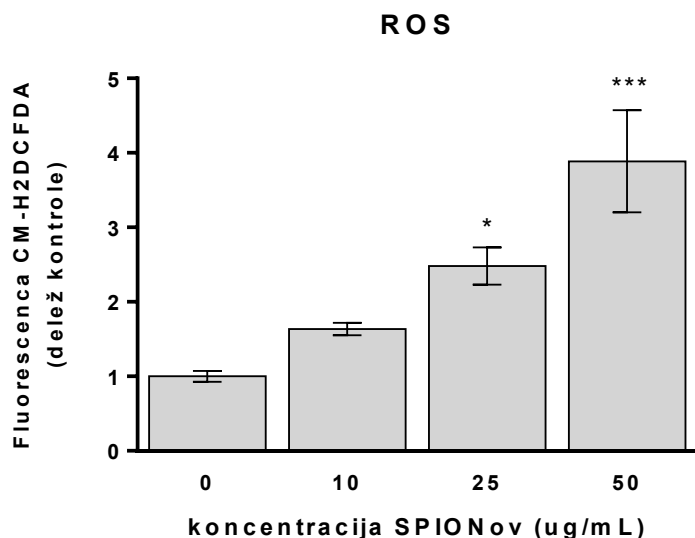


Slika 6: Vpliv SPIONov na celično smrt.

Celice HUVEC smo izpostavili SPIONom za 24 ur. Delež mrtvih celic smo določali s pretočno citometrijo z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo delež mrtvih celic (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev. Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

4.4 VPLIV SPIONov NA KOLIČINO REAKTIVNIH KISI KOVIH ZVRSTI V ŽIVIH CELICAH

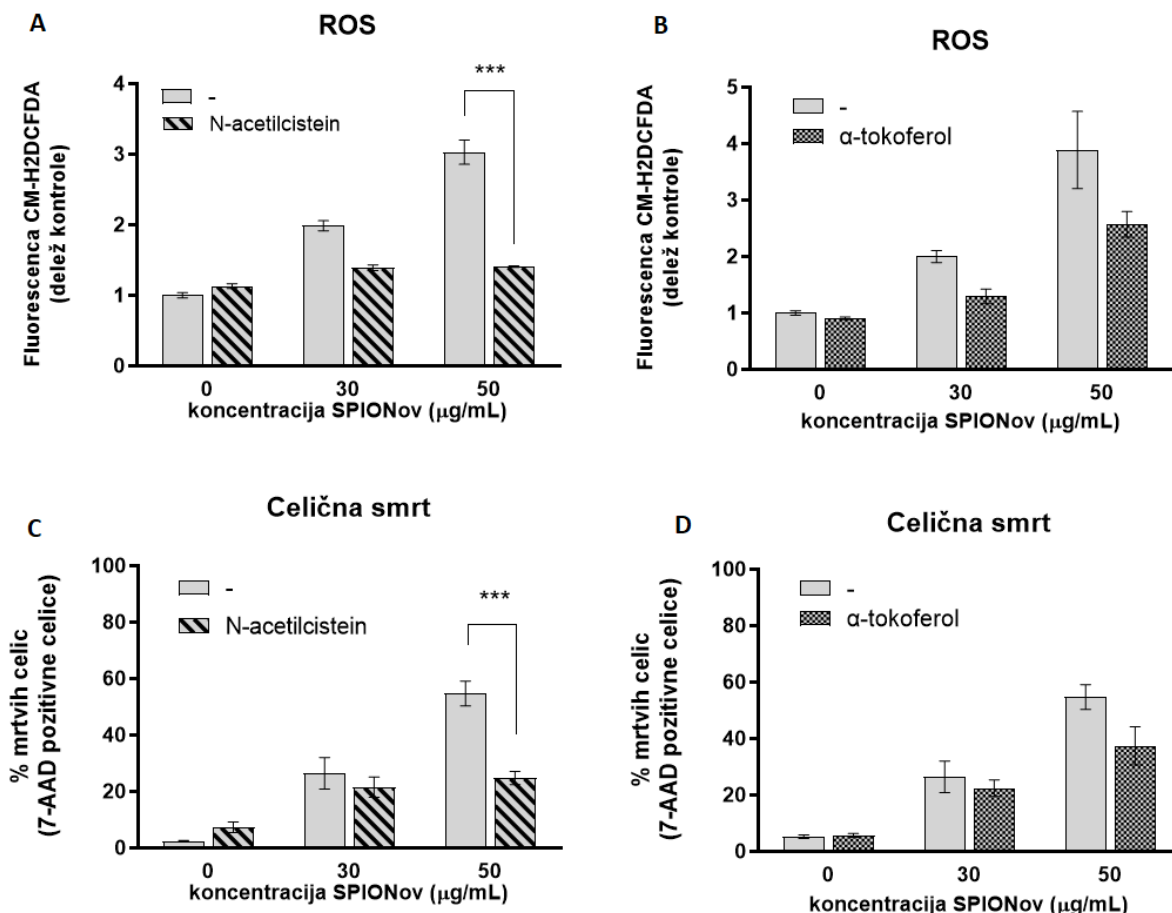
Naši predhodni rezultati so pokazali, da je količina ROS v mrtvih celicah precej višja kot pri živih celicah. Ker nas je zanimala količina ROS v živih celicah, smo pri merjenju količine ROS celice vedno ločili na žive in mrtve ter količino ROS merili samo v živih celicah. Rezultati meritev intenzitete fluorescence barvila CM-H₂DCFDA v živih celicah so pokazali, da SPIONi v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno povečujejo količino ROS. Grafični prikaz rezultatov testa z barvili CM-H₂DCFDA in 7-AAD je prikazan na Sliki 7.



Slika 7: Vpliv SPIONov na količino ROS v živih celicah.

Celice HUVEC smo izpostavili SPIONom za 24 ur. Količino ROS smo določali s pretočno citometrijo z barvilom CM-H₂DCFDA. Količino ROS smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo povprečno intenziteto fluorescence barvila CM-H₂DCFDA (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah. Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

Da bi ugotovili, ali je oksidativni stres glavni vzrok celične smrti, ki jo povzročajo SPIONi, smo celice hkrati izpostavili SPIONom in enemu od antioksidantov (N-acetilcisteinu ali α -tokoferolu). Proizvodnjo znotrajceličnih ROS smo merili s pretočno citometrijo z barvilom CM-H₂DCFDA, celično smrt pa smo določili z uporabo barvila 7-AAD. Rezultati kažejo, da tako N-acetilcistein kot α -tokoferol do določene mere zmanjšata količino ROS in celično smrt, ki jo povzročajo SPIONi. Samo pri višji koncentraciji N-acetilcisteina je znižanje količine ROS statistično značilno. Rezultati so prikazani na Sliki 8.



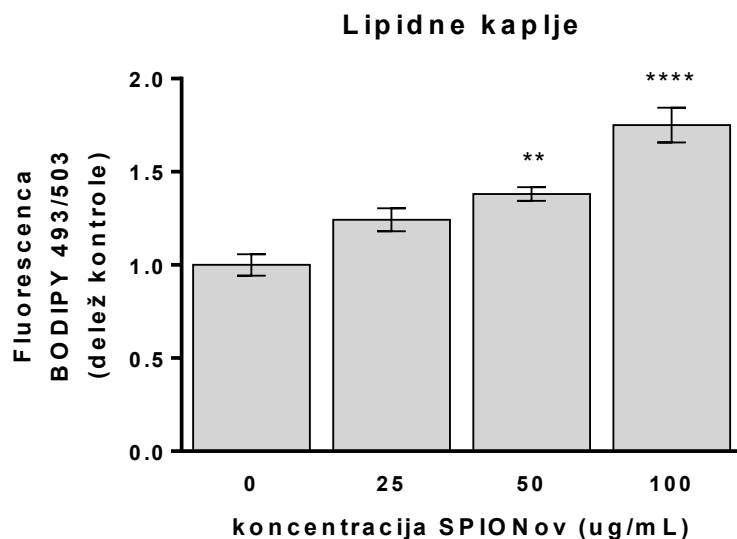
Slika 8: Vpliv N-acetilcisteina in α -tokoferola na količino ROS in celično smrt pri celicah, izpostavljenih SPIONom.

Celice HUVEC smo za 24 ur izpostavili N-acetilcisteinu (20 mM) ali α -tokoferolu (1 mM) ter SPIONom. Količino ROS in celično smrt smo kvantificirali s pretočno citometrijo z uporabo barvil CM-H₂DCFDA in 7-AAD. Količino ROS smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo povprečno intenziteto fluorescence barvila CM-H₂DCFDA (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah. Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

4.5 VPLIV SPIONov NA KOLIČINO LIPIDNIH KAPELJ V ŽIVIH CELICAH

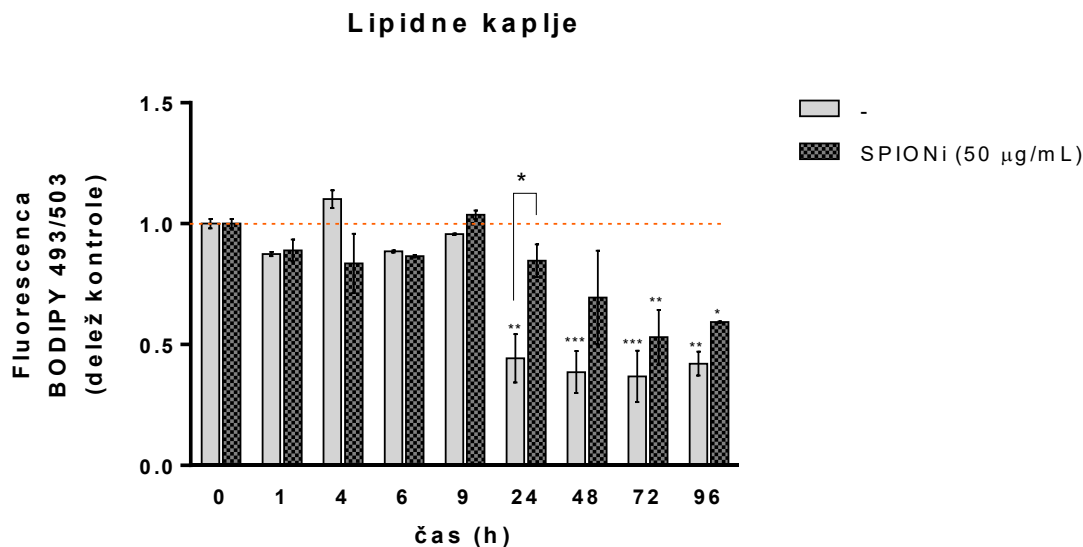
Naši predhodni rezultati so pokazali, da je količina LK v mrtvih celicah vsaj dvakrat nižja kot pri živih celicah. Ker nas je zanimala količina LK v živih celicah, smo pri merjenju količine LK celice vedno ločili na žive in mrtve ter količino LK merili samo v živih celicah. Celice smo izpostavili SPIONom (25, 50 in 100 µg/ml) za 24 ur in s pretočno citometrijo merili količino LK. Opazili smo, da je količina LK večja v celicah, ki so bile izpostavljene SPIONom, kot v neizpostavljenih celicah (Slika 9), kar kaže, da SPIONi v celicah povzročajo kopičenje LK. Da bi ugotovili, kakšna je v naših eksperimentalnih pogojih dinamika količine LK v daljšem časovnem obdobju, smo celice izpostavili SPIONom za 96 ur. Rezultati so pokazali, da se količina LK tako v kontrolnih celicah kot v celicah, izpostavljenih SPIONom, s časoma zmanjšuje, pri čemer je upad količine LK

v celicah, izpostavljenih SPION, počasnejši (Slika 10). Upad količine LK pri neizpostavljenih celicah je bil pričakovan, saj smo celice gojili v mediju brez FBS, zaradi česar je celicam primanjkovalo hranil.



Slika 9: Vpliv SPIONov na količino LK v živih celicah.

Celice HUVEC smo izpostavili SPIONom za 24 ur. Količino LK smo določali s pretočno citometrijo z barvilom BODIPY 493/503. Količino LK smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo povprečno intenziteto fluorescenca barvila BODIPY 493/503 (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev, normalizirano na intenziteto fluorescenca pri kontrolnih celicah. Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

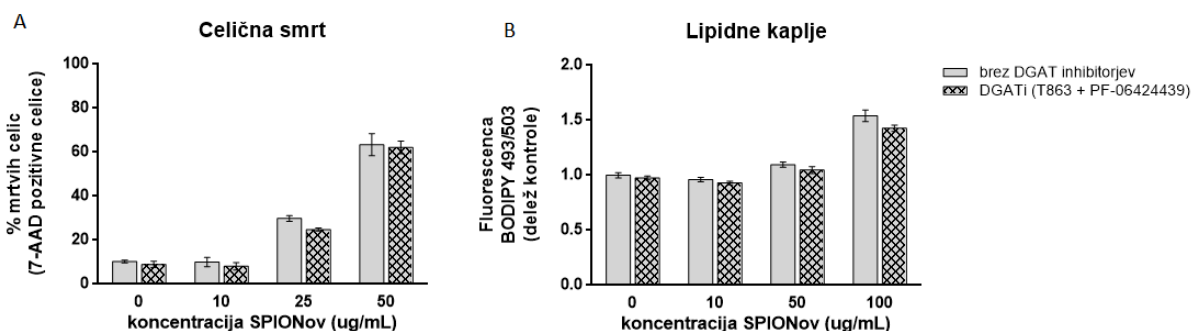


Slika 10: Vpliv SPIONov na količino LK po različnih časih izpostavitve.

Celice HUVEC smo izpostavili SPIONom s koncentracijo 50 µg/mL za 1 h, 4 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h, 72 h in 96 h ter količino LK določali s pretočno citometrijo z barvilom BODIPY 493/503. Količino LK smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo povprečno intenziteto fluorescence barvila BODIPY 493/503 (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah v časovni točki $t=0$ h. Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

4.6 VPLIV INHIBICIJE ENCIMOV DGAT NA KOLIČINO LIPIDNIH KAPELJ PRI CELICAH, IZPOSTAVLJENIH SPIONom

Naši predhodni rezultati so pokazali, da SPIONi v celicah povzročajo kopičenje LK, vendar pa iz dobljenih rezultatov ne moremo sklepati o mehanizmu kopičenja LK. Možno je, da bi SPIONi v celicah inducirali sintezo novih LK ali pa zavirali razgradnjo obstoječih LK. Da bi podrobneje raziskali kopičenje LK, smo celice hkrati izpostavili SPIONom in zaviralcem sinteze LK (inhibitorjem DGAT). Predpostavljali smo, da bi v primeru, če bi SPIONi stimulirali sintezo novih LK, dodatek DGAT inhibitorjev to sintezo zavrl. Ker imajo LK pogosto zaščitno vlogo v celici, bi lahko preprečena sinteza LK vplivala tudi na delež celične smrti, zato smo spremljali tudi vpliv na celično smrt. Celično smrt in količino LK smo kvantificirali s pretočno citometrijo z uporabo barvila 7-AAD in BODIPY 493/503. Rezultati meritev z barvilom 7-AAD so pokazali, da DGAT inhibitorji ne vplivajo na celično smrt, ki jo povzročajo SPIONi (Slika 11A). Prav tako DGAT inhibitorji ne vplivajo na količine LK, ki je pri celicah, ki so bile izpostavljene SPIONom, višja kot pri neizpostavljenih celicah (Slika 11B). Ti rezultati kažejo na to, da SPIONi pri izbranih eksperimentalnih pogojih ne stimulirajo sinteze LK, ampak verjetno zavirajo njihovo razgradnjo.

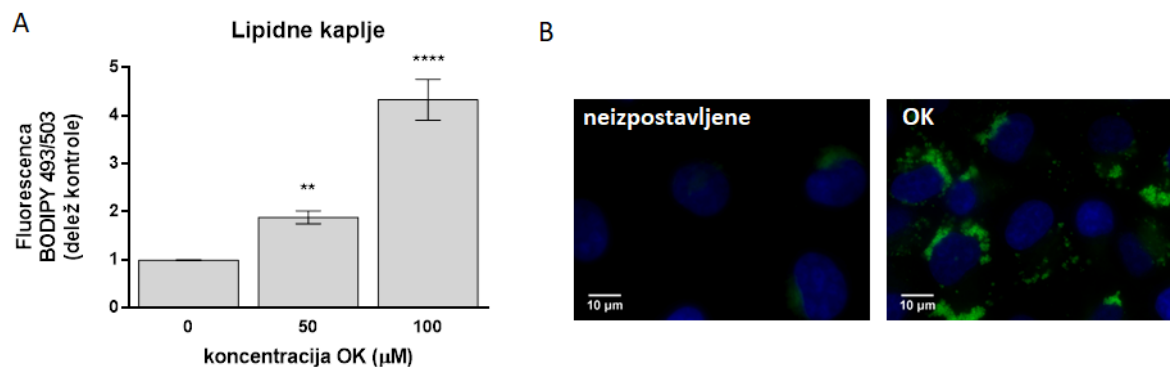


Slika 11: Vpliv inhibicije encima DGAT na celično smrt in količino LK pri celicah, izpostavljenih SPIONom.

Celice HUVEC smo izpostavili kombinaciji DGAT1 in DGAT2 inhibitorjev (T863 in PF-06424439) in SPIONom za 24 ur. Delež mrtvih celic smo določali s pretočno citometrijo z barvilom 7-AAD, količino LK pa z barvilom BODIPY 493/503. Količino LK smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo delež mrtvih celic (A) in intenziteto fluorescence barvila BODIPY 493/503, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah (B). Na obeh grafih so prikazane povprečne vrednosti vsaj treh bioloških ponovitev poskusa (\pm SEM).

4.7 VPLIV OLEINSKE KISLINE NA TVORBO LIPIDNIH KAPELJ V CELICAH

Ker je iz literature znano, da LK lahko ščitijo celico pred različnimi stresorji, nas je v nadaljevanju zanimalo, ali se celice z večjo količino LK bolje spopadajo s škodljivimi učinki SPIONov. V ta namen smo v celicah HUVEC stimulirali sintezo LK z dodatkom OK. Najprej smo preverili, ali v celicah HUVEC ob dodatku OK pride do sinteze LK. Rezultati meritev intenzitete fluorescence barvila BODIPY 493/503 v živih celicah so pokazali, da OK v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno povečuje količino LK (Slika 12A). Tudi rezultati fluorescenčne mikroskopije, pri kateri smo za detekcijo LK uporabili isto barvilo, so potrdili, da je količina LK precej večja v celicah, ki so bile izpostavljene OK, kot pa v kontrolnih celicah, kjer je količina LK zelo majhna. Posnetki kontrolnih in izpostavljenih celic so prikazani na Sliki 12B.

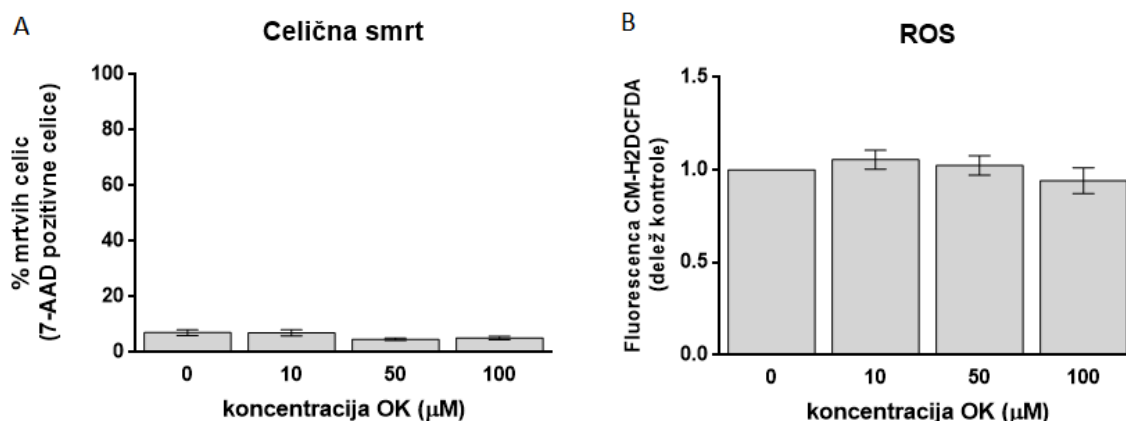


Slika 12: Vpliv OK na količino LK v živih celicah.

Celice HUVEC smo izpostavili 100 μM OK za 24 ur. (A) Količino LK smo določali s pretočno citometrijo z barvilom BODIPY 493/503. Količino LK smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo povprečno intenziteto fluorescence barvila BODIPY 493/503 (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah. Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$). (B) Celice smo obarvali z barvilom BODIPY 493/503 za vizualizacijo LK in z barvilom Hoechst 33342 za vizualizacijo jeder. Celice smo analizirali z epifluorescentnim mikroskopom. Merilo: 10 μm .

4.8 VPLIV OLEINSKE KISLINE NA CELIČNO SMRT IN KOLIČINO REAKTIVNIH KISI KOVIH ZVRSTI

Preden smo izvedli nadaljnje poskuse z OK, smo želeli preveriti, ali OK v celicah HUVEC vpliva na količino ROS in delež mrtvih celic. Celice HUVEC smo izpostavili OK za 24 ur. Količino mrtvih celic in količino ROS smo določali s pretočno citometrijo z barvili 7-AAD in CM-H₂DCFDA. Naši rezultati so skladno s podatki iz literature pokazali, da pri koncentracijah do 100 μM OK ne povzroča celične smrti (Slika 13A) in ne povečuje količine ROS v celicah HUVEC (Slika 13B).

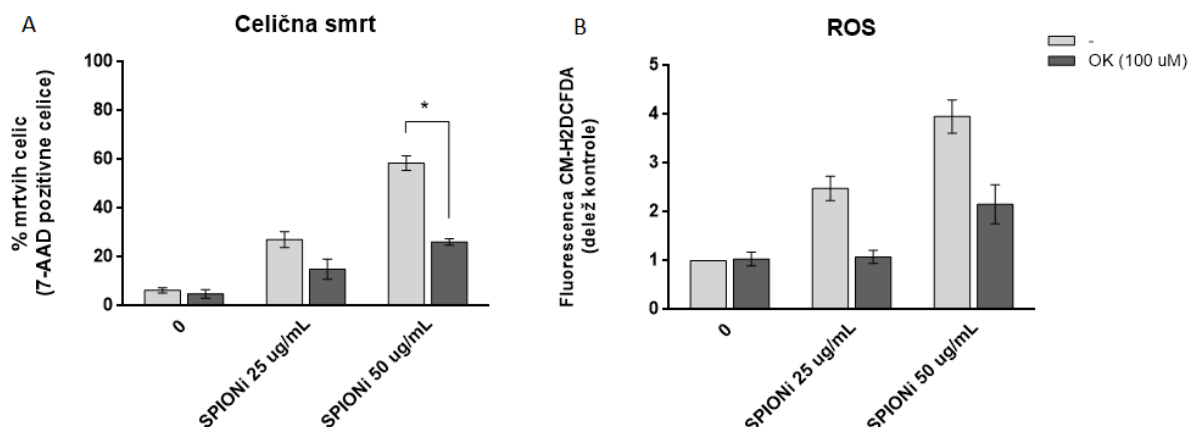


Slika 13: Vpliv OK na celično smrt in količino ROS v živih celicah.

Celice HUVEC smo izpostavili OK za 24 ur. Količino mrtvih celic in količino ROS smo določali s pretočno citometrijo z barvili 7-AAD in CM-H₂DCFDA. Količino ROS smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo delež mrtvih celic (A) in intenziteto fluorescence barvila CM-H₂DCFDA, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah (B). Na obeh grafih so prikazane povprečne vrednosti vsaj treh bioloških ponovitev poskusa (\pm SEM).

4.9 VPLIV OLEINSKE KISLINE NA S SPIONI POVZROČENO CELIČNO SMRT IN OKSIDATIVNI STRES

Da bi preverili, ali OK zniža delež celične smrti in oksidativni stres, ki ga povzročijo SPIONI, smo celice sočasno izpostavili OK in SPIONom ter merili delež mrtvih celic in ROS. Celice smo pobarvali z barvili 7-AAD in CM-H₂DCFDA ter jih analizirali s pretočnim citometrom. Pri analizi ROS smo mrtve celice, ki so se obarvale z barvilom 7-AAD, izločili iz analize in količino ROS določali samo v živih celicah. Rezultati so pokazali, da OK znižuje s SPIONI povzročeno celično smrt (Slika 14A) in količino ROS (Slika 14B).



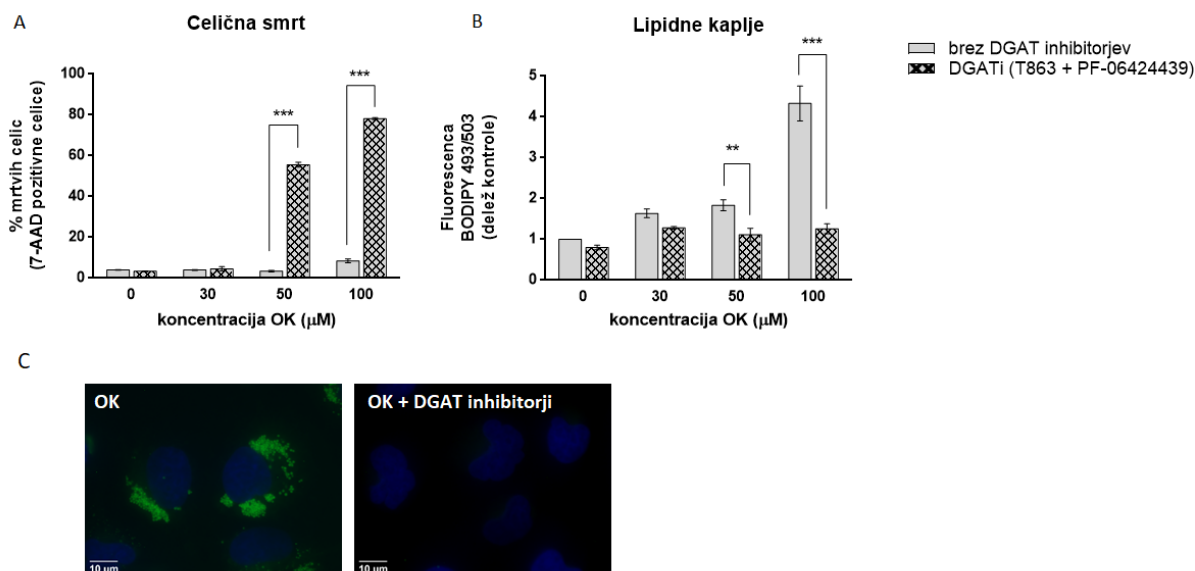
Slika 14: Vpliv OK na s SPIONi povzročeno celično smrt in oksidativni stres. Celice HUVEC smo sočasno izpostavili 100 μ M OK in SPIONom za 24 ur. Delež mrtvih celic in količino ROS smo določali s pretočno citometrijo z barvili 7-AAD in CM-H₂DCFDA. Količino ROS smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo delež mrtvih celic (A) in intenziteto fluorescence barvila CM-H₂DCFDA, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah (B). Na obeh grafih so prikazane povprečne vrednosti vsaj treh bioloških ponovitev poskusa (\pm SEM). Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

4.10 VPLIV INHIBICIJE ENCIMOV DGAT NA TVORBO LIPIDNIH KAPELJ OB DODATKU OLEINSKE KISLINE

Naši predhodni rezultati so pokazali, da OK v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno povečuje količino LK. V nadaljevanju smo želeli preveriti, ali DGAT inhibitorji, ki inhibirajo zadnjo stopnjo sinteze TAG, sintezo LK preprečijo ter ali to vpliva na delež mrtvih celic. S tem namenom smo celice sočasno izpostavili kombinaciji DGAT1 in DGAT2 inhibitorjev (5 μ M T863 in 5 μ M PF-06424439) in OK za 24 ur in jih nato pobarvali z barvili 7-AAD in BODIPY 493/503 ter jih analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati meritev deleža mrtvih celic z barvilom 7-AAD so pokazali, da nizka koncentracija OK (30 μ M) v kombinaciji z DGAT inhibitorji ni citotoksična, medtem ko so višje koncentracije OK (50 μ M ali 100 μ M) v kombinaciji z DGAT inhibitorji citotoksične in po 24 urah v primeru 50 μ M OK povzročijo 55 % celično smrt, v primeru 100 μ M OK pa 90 % celično smrt (Slika 15A). Rezultati meritev intenzitete fluorescence barvila BODIPY 493/503 v živih celicah so pokazali, da kombinacija DGAT inhibitorjev učinkovito prepreči sintezo LK ob dodatku OK (Slika 15B).

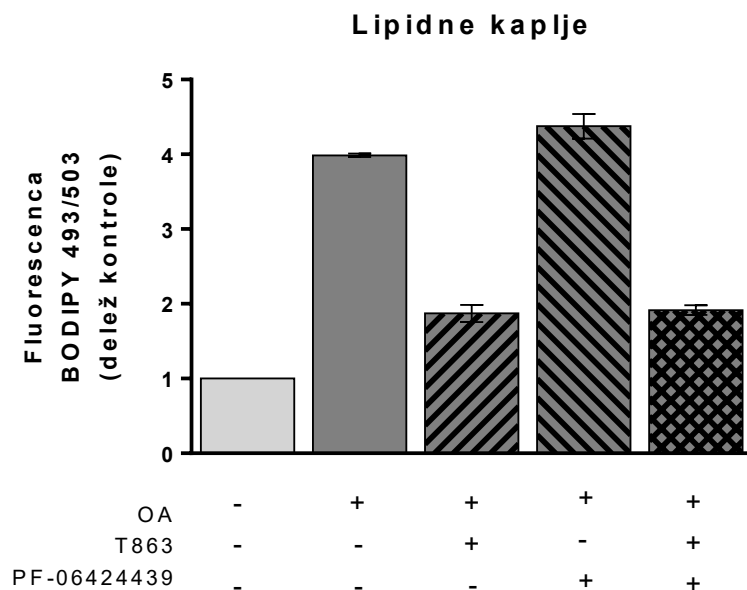
Svoje rezultate smo želeli preveriti še z mikroskopijo, zato smo celice na enak način za 24 ur izpostavili DGAT inhibitorjem in OK ter jih po koncu izpostavitve fiksirali in obarvali z barvili BODIPY 493/503 za vizualizacijo LK in s Hoechst 33342 za vizualizacijo jeder. Posnetki, ki smo jih zajeli z epifluorescentnim mikroskopom, so pokazali, da je v celicah, ki so bile izpostavljene samo OK, vidnih precej LK, medtem ko v celicah, ki so bile sočasno izpostavljene DGAT inhibitorjem in OK, LK praktično ne

vidimo. Posnetki celic so prikazani na Sliki 15C. Mikroskopski rezultati še dodatno potrjujejo našo ugotovitev, da kombinacija DGAT inhibitorjev učinkovito prepreči sintezo LK ob dodatku OK.



Slika 15: Vpliv inhibicije encimov DGAT na celično smrt in tvorbo LK z OK. Celice smo sočasno izpostavili kombinaciji DGAT1 in DGAT2 inhibitorjev (5 μM T863 in 5 μM PF-06424439) in OK za 24 ur. (A,B) Delež mrtvih celic smo določali s pretočno citometrijo z barvilom 7-AAD, količino LK pa z barvilom BODIPY 493/503. Količino LK smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo delež mrtvih celic (A) in intenziteto fluorescence barvila CM-H₂DCFDA, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah (B). Na obeh grafih so prikazane povprečne vrednosti vsaj treh bioloških ponovitev poskusa (\pm SEM). Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$). (C) Celice smo obarvali z barvili BODIPY 493/503 za vizualizacijo LK in s Hoechst 33342 za vizualizacijo jeder. Celice smo analizirali z epifluorescentnim mikroskopom. Merilo: 10 μm .

V nadaljevanju nas je zanimalo, v kakšni meri encima DGAT1 in DGAT2 prispevata k tvorbi LK ob dodatku OK. Celice smo sočasno za 24 ur izpostavili kombinaciji inhibitorjev DGAT1 in DGAT2 (5 μM T863 in 5 μM PF-06424439) ali le enemu od obeh inhibitorjev ter 100 μM OK. Celice smo pobarvali z barvili 7-AAD in BODIPY 493/503 ter jih analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati meritev intenzitete fluorescence barvila BODIPY 493/503 v živih celicah so pokazali, da DGAT1 inhibitor (T863) enako učinkovito prepreči sintezo LK ob dodatku OK kot kombinacija obeh DGAT inhibitorjev, medtem ko DGAT2 inhibitor (PF-06424439) na inhibicijo nima učinka. Iz tega sklepamo, da je v našem primeru tvorba LK ob dodatku OK odvisna od encima DGAT1. Grafični prikaz rezultatov je prikazan na Sliki 16.



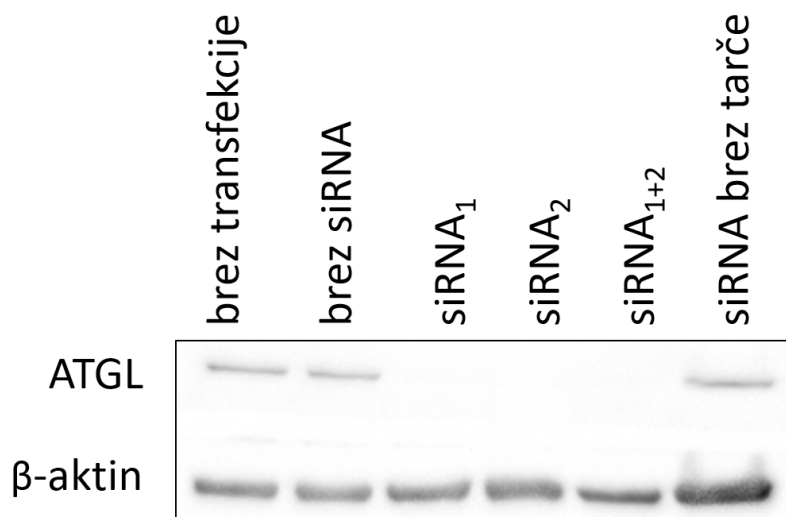
Slika 16: Vpliv inhibicije encimov DGAT1 in DGAT2 na tvorbo LK ob dodatku OK. Celice smo sočasno za 24 ur izpostavili kombinaciji DGAT1 in DGAT2 inhibitorjev (T863 in PF-06424439) in OK ter vsakemu DGAT inhibitorju posamezno in OK. Količino LK smo določali s pretočno citometrijo z barvilom BODIPY 493/503. Količino LK smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo povprečno intenziteto fluorescence barvila BODIPY 493/503 (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah.

4.11 POMEN RAZGRADNJE LIPIDNIH KAPELJ ZA ZAŠČITNO DELOVANJE OLEINSKE KISLINE

Naši rezultati so pokazali, da OK v celicah HUVEC stimulira sintezo LK in da ima zaščitno delovanje, saj znižuje s SPIONi povzročeno celično smrt in količino ROS. V nadaljevanju nas je zato zanimalo, ali je za zaščitno delovanje OK ključno, da lahko v celicah nemoteno prihaja do razgradnje LK in s tem sproščanja OK iz LK v citosol. Da bi preverili svojo hipotezo, smo v celicah želeli preprečiti razgradnjo LK, in sicer z utišanjem gena za encim ATGL. ATGL je usidrana v fosfolipidni monosloj LK in katalizira prvo stopnjo hidrolize TAG, ki omejuje hitrost celotnega zaporedja reakcij lipolize. V prvem delu smo celice transficirali z siRNA za utišanje ATGL in preverili uspešnost transfekcije. V drugem delu smo preverili, kako utišanje gena za ATGL vpliva na količino LK ob dodatku OK. V tretjem delu pa smo preverili, kako utišanje gena za ATGL vpliva na delovanje OK ob dodatku SPIONov.

4.11.1 Preverjanje uspešnosti utišanja gena za ATGL

Uspešnost transfekcije in utišanja gena za ATGL smo preverili z imunodetekcijo proteina ATGL po prenosu western. Posttranskripcijsko utišanje gena za ATGL z uporabo siRNA smo izvedli kot je opisano v poglavju 3.4. Po pripravi celičnih lizatov smo proteine ločili z NaDS-PAGE, izvedli prenos western in imunodetekcijo proteina ATGL na nitrocelulozni membrani (opisano v poglavju 3.7). V primeru, ko celice nismo transficirali in v primerih, ko smo celice transficirali brez siRNA ali z siRNA brez tarče v človeškem genomu (Allstars Negative Control siRNA), smo na nitrocelulozni membrani zaznali ustrezne lise proteina ATGL velikosti približno 54 kDa. Pri vzorcih, ki so bili transficirani z eno ali obema siRNA za utišanje ATGL, nismo zaznali lis pri 54 kDa. S tem smo potrdili, da lahko s pottranskripcijsko transfekcijo uspešno utišamo gen za izražanje ATGL. Rezultati imunodetekcije proteina ATGL so prikazani na Sliki 17.



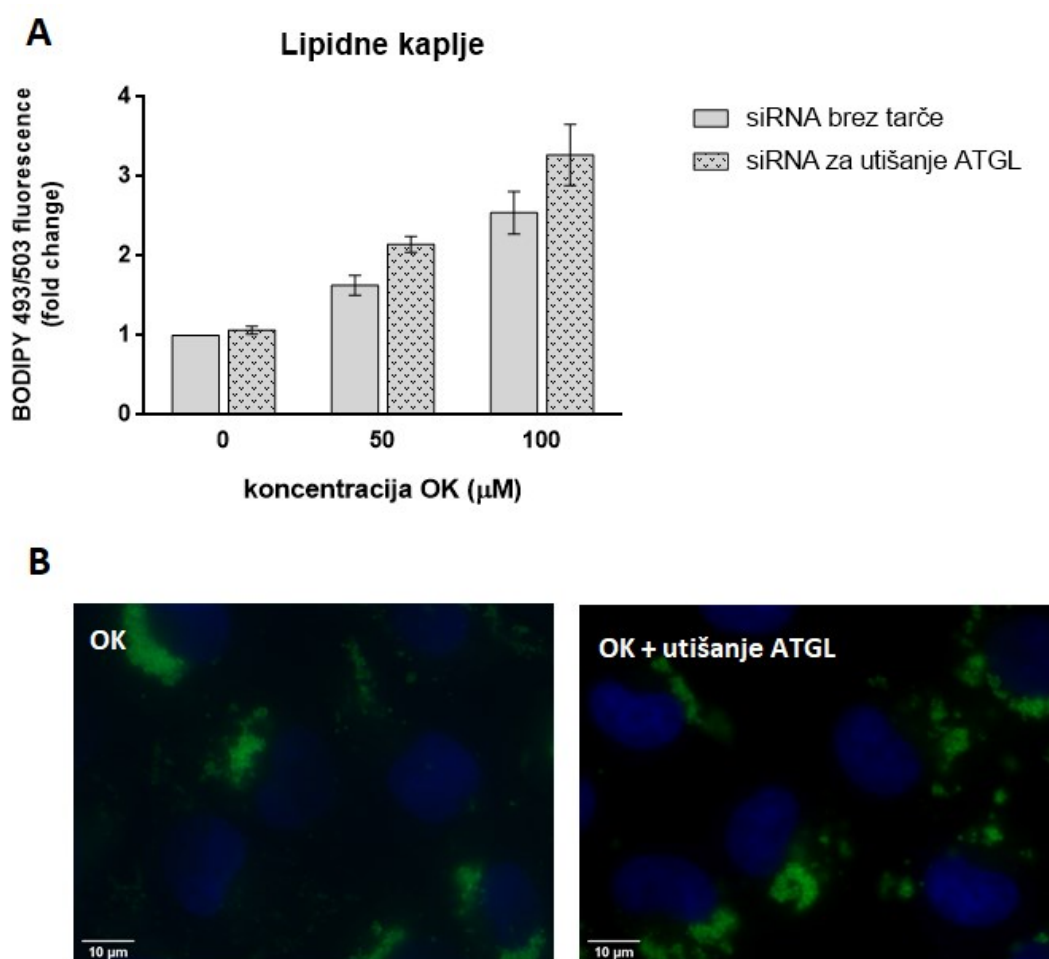
Slika 17: Uspešnost utišanja gena za ATGL z uporabo siRNA.

Celice smo v ploščah s 6 vdolbnicami reverzno transficirali z siRNA za utišanje gena za ATGL. Po 24 urah smo odstranili star medij in ga zamenjali s svežim medijem. Po nadaljnjih 24 h smo izvedli lizo celic, proteine v celičnih lizatih ločili s pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti NaDS in izvedli prenos western, čemur je sledila imunodetekcija proteinov ATGL in β-aktina na nitrocelulozni membrani.

4.11.2 Vpliv utišanja gena za ATGL na količino lipidnih kapelj ob dodatku oleinske kisline

Vpliv utišanja gena za ATGL na količino LK ob dodatku OK smo preverili tako, da pri celicah najprej izvedli reverzno transfekcijo. Celice smo transficirali z siRNA za utišanje ATGL, kontrolne celice pa z siRNA brez tarče v človeškem genomu. Nato smo po 24 urah odstranili medij in celice izpostavili OK za 24 ur. Po 24 urah smo celice pobarvali z barvili BODIPY 493/503 in 7-AAD in s pretočno citometrijo izmerili količino LK v živih

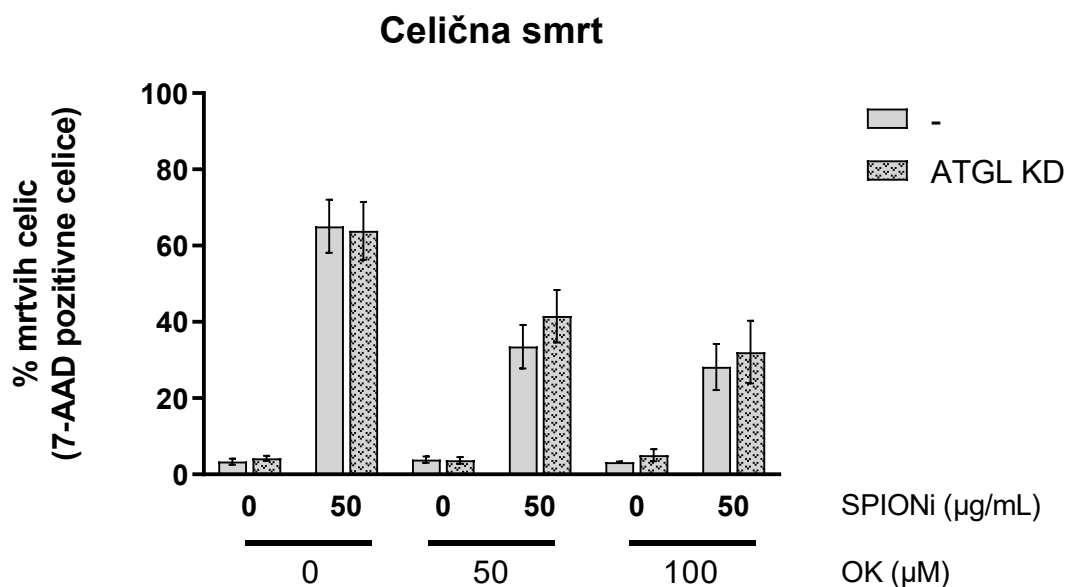
celicah. Rezultati so pokazali, da utišanje ATGL ob dodatku OK povzroči rahlo, vendar statistično neznačilno povečano kopičenje LK (Slika 18A). Da bi svoje rezultate preverili še z mikroskopijo, smo v celicah na enak način utišali gen za ATGL in jih po 24 urah izpostavili OK. Po koncu izpostavitve smo celice fiksirali in jih obarvali z barvili BODIPY 493/503 za vizualizacijo LK in s Hoechst 33342 za vizualizacijo jeder. Posnetki, ki smo jih zajeli z epifluorescentnim mikroskopom, so potrdili rezultate pretočne citometrije in pokazali, da utišanje ATGL ni bistveno vplivalo na količino LK (Slika 18B). Rezultati pretočne citometrije in mikroskopije kažejo na to, da pri danih eksperimentalnih pogojih proces hidrolize TAG ni zelo izrazit ali pa so pri tem udeležene druge lipaze in/ali lipofagija.



Slika 18: Vpliv utišanja gena za ATGL na količino LK. Celice smo reverzno transficirali z siRNA za utišanje ATGL, kontrolne celice pa z siRNA brez tarče v človeškem genomu. Po 24 urah smo celice izpostavili OK za 24 ur. (A) Celice smo pobarvali z barvili BODIPY 493/503 in 7-AAD ter s pretočno citometrijo izmerili količino LK v živih celicah. Količino LK smo merili samo v živih celicah, ki se niso obarvale z barvilom 7-AAD. Podatki na grafu prikazujejo povprečno intenziteto fluorescence barvila BODIPY 493/503 (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah. (B) Celice smo obarvali z barvili BODIPY 493/503 za vizualizacijo LK in s Hoechst 33342 za vizualizacijo jeder. Celice smo analizirali z epifluorescentnim mikroskopom. Merilo: 10 µm.

4.11.3 Vpliv utišanja gena za ATGL na zaščitno delovanje oleinske kisline ob dodatku s SPIONov

Kljub temu, da na podlagi naših rezultatov ni jasno, ali z utišanjem gena za ATGL pri danih pogojih preprečimo lipolizo LK, smo v nadaljevanju preverili, kako utišanje gena za ATGL vpliva na zaščitno delovanje OK na s SPIONi povzročeno celično smrt. Celice smo transficirali z siRNA za utišanje ATGL, kontrolne celice pa z siRNA brez tarče v človeškem genomu. Po 24 urah smo odstranili medij in celice izpostavili OK in SPIONom za 24 ur. Po 24 urah smo celice pobarvali z barvilom 7-AAD in s pretočno citometrijo izmerili delež mrtvih celic. Rezultati so pokazali, da utišanje gena za ATGL ne vpliva na sposobnost OK, da zaščiti celice pred s SPIONi povzročeno celično smrtjo (Slika 19).

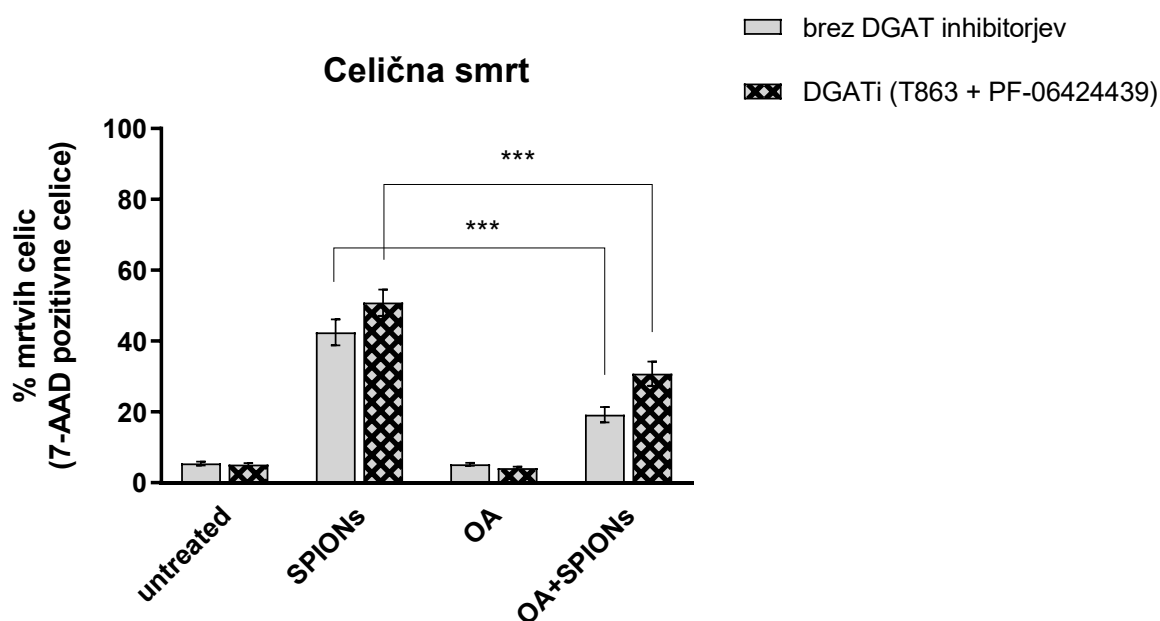


Slika 19: Vpliv utišanja gena za ATGL na zaščitno delovanje OK ob dodatku SPIONov. Celice smo transficirali z siRNA za utišanje ATGL, kontrolne celice pa z siRNA brez tarče v človeškem genomu. Po 24 urah smo celice izpostavili OK in/ali SPIONom za 24 ur ter jih nato pobarvali z barvilom 7-AAD in s pretočno citometrijo izmerili delež mrtvih celic. Prikazane so povprečne vrednosti vsaj treh bioloških ponovitev poskusa (\pm SEM).

4.12 POMEN TVORBE LIPIDNIH KAPELJ ZA ZAŠČITNO DELOVANJE OLEINSKE KISLINE

Pretekli poskusi so pokazali, da OK v celicah HUVEC stimulira sintezo LK ter da ima v kombinaciji s SPIONi zaščitno delovanje, saj znižuje s SPIONi povzročeno celično smrt in povečano količino ROS. Z utišanjem gena za ATGL nam žal ni uspelo preveriti, kako razgradnja LK vpliva na zaščitno delovanje OK, saj utišanje gena za ATGL ni bistveno zmanjšalo razgradnje LK. V nadaljevanju smo zato poskušali ugotoviti, ali je zaščitno

delovanje OK odvisno od njene vgradnje v LK. S tem namenom smo celice sočasno izpostavili kombinaciji DGAT inhibitorjev, OK ter SPIONom. Ker so naši predhodni rezultati pokazali, da višje koncentracije OK (50 in 100 μM) v kombinaciji z DGAT inhibitorji povzročajo lipotoksičnost (Slika 13A), smo uporabili nižjo koncentracijo OK (30 μM), za katero smo predhodno pokazali, da v kombinaciji z DGAT inhibitorji ni toksična. Celice smo pobarvali z barvilom 7-AAD jih analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati meritev intenzitete fluorescence barvila 7-AAD so pokazali, da 30 μM OK zavira celično smrt, ki so jo povzročili SPIONi, pri čemer dodatek DGAT inhibitorjev ne vpliva na njeno protektivno delovanje. Iz tega lahko sklepamo, da vgradnja OK v LK ni glavni mehanizem, preko katerega OK ščiti celice pred SPIONi.



Slika 20: Pomen vgradnje OK v LK za njeno protektivno delovanje. Celice smo izpostavili kombinaciji DGAT inhibitorjev, OK (30 μM) ter SPIONom (50 $\mu\text{g/mL}$) za 24 ur. Celice smo pobarvali z barvilom 7-AAD in s pretočno citometrijo izmerili delež mrtvih celic. Prikazane so povprečne vrednosti vsaj treh bioloških ponovitev poskusa (\pm SEM). Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

4.13 VPLI OLEINSKE KISLINE IN SPIONov NA MOLEKUSLKI PROFIL CELIC

Da bi preverili mehanizem citotoksičnosti, ki jo povzročajo SPIONi, in mehanizem zaščitnega delovanja OK, smo s FTIR spektroskopijo analizirali molekularni profil celic, ki so bile izpostavljene SPIONom in/ali OK. Posneli smo 873 spektrov posameznih celic in spektre razdelili v 4 skupine glede na to, čemu so bile celice izpostavljene: CTRL (neizpostavljene celice), SPIONi (celice, ki so bile 24 ur izpostavljene SPIONom s koncentracijo 50 $\mu\text{g/ml}$), OK (celice, ki so bile 24 ur izpostavljene OK s koncentracijo

100 μM) in OK+SPIONi (celice, ki so bile 24 ur sočasno izpostavljene OK (100 μM) in SPIONom (50 $\mu\text{g/ml}$)).

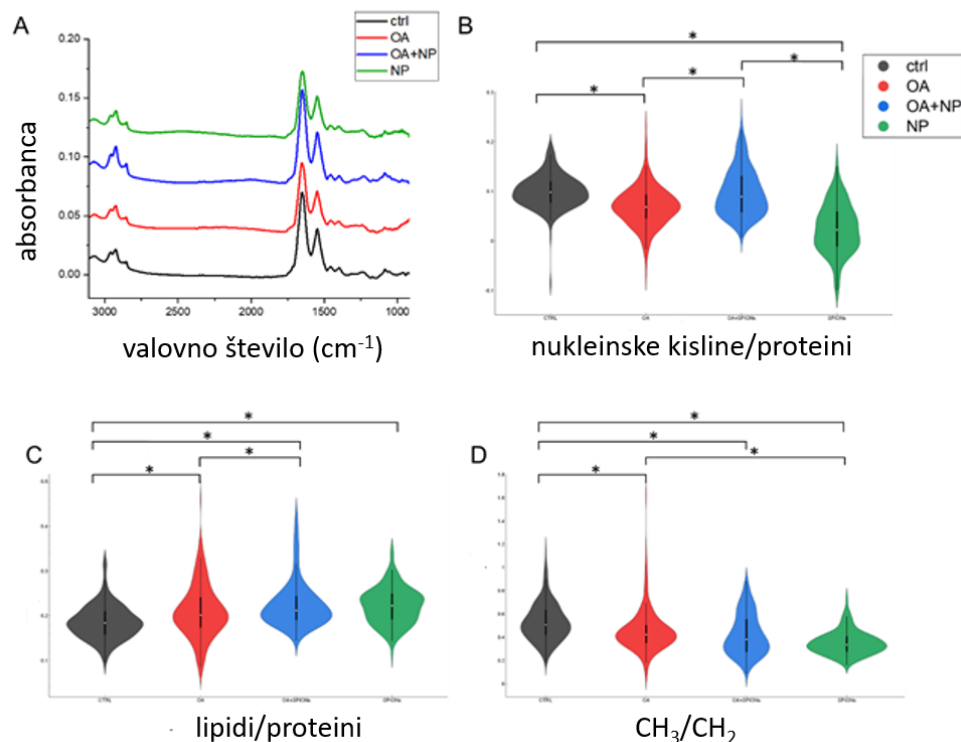
Podrobnejši pregled spektrov (Slika 21A) je pokazal, da sta pri SPIONih glavna vrhova CH_2 alkilnih verig lipidov (pri 2925 cm^{-1} in 2855 cm^{-1}) za približno 3-4 cm^{-1} pomaknjena proti nižjim valovnim številom v primerjavi s spektri neizpostavljenih celic. Absorpcijska vrhova pri 2925 cm^{-1} in 2855 cm^{-1} ustrežata simetričnemu asimetričnemu nihanju metilenske ($-\text{CH}_2-$) skupine. Velikost opaženega premika je sicer tik na meji ločljivosti, vendar kaže na povečano togost membran v celicah, ki so bile izpostavljene SPIONom.

Poleg smo samo pri SPIONih opazili razširitev pasov v amidnem I območju. Do te spremembe lahko pride, kadar se pri proteinih poveča delež β struktur. To stanje je v celicah navadno povezano z oksidativnim stresom.

Celovito sliko stanja celic dobimo z opazovanjem razmerij izbranih absorpcijskih pasov (Slika 21B-D). Razmerje med nukleinskimi kislinami in beljakovinami (Slika 21B), ki ga lahko obravnavamo kot kazalnik celične presnove in vitalnosti, je najvišje pri CTRL, pri OA in OA+SPIONi so vrednosti podobne; razmerje pa je bistveno nižje pri SPIONih. Nasprotno ima razmerje lipidi/proteini (Slika 21C), ki je pokazatelj neravnovesja v celični presnovi, skoraj nasproten trend, pri čemer imajo celice CTRL najnižjo vrednost, medtem ko imajo SPIONi in OA+SPIONi najvišjo vrednost. Pri OA so vrednosti razmerja nekje vmes in se statistično razlikujejo od vrednosti pri CTRL in SPIONih. Razmerje CH_3/CH_2 (Slika 21D) se osredotoča na sestavo alifatskih verig lipidov, zlasti na razvejanost in dolžino nenasičenih lipidnih verig. Visoke vrednosti CH_3/CH_2 so lahko povezane z večjo stopnjo plastičnosti in fluidnosti celične membrane (Pachetti in sod., 2020), nizke vrednosti tega razmerja pa so pogosto povezane z oksidativnim stresom, apoptozo in lipidno peroksidacijo (Martínez-Rovira in sod., 2020; Zelig in sod., 2009; Pachetti in sod., 2020). Poleg tega lahko povečanje absorpcijskega pasu CH_2 in posledično zmanjšano razmerje CH_3/CH_2 pripišemo povečanju količine dolgoverižnih polinenasičenih maščobnih kislin, kar nakazuje na apoptozo in nekroptozo (Birarda in sod., 2014; Parisi in sod., 2017). Razmerje CH_3/CH_2 je najvišje pri CTRL, sledijo OA, OA+SPIONi, najnižjo vrednost pa imajo SPIONi.

Če povzamemo rezultate IR spektroskopije, je iz njih razvidno, da so bile celice, izpostavljene OK, po molekulskem profilu najbolj podobne neizpostavljenim celicam. Če so bile celice izpostavljene SPIONom je to precej spremenilo njihov molekulski profil. Ugotovljene spremembe kažejo na zmanjšano metabolično aktivnost, oksidativni stres, citotoksičnost in lipidno peroksidacijo. Molekulski profil celic, ki so bile hkrati izpostavljene OK in SPIONom, je nekje vmes med profilom neizpostavljenih celic in celic, izpostavljenih SPIONom. To potrjuje naše prejšnje rezultate, ki kažejo, da OK ščiti

celice pred negativnimi učinki SPIONov.



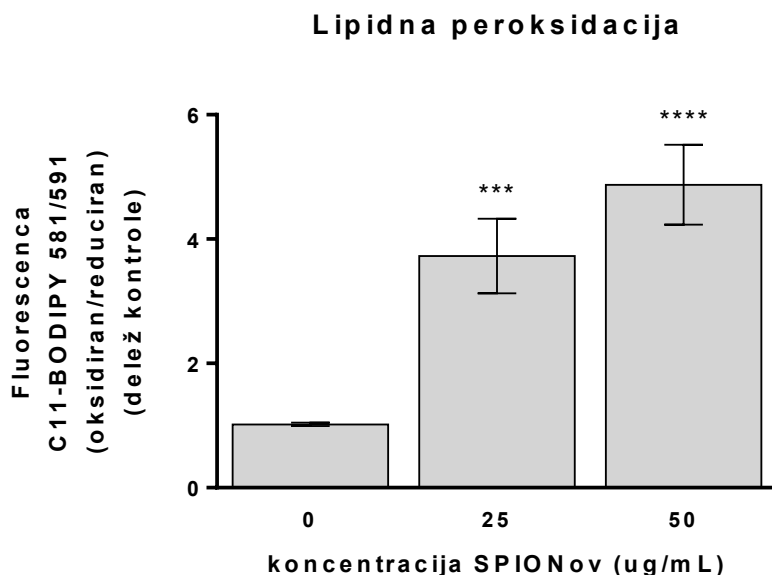
Slika 21: IR spektri in razmerja določenih absorpcijskih pasov.

(A) Povprečni spektri štirih analiziranih skupin celic; od spodaj navzgor: kontrole (CTRL) v črni barvi (povprečje 174 spektrov), celice, izpostavljene OK (OA) v rdeči barvi (povprečje 225 spektrov), celice, izpostavljene OK in SPIONom (OA + NP) v modri barvi (povprečje 280 spektrov) in v zeleni barvi povprečni spekter celic, izpostavljenih SPIONom (NP, povprečje 188 spektrov). (B) Violinski graf razmerij med integrali pasov nukleinskih kislin in proteinov. (C) Violinski graf razmerij med integrali pasov lipidov in proteinov. (D) Violinski graf razmerij med integrali pasov CH₃ in CH₂ pri lipidih. Za vse violinske grafe so bili uporabljeni enaki parametri vizualizacije: CTRL v črni barvi, OA v rdeči, OA+NP v modri in NP v zeleni. Vrednosti so razvrščene od najnižje vrednosti na levi do najvišje na desni. Statistično pomembne razlike v povprečnih vrednostih so označene (*, P < 0,05).

4.14 VPLIV SPIONov NA LIPIDNO PEROKSIDACIJO

FTIR rezultati niso le potrdili, da SPIONi v celicah HUVEC povzročajo oksidativni stres in celično smrt ter da OK ščiti celice pred negativnimi učinki SPIONov, ampak so tudi pokazali, da imajo SPIONi v celicah HUVEC vpliv na celične membrane. Spremembe v molekularnem profilu celic, ki so bile izpostavljene SPIONom, namreč nakazujejo na to, da SPIONi zmanjšujejo fluidnost celičnih membran in povzročajo lipidno peroksidacijo. V nadaljevanju smo zato želeli preveriti, ali SPIONi v celicah res povzročajo lipidno peroksidacijo. Celice smo pobarvali z barvilom BODIPY 581/591 C11 in jih nato za 24 ur izpostavili SPIONom različnih koncentracij. Celice smo analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati meritev intenzitete oksidiranega in reduciranega barvila BODIPY 581/591 C11 so pokazali, da SPIONi v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno

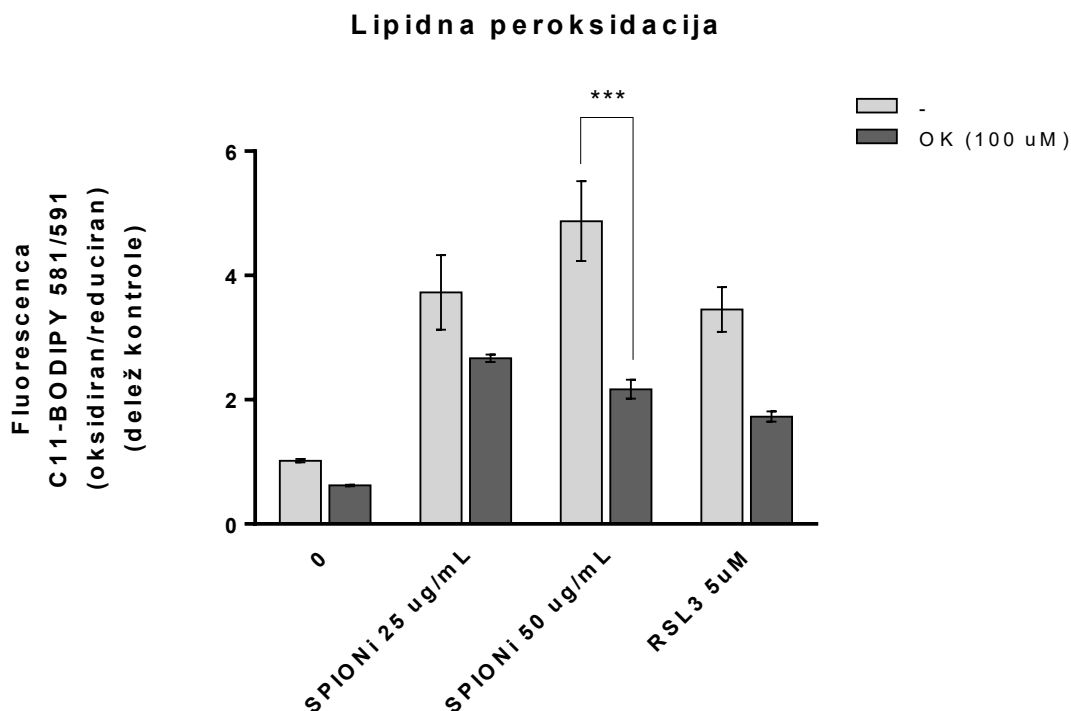
povečujejo lipidno peroksidacijo. Grafični prikaz rezultatov je prikazan na Sliki 21.



Slika 22: Vpliv SPIONov na lipidno peroksidacijo v celicah. Celice HUVEC smo pobarvali z barvilom BODIPY 581/591 C11 in jih nato za 24 ur izpostavili SPIONom različnih koncentracij. Celice smo analizirali s pretočnim citometrom. Podatki na grafu prikazujejo povprečno razmerje intenzitet fluorescences oksidirane in reducirane barvila BODIPY 581/591 C11 (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev, normalizirano na razmerje intenzitet fluorescences oksidirane in reducirane barvila BODIPY 581/591 C11 pri kontrolnih celicah. Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

4.14 VPLIV OLEINSKE KISLINE NA S SPIONI POVZROČENO LIPIDNO PEROKSIDACIJO

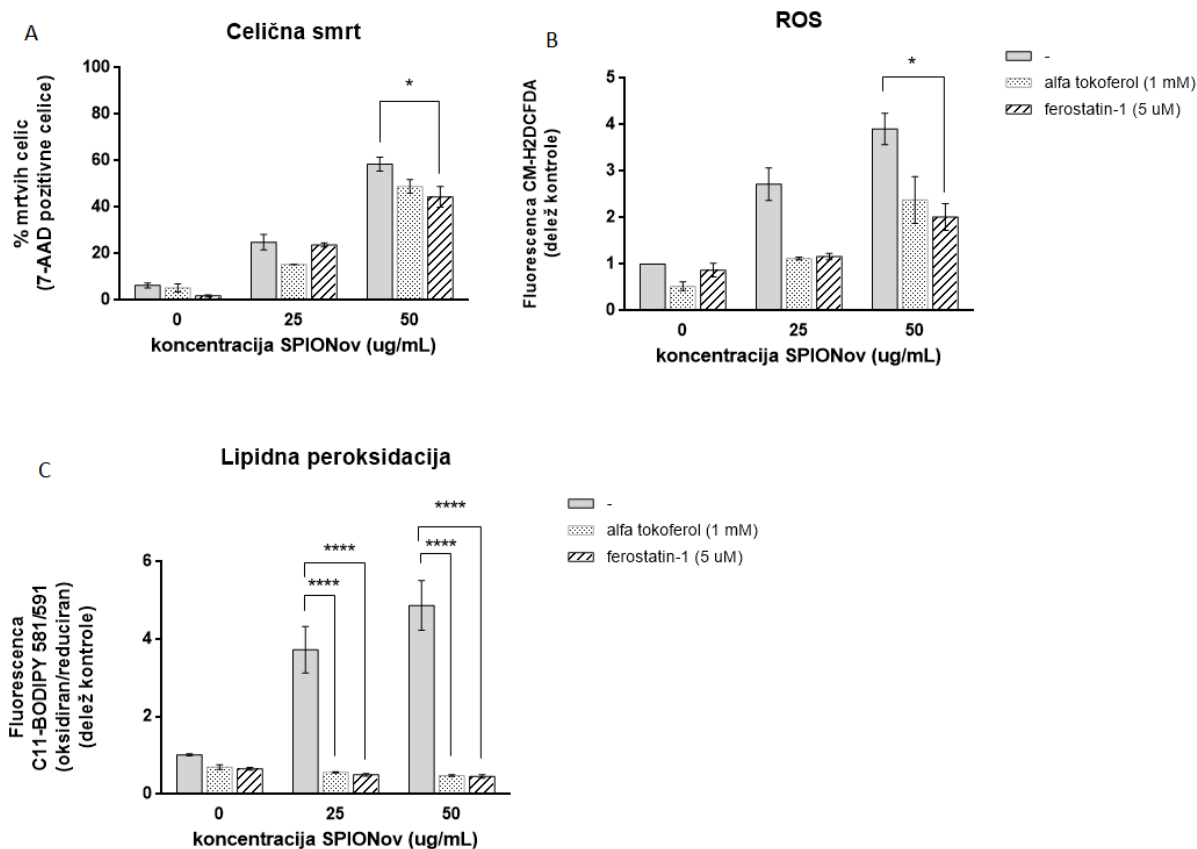
Naši predhodni rezultati so pokazali, da je s SPIONI povzročeno citotoksičnost in oksidativni stres možno zmanjšati z dodatkom OK. Ker smo ugotovili, da SPIONI povzročajo tudi lipidno peroksidacijo, smo želeli preveriti, ali dodatek OK zmanjša tudi stopnjo lipidne peroksidacije, ki jo povzročajo SPIONI. Poleg tega smo zaščitno delovanje OK preverjali tudi v primeru, ko smo lipidno peroksidacijo povzročili z dodatkom RSL3, ki je inhibitor encima GPX4 ter uveljavljen induktor lipidne peroksidacije in ferroptoze. Celice smo pobarvali z barvilom BODIPY 581/591 C11 in jih nato za 24 ur izpostavili 100 μ M OK ter SPIONom (25 ali 50 μ g/mL) ali 5 μ M RSL3. Celice smo nato analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati meritev intenzitete oksidirane in reducirane barvila BODIPY 581/591 C11 so pokazali, da OK v celicah HUVEC znižuje lipidno peroksidacijo, povzročeno s SPIONI ali RSL3. Grafični prikaz rezultatov je prikazan na Sliki 22.



Slika 23: Vpliv OK na lipidno peroksidacijo, povzročeno s SPIONi ali z induktorjem ferroptoze RSL3. Celice HUVEC smo pobarvali z barvilom BODIPY 581/591 C11 in jih nato za 24 ur izpostavili OK ter SPIONom ali RSL3. Celice smo analizirali s pretočnim citometrom. Podatki na grafu prikazujejo povprečno razmerje intenzitet fluorescence oksidirane in reducirane barvila BODIPY 581/591 C11 (\pm SEM) vsaj treh bioloških ponovitev, normalizirano na razmerje intenzitet fluorescence oksidirane in reducirane barvila BODIPY 581/591 C11 pri kontrolnih celicah. Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

4.15 VPLIV α -TOKOFEROLA IN FEROSTATINA-1 NA S SPIONi POVZROČENO CELIČNO SMRT, OKSIDATIVNI STRES IN LIPIDNO PEROKSIDACIJO

Ugotovili smo, da SPIONi povzročajo lipidno peroksidacijo, znano pa je, da kopičenje produktov lipidne peroksidacije vodi v ferroptozo. Da bi preverili, ali SPIONi povzročajo ferroptozo, smo celice istočasno za 24 ur izpostavili enemu od inhibitorjev ferroptoze (α -tokoferolu ali ferostatinu-1) in SPIONom ter merili delež mrtvih celic, količino ROS in stopnjo lipidne peroksidacije. Pri merjenju celične smrti in ROS smo celice izpostavili izbranim kemikalijam in ND za 24 ur ter jih nato po barvanju s 7-AAD in CM-H₂DCFDA analizirali s pretočnim citometrom. Pri analizi ROS smo mrtve celice, ki so se obarvale z barvilom 7-AAD, izločili iz analize in količino ROS določali samo v živih celicah. Pri merjenju lipidne peroksidacije smo celice najprej pobarvali z barvilom BODIPY 581/591 C11 in jih nato za 24 ur izpostavili izbranim kemikalijam in ND. Celice smo nato analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati so pokazali, da α -tokoferol ali ferostatin-1 v celicah HUVEC znižujeta delež celične smrti, količino ROS in lipidno peroksidacijo, ki jo povzročajo SPIONi. Grafični prikaz rezultatov je prikazan na Sliki 24.

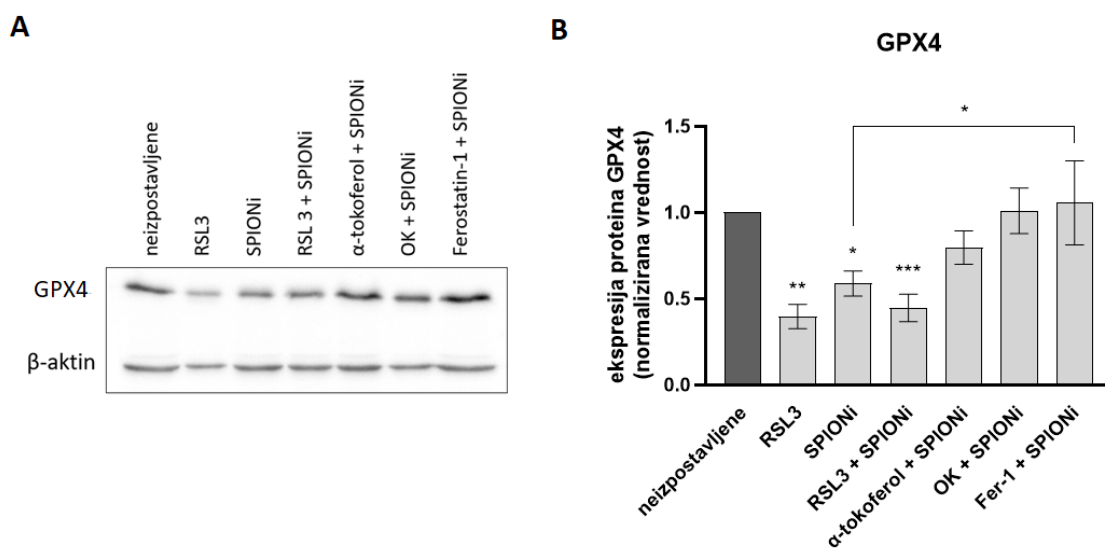


Slika 24: Vpliv α -tokoferola in ferostatina-1 na s SPIONi povzročeno celično smrt, oksidativni stres in lipidno peroksidacijo.

Pri merjenju celične smrti in ROS smo celice izpostavili izbranim kemikalijam in/ali ND za 24 ur ter jih nato barvali z barvili 7-AAD in CM-H₂DCFDA. Pri merjenju lipidne peroksidacije smo celice najprej pobarvali z barvilom BODIPY 581/591 C11 in jih nato za 24 ur izpostavili izbranim kemikalijam in ND. Celice smo nato analizirali s pretočnim citometrom. Podatki na grafu prikazujejo delež mrtvih celic (A), intenziteto fluorescence barvila CM-H₂DCFDA, normalizirano na intenziteto fluorescence pri kontrolnih celicah (B) in razmerje intenzitet fluorescence oksidiranega in reduciranega barvila BODIPY 581/591 C11, normalizirano na razmerje intenzitet fluorescence oksidiranega in reduciranega barvila BODIPY 581/591 C11 pri kontrolnih celicah (C). Pri vseh treh grafih so prikazane povprečne vrednosti vsaj treh bioloških ponovitev poskusa (\pm SEM). Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

4.16 VPLIV SPIONov IN OLEINSKE KISLINE NA KOLIČINO GPX4

Naši rezultati so pokazali, da SPIONi v celicah HUVEC povečujejo lipidno peroksidacijo, ki lahko vodi v ferroptozo. Pokazali smo tudi, da tipična inhibitorja ferroptoze, kot sta α -tokoferol in ferostatin-1, skoraj v celoti zavreta lipidno peroksidacijo, ki jo v celicah povzročajo SPIONi. Poleg tega α -tokoferol in ferostatin-1 tudi deloma znižujeta količino ROS in celično smrt, ki jo povzročajo SPIONi. Iz tega smo sklepali, da SPIONi v celicah HUVEC inducirajo ferroptozo. Ugotovili smo tudi, da OK delno zniža s SPIONi povzročeno lipidno peroksidacijo, zato smo sklepali, da OK v določeni meri celice ščiti pred ferroptozo, ki jo povzročajo SPIONi. Da bi dodatno preverili našo hipotezo, smo v celicah, ki so bile izpostavljene SPIONom, OK ter induktorjem in inhibitorjem ferroptoze, z imunodetekcijo določili količino proteina GPX4. Zmanjšano izražanje GPX4 je namreč pogosto uporabljen biomarker za ferroptozo. Naši rezultati so pokazali, da induktor ferroptoze RSL3, SPIONi ter kombinacija obeh statistično značilno zniža izražanje GPX4 v primerjavi z neizpostavljenimi celicami. Razvidno je tudi, da inhibitor ferroptoze ferostatin-1, statistično značilno zvišuje izražanje GPX4 pri celicah, ki so bile izpostavljene SPIONom. Rezultati so grafično predstavljeni na Sliki 25.

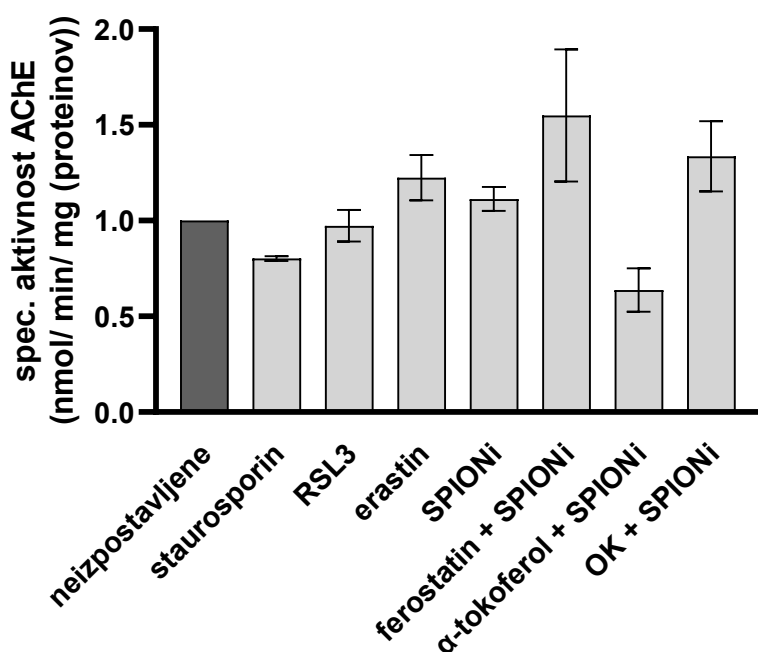


Slika 25: Vpliv SPIONov na ekspresijo proteina GPX4.

Celice smo nasadili v plošče s 6 vdolbincami in jih izpostavili izbranim kemikalijam in/ali ND za 24. Po 24 urah smo izvedli lizo celic, proteine v celičnih lizatih ločili s pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti NaDS in izvedli prenos westren, čemur je sledila imunodetekcija proteinov GPX4 in β -aktina na nitrocelulozni membrani (A). Lise na membrani smo denziometrično analizirali s programom ImageJ. Podatki na grafu prikazujejo razmerje ekspresije proteina GPX-4 in proteina β -aktin, normalizirano na razmerje ekspresij obeh proteinov pri neizpostavljenih celicah. Prikazane so povprečne vrednosti štirih bioloških ponovitev (\pm SEM). Označene so vrednosti, ki se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$) (B).

4.17 VPLIV CELIČNE SMRTI NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE

Z namenom, da bi ugotovili, kako različni tipi celične smrti vplivajo na aktivnost AChE v endotelijskih celicah, smo celice izpostavili induktorju apoptoze (0,4 μM staurosporinu), dvema induktorjema ferroptoze (5 μM RSL3 in 10 μM erastinu), SPIONom (50 $\mu\text{g/mL}$) ter SPIONom v kombinaciji z 1 mM α -tokoferolom, 5 μM ferostatinom in 100 μM OK. Meritve aktivnosti AChE v lizatih neizpostavljenih in izpostavljenih celic so pokazali, da nobena izmed zgoraj naštetih izpostavitvev ni statistično značilno vplivala na aktivnost AChE v celicah. Grafični prikaz rezultatov je na Sliki 26.



Slika 26: Vpliv celične smrti na aktivnost AChE v endotelijskih celicah.

Celice smo nasadili v plošče s 6 vdolbincami in jih izpostavili izbranim kemikalijam in/ali ND za 24 ur. Nato smo izvedli lizo celic in v celičnih lizatih izmerili količino proteinov. Aktivnost AChE smo merili v količini celičnega lizata, ki je vsebovala 5 μg proteinov. Podatki na grafu prikazujejo razmerje aktivnosti encima AChE in količine proteinov, normalizirano na razmerje pri neizpostavljenih celicah. Prikazane so povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev poskusa (\pm SEM).

5 RAZPRAVA

5.1 UČINKI SPIONov NA ENDOTELIJSKE CELICE

V okviru doktorske naloge smo preučevali vpliv SPIONov na endotelijske celice. Kadar SPIONE uporabljamo v medicinske namene, jih v večini primerov apliciramo intravensko, zato so endotelijske celice, poleg različnih krvnih celic, ene izmed prvih, ki s SPIONi pridejo v neposreden stik. Kot celični model za endotelijske celice smo uporabili celično linijo HUVEC.

Na začetku želimo poudariti, da so bili *in vitro* pogoji tekom naših poskusov precej drugačni od *in vivo* pogojev, ki bi nastopili, če bi SPIONE injicirali v veno poskusne živali ali človeka. Krvožilni sistem je namreč izredno dinamičen, saj kri neprestano teče, zato so endotelijske celice v *in vivo* pogojih izpostavljene SPIONom v toku. Pri naših poskusih smo uporabili statične pogoje, pri katerih se endotelijske celice razraščajo na ravni podlagi, SPIONE pa dodamo v celični medij nad celicami. Tekom 24 ur, kolikor so večinoma trajale naše izpostavitve SPIONom, SPIONi v celičnem mediju aglomerirajo in se zaradi svoje gostote, ki je večja od gostote celičnega medija, pričnejo posedati na celice. Dejanska izpostavljenost celic je tako precej večja kot bi bila izpostavljenost celice v *in vivo* sistemu. Različne pogoje testiranja SPIONov na endotelijskih celicah so v svoji študiji preučevali Matuszak in sod. (2015a). Ko so SPIONE, prevlečene z lavrinsko kislino (SPIONi-LA), testirali pri klasičnih statičnih *in vitro* pogojih, so pri koncentraciji SPIONov 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ po 24 urah opazili zmanjšano viabilnost endotelijskih celic. Če so bile celice izpostavljene SPIONom-LA v toku, le-ti pri isti koncentraciji niso vplivali na njihovo viabilnost. Avtorji študije to pojasnjujejo s hitrejšo sedimentacijo SPIONov-LA pri statičnih pogojih, zaradi česar je njihova efektivna koncentracija v bližini celičnega monosloja večja kot v primeru izpostavitve v toku.

Pri ocenjevanju učinka določenih ND na celice *in vitro*, je na začetku smiselno analizirati njihov privzem v celice. Prisotnost ND v celicah smo preverjali z uporabo TEM, ki se je v preteklosti izkazala kot ena izmed najbolj učinkovitih tehnik pri analizi privzema ND v celice, še posebej takrat, kadar gre za neoznačene ND. Ugotovili smo, da se SPIONi pri koncentraciji 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ po 24 urah internalizirajo v celice HUVEC. Čas izpostavitve (24 ur) in koncentracija (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ki smo ju uporabili, sta *in vivo* relevantna. Na voljo imamo namreč podatke za SPIONE, ki so že bili klinično uporabljeni, na primer ferumoksitol in ferumokstran. Plazemski razpolovni čas ferumoksitola je 14 ur, ferumokstrana pa 24-30 ur. Najvišja izmerjena plazemska koncentracija ferumoksitola znaša 206 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Neuwelt in sod., 2009; Nelson in sod., 2020). Glede na to, da smo SPIONE opazili v endocitotskih veziklih in amfisosomih, sklepamo, da so celice privzele SPIONE s procesom endocitoze, kar se ujema z obstoječimi literaturnimi podatki (Wei in

sod., 2021). V prihodnje bi bilo zanimivo preveriti privzem SPIONov pri nizki temperaturi (4 °C), ko endocitoza ne poteka. V primeru, da bi tudi pri nizki temperaturi opazili prisotnost SPIONov v celicah, bi to pomenilo, da v celice vstopajo tudi preko drugih mehanizmov.

V nadaljevanju nas je zanimalo, kako SPIONi pri danih eksperimentalnih pogojih vplivajo na preživetje endotelijskih celic. Učinek SPIONov na endotelijske celice so preučevali že v številnih študijah in prišli do zelo različnih zaključkov. Nekatere študije so potrdile citotoksični učinek SPIONov (Wu in sod., 2010; Mulens-Arias in sod., 2019). Druge študije so pokazale, da SPIONi sicer ne vplivajo na preživetje celic, vendar lahko povzročajo nekatere druge učinke, kot so zmanjšana celovitost endotelija, zmanjšana sinteza NO in strukturne spremembe v celicah (Astanina in sod., 2014), zmanjšana aderenza celic (Matuszak in sod., 2015b), spremenjena morfologija celic (Wen in sod., 2019) in povečanje koncentracije feritina v celicah (Poller in sod., 2018). Po drugi strani pa so nekatere študije pokazale, da SPIONi nimajo statistično pomembnega učinka na nobenega od izmerjenih parametrov v endotelijskih celicah (Friedrich in sod., 2016; Filippi in sod., 2019) ali pa celo ščitijo celice pred oksidativnim stresom (Duan in sod., 2019).

Neprevlečeni SPIONi so koloidno nestabilni v vodnih medijih. Zato se pri SPIONih z namenom izboljšanja koloidne stabilnosti uporabljajo različne vrste prevlek, ki močno vplivajo na njihove fizikalno-kemijske lastnosti in posledično na njihovo interakcijo s celicami. V zgoraj opisanih študijah so bili testirani SPIONi z različnimi prevlekami, vendar nobena od študij ni preučevala učinka SPIONov, prevlečenih s silicijevim dioksidom. Zato smo na začetku našega dela najprej preizkusili učinek s silicijevim dioksidom prevlečenih SPIONov na sposobnost preživetja celic. Ugotovili smo, da so SPIONi po 24 urah citotoksični za celice HUVEC pri koncentracijah nad 25 µg/ml in da njihova citotoksičnost narašča z naraščajočo koncentracijo.

Številni članki navajajo, da je glavni mehanizem toksičnosti železooksidnih ND, med katere sodijo tudi SPIONi, tvorba ROS in posledično oksidativni stres (Naqvi in sod., 2010; Paunovic in sod., 2020; Shen in sod., 2018; Yarjanli in sod., 2017; Zhu in sod., 2010; Gaharwar in Paulraj, 2015). Da bi preverili, ali tudi SPIONi, uporabljeni pri našem raziskovalnem delu, povzročajo nastajanje ROS in ali je oksidativni stres glavni vzrok celične smrti, ki jo povzročajo SPIONi, smo celice hkrati izpostavili SPIONom in enemu od antioksidantov (NAC ali α -tokoferolu) ter merili proizvodnjo znotrajceličnih ROS. Naši rezultati so potrdili, da SPIONi v endotelijskih celicah koncentracijsko odvisno povečujejo količino ROS. Poleg tega so rezultati pokazali, da tako NAC kot tudi α -tokoferol zmanjšata količino ROS in citotoksičnost SPIONov, kar kaže, da je citotoksični učinek SPIONov dejansko povezan z oksidativnim stresom.

Oksidativni stres v celicah vpliva na presnovo lipidov, zaradi česar se pri *in vitro* pogojih

v celicah kopičijo LK (Lee in sod., 2015; Liu in sod., 2015). Nekatere študije kažejo, da tudi ND spodbujajo kopičenje LK prek oksidativnega stresa (Khatchadourian and Maysinger, 2009; Vesterdal in sod., 2014; Yang in sod., 2020; Cao in sod., 2014). Ker smo ugotovili, da SPIONi povečujejo količino ROS v celicah HUVEC, smo domnevali, da bi preko oksidativnega stresa SPIONi v celicah lahko inducirali sintezo LK in njihovo kopičenje.

Da bi preverili svojo hipotezo, smo celice izpostavili SPIONom in po 24 urah določili vsebnost LK v živih celicah. Opazili smo, da je količina LK v celicah, ki so bile izpostavljene SPIONom, večja kot v neizpostavljenih celicah, kar kaže, da SPIONi povzročajo kopičenje LK. Naši izsledki se skladajo s številnimi preteklimi študijami, ki so pokazale, da različni ND v celicah povzročajo kopičenje LK (Khatchadourian in Maysinger, 2009; Maysinger, 2007; Przybytkowski in sod., 2009; Davoren in sod., 2007; Babele in sod., 2018; Cao in sod., 2014; Tsukahara and Haniu, 2011; Guo in sod., 2018; Bayat in sod., 2014; Yang in sod., 2020). Le redke izmed navedenih študij so se ukvarjale z mehanizmom kopičenja LK. Ker nas je zanimalo, ali je v našem primeru vzrok za kopičenje LK povečana sinteza LK ali zmanjšana razgradnja LK, smo celice hkrati izpostavili SPIONom in zaviralcem sinteze LK (DGAT inhibitorjem) ter kvantificirali količino LK po 24 urah. Predpostavljali smo, da bi v primeru, če SPIONi stimulirajo sintezo novih LK, dodatek DGAT inhibitorjev to sintezo zavrl. Rezultati so pokazali, da DGAT inhibitorji ne vplivajo na povečano kopičenje LK v celicah, ki so izpostavljene SPIONom, iz česar sklepamo, da SPIONi ne inducirajo sinteze novih LK, temveč zavirajo njihovo razgradnjo. S tem smo ovrgli našo prvo hipotezo, v kateri smo predvidevali, da SPIONi v endotelijskih celicah inducirajo sintezo LK.

5.2 ZAŠČITNA VLOGA OLEINSKE KISLINE

Kopičenje LK poleg oksidativnega stresa inducirajo tudi različna druga stanja, ki povzročajo energijsko ali redoks neravnovesje v celici, kar nakazuje na to, da so LK bistvene za obvladovanje celičnega stresa (Jarc in Petan, 2019). Eden glavnih načinov, kako LK nadzorujejo celični stres, je uravnavanje privzema, shranjevanja in sproščanja MK (Petan, 2020). Med oksidativnim stresom LK ščitijo celico na ta način, da uskladišijo poškodovane in oksidirane lipide (Liu in sod., 2015) ter polineneasičene MK, ki bi se sicer vgradile v celično membrano in bile tam bolj podvržene lipidni peroksidaciji (Bailey in sod., 2015).

Glede na to, da imajo LK pomembno vlogo pri obvladovanju celičnega stresa, bi lahko domnevali, da imajo celice, v katerih z dodatkom lipidov predhodno stimuliramo sintezo LK, boljšo sposobnost obvladovanja stresa, kot je na primer izpostavljenost ND. To sta raziskovala Khatchadourian in Maysinger in pokazala, da se preživetje celic feokromocitoma (PC12) ob izpostavljenosti ND iz kadmijevega telurida (CdTe) poveča,

če so celice predhodno izpostavljene OK, ki spodbudi sintezo LK (Khatchadourian and Maysinger, 2009). Tudi nas je v nadaljevanju zanimalo, ali so celice z večjo količino LK boljše zaščitene pred škodljivimi učinki SPIONov.

Za indukcijo sinteze LK smo izbrali OK, saj je to najbolj zastopana maščobna kislina v plazmi in se pogosto uporablja za indukcijo LK v različnih vrstah celic, pri čemer ne povzroča citotoksičnosti, kadar se uporablja v fiziološkem območju koncentracij (Khatchadourian and Maysinger, 2009). Mi smo pri svojih poskusih uporabljali OK v koncentracijskem območju od 30 do 100 μM . Gre za *in vivo* relevantne koncentracije, saj literaturni podatki kažejo, da znašajo plazemske koncentracije oleata pri ljudeh, ki uživajo veliko oljčnega olja, med 10 in 100 μM (Carluccio in sod., 1999).

Najprej smo želeli preveriti, ali OK v celicah HUVEC res inducira sintezo LK in ali pri izbranih koncentracijah (30-100 μM) vpliva na celično smrt in količino ROS v celicah. Po pričakovanjih in v skladu z literaturnimi podatki (Kuo in sod., 2017; Carluccio in sod., 1999) **smo potrdili, da OK v celicah HUVEC inducira tvorbo LK ter pri koncentracijah do 100 μM ne vpliva na delež celične smrti in količino ROS. S tem smo potrdili prvi del druge hipoteze, kjer smo predvidevali, da bo OK v celicah HUVEC inducirala sintezo LK.**

V nadaljevanju smo želeli preveriti, ali OK izboljša preživetje celic HUVEC ob izpostavljenosti SPIONom. S tem namenom smo celice HUVEC predhodno izpostavili 100 μM OK, ki je v celicah stimulirala sintezo LK, nato pa smo celice za 24 ur izpostavili SPIONom (25 in 50 $\mu\text{g/ml}$). Rezultati pretočne citometrije so pokazali, da OK poveča preživetje celic, ki so izpostavljene SPIONom, in da je njen zaščitni učinek povezan z znižanjem količine ROS. To je v skladu s preteklimi študijami, ki so pokazale, da OK ščiti celice pred oksidativnim stresom in celično smrtjo (Yamasaki in sod., 2008; Haeiwa in sod., 2014; Magtanong in sod., 2019; Zeng in sod., 2020).

Da bi dobili bolj podroben vpogled v mehanizem citotoksičnosti SPIONov in zaščitno vlogo OK, smo celice, izpostavljene OK, SPIONom ter OK in SPIONom hkrati analizirali tudi z IR spektroskopijo. Rezultati IR spektroskopije so pokazali, da SPIONi močno spremenijo biokemijsko sestavo celic. Iz sprememb v IR spektru celic, ki so bile izpostavljene SPIONom, je mogoče razbrati, da SPIONi v celicah povzročajo metabolno neravnovesje in oksidativni stres, kar vodi v zmanjšano viabilnost celic. Če so bile celice predhodno izpostavljene OK, je ta zmanjšala zgoraj navedene negativne učinke SPIONov, kar potrjuje zaščitno vlogo OK. Poleg tega rezultati IR spektroskopije nakazujejo tudi na dodatne citotoksične mehanizme SPIONov, in sicer zmanjšano fluidnost celične membrane ter lipidno peroksidacijo celičnih membran. OK zmanjšuje učinke SPIONov na celične membrane, kar je v skladu s študijo Magtanonga in sod. (2019), ki je pokazala, da dodatek OK zmanjšuje občutljivost lipidov plazemske

membrane na lipidno peroksidacijo in posledično ferroptozo.

5.3 POMEN VGRADNJE OLIENSKE KISLINE V LIPIDNE KAPLJE

Kopičenje ene ali več MK je za celice toksično, saj proste MK lahko delujejo kot detergent in poškodujejo membrane celičnih organelov ali plazemsko membrano. Poleg tega lahko MK sprožijo tudi celično smrt s trajno aktivacijo signalnih poti, kot je na primer nezviti proteinski odziv (ang. unfolded protein response, UPR) (Olzmann in Carvalho, 2019). Celice z namenom, da bi preprečile škodljivo delovanje MK in njihovih derivatov, proste MK zaestrijo v TAG, ti pa se vgradijo v LK (Onal in sod., 2017a). Tako zestrene MK so za celico relativni inertne in neškodljive (Welte, 2015). Stanja, pri katerih je shranjevanje MK v LK zmanjšano ali pa je zmogljivost shranjevanja presežena, lahko vodijo do t.i. lipotoksičnosti (Olzmann and Carvalho, 2019).

Domnevali smo, da se ob dodatku OK v celicah inducira z DGAT posredovana tvorba LK z namenom, da se prepreči lipotoksičnost OK. Da bi preverili to hipotezo, smo v celicah zavrli sintezo TAG z inhibicijo encimov DGAT1 in DGAT2 ter hkrati izpostavili celice različnim koncentracijam OK. Inhibicija encimov DGAT1 in DGAT2 je skoraj popolnoma zavrla tvorbo LK in povzročila lipotoksičnost OK pri višjih koncentracijah (50 in 100 μM), ne pa tudi pri najnižji uporabljeni koncentraciji OK (30 μM). Iz tega sklepamo, da OK v prosti obliki pri nižjih koncentracijah (30 μM in manj) za celice ni toksična, pri višjih koncentracijah (50 μM in več) pa ima prosta OK citotoksičen učinek, zato jo celice v obliki TAG uskladiščijo v LK.

Encima DGAT1 in DGAT2, ki pri sesalcih katalizirata tvorbo TAG iz DAG in acil-CoA, torej zadnji korak sinteze TAG, sta po Ak sestavi precej različna proteina, ki se razlikujeta tudi v biokemičnih lastnostih, celični funkciji in tkivni zastopanosti. Naši predhodni poskusi so pokazali, da inhibicija obeh DGAT encimov ob dodatku višjih koncentracij OK (50 μM in več) v celicah HUVEC povzroča lipotoksičnost. Ker smo želeli preveriti, kakšna je vloga posameznega DGAT encima pri sintezi LK ob dodatku OK, smo v celicah merili količino LK ob uporabi inhibitorja DGAT1 (T863) in DGAT2 (PF-06424439) posamično ter ob uporabi obeh inhibitorjev hkrati. Naši rezultati so pokazali, da je v primeru dodatka OK za sintezo LK v endotelijskih celicah v celoti odgovoren encim DGAT1, saj inhibitor DGAT1 enako učinkovito prepreči sintezo LK kot kombinacija inhibitorjev DGAT1 in DGAT2 hkrati. Naše ugotovitve so v skladu z drugimi viri, ki navajajo, da je vloga encima DGAT1 predvsem zaščita celice pred lipotoksičnostjo, kadar so koncentracije MK visoke (intenzivna lipoliza ali zunanji izvor MK), medtem ko je encim DGAT2 odgovoren predvsem za esterifikacijo *de novo* sintetiziranih MK (Liang in sod., 2008).

Iz naših rezultatov je razvidno, da se OK v endotelijskih celicah vgradi v LK in da ima

zaščitno delovanje, saj znižuje s SPIONi povzročeno celično smrt in količino ROS. Da bi izvedeli, ali je pri zaščitnem delovanju OK bistveno, da se OK lahko nemoteno sprošča iz LK, smo želeli preveriti, kaj se zgodi, če utišamo gen za ATGL, ki katalizira prvo stopnjo hidrolize TAG v LK. Rezultati naših poskusov so pokazali, da je bila transfekcija celic z siRNA za utišanje ATGL uspešna, vendar pa utišanje gena za ATGL ob dodatku 100 μ M OK ni bistveno vplivalo na količino LK v celicah. Možno je, da pri danih pogojih proces hidrolize TAG ni zelo izrazit ali pa so pri tem udeležene druge lipaze in/ali lipofagija. Našo domnevo o udeležnosti drugih lipaz bi bilo smiselno preveriti tako, da bi v celicah utišali gen za HSL, ki katalizira drugo stopnjo hidrolize TAG, torej hidrolizo diacilglicerola (DAG) do proste MK in monoacilglicerola (MAG), vendar tega zaradi časovnih omejitev nismo uspeli izvesti.

Ker nam z utišanjem gena za ATGL ni uspelo preveriti, kako nemoten proces lipolize LK vpliva na zaščitno delovanje OK, smo pa v nadaljevanju poskušali ugotoviti, ali je zaščitno delovanje OK odvisno od njene vgradnje v LK. S tem namenom smo izvedli poskus s kombinacijo obeh DGAT inhibitorjev, OK in SPIONov. Pri tem smo uporabili nižjo koncentracijo OK (30 μ M), saj smo predhodno dokazali, da OK pri tej koncentraciji v kombinaciji z DGAT inhibitorji ne povzroča lipotoksičnosti. Rezultati so presenetljivo pokazali, da 30 μ M OK zavira s SPIONi povzročeno celično smrt tudi ob prisotnosti zaviralcev DGAT inhibitorjev, kar kaže, da zaščitni učinek OK ni odvisen le od njene vgradnje v LK. S tem smo ovrgli drugi del druge hipoteze, v kateri smo predvidevali, da bo OK v celicah HUVEC inducirala sintezo LK in da bodo te LK celice zaščitile pred kvarnimi učinki SPIONov. Naši rezultati so skladni s študijo Magtanonga in sod. (Magtanong in sod., 2019), v kateri so pokazali, da zaščitni učinek mononenasičenih MK pred regulirano celično smrtjo (v njihovem primeru je šlo za ferroptozo) ni pogojen z vgradnjo OK v LK, temveč z izpodrivanjem lahko oksidabilnih polinenasičenih MK iz membranskih fosfolipidov in posledičnega zaviranja peroksidacije membranskih lipidov. Ugotovili so, da je pri tem ključna aktivacija encima acil-CoA sintetaza dolgoveržnih maščobnih kislin 3 (ACSL3), ki aktivira MK za vgradnjo v membranske fosfolipide. V prihodnosti bi bilo smiselno, da bi tudi v sklopu naših poskusov izvedli utišanje gena za ACSL3 in preverili, kako to vpliva na zaščitno funkcijo OK ob izpostavitvi SPIONom. Nasprotno pa so Jarc in sod. (2018) pokazali, da OK pri celicah raka dojke preprečuje s polinenasičenimi MK povzročen oksidativni stres in celično smrt, pri čemer je pogoj za zaščitno vlogo OK njena vgradnja v TAG ter njeno lipolitično sproščanje iz LK.

5.4 VPLIV SPIONov IN OLEINSKE KISLINE NA FEROPTOZO

Magtanong in sod. (Magtanong in sod., 2019) so v svoji študiji pokazali, da OK ščiti celice pred določenim tipom celične smrti, to je ferroptozo. Ferroptozo je reguliran tip celične smrti, za katero je značilna povečana raven znotrajceličnega železa in inaktivacija encima GPX4, posledica tega pa je lipidna peroksidacija celičnih membran. Tudi naši

rezultati IR spektroskopije nakazujejo na to, da SPIONi v celicah HUVEC povzročajo lipidno peroksidacijo. Glede na to, da smo SPIONe na slikah TEM v endotelijskih celicah zasledili v endocitotskih veziklih in amfiosomih, sklepamo, da bi v celicah lahko prišlo do razgradnje SPIONov in posledičnega dviga znotrajcelične koncentracije železa, kar bi lahko privedlo do ferroptoze. S tem namenom smo merili lipidno peroksidacijo v celicah, ki so bile izpostavljene SPIONom, OK ter induktorju ferroptoze RSL3 ali inhibitorjema ferroptoze, α -tokoferolu in ferostatinu-1. Rezultati so pokazali, da RSL3 in SPIONi v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno povečujejo lipidno peroksidacijo, pri čemer OK delež lipidne peroksidacije znižuje. Oba inhibitorja ferroptoze, α -tokoferol in ferostatin-1, popolnoma izničita učinke SPIONov na lipidno peroksidacijo, ferostatin-1 pa tudi statistično značilno znižuje količino ROS v celicah in delež celične smrti. Ker je le na podlagi rezultatov lipidne peroksidacije težko sklepamo, ali SPIONi v celicah res povzročajo ferroptozo, smo v celicah preverili tudi izražanje proteina GPX4, katerega znižano izražanje je pogosto uporabljen biomarker za ferroptozo. Naši rezultati so pokazali, da induktor ferroptoze RSL3, SPIONi ter kombinacija obeh statistično značilno zniža izražanje GPX4 v primerjavi z neizpostavljenimi celicami. Razvidno je tudi, da inhibitor ferroptoze ferostatin-1, statistično značilno zvišuje izražanje GPX4 pri celicah, ki so bile izpostavljene SPIONom. Iz rezultatov lahko zaključimo, da SPIONi v celicah HUVEC inducirajo ferroptozo, bi pa morali izvesti še dodatne raziskave, da bi lahko dokončno opredelili, kakšna je pri tem vloga OK.

5.5 VPLIV CELIČNE SMRTI NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE

Izvensinaptična AChE ima pomembno vlogo v procesu celične smrti in pretekle študije so potrdile povečano izražanje (Park in sod., 2004) ali povečano količino (Xie in sod., 2011) AChE med procesom apoptoze. Študija na endotelijskih celicah je pokazala, da je količina AChE povečana tudi pri induciranjem vnetju (De Oliveira in sod., 2012). Zaenkrat je le malo znanega o tem, kako apoptoza in drugi tipi celične smrti vplivajo na aktivnost AChE v celicah. S tem namenom smo v celicah HUVEC inducirali apoptozo s staurosporinom ter ferroptozo z RSL3 in erastinom. Celice smo izpostavili tudi SPIONom, za katere smo s predhodnimi poskusi ugotovili, da povzročajo celično smrt in da gre pri tej celični smrti vsaj deloma za ferroptozo. Meritve aktivnosti AChE v lizatih neizpostavljenih in izpostavljenih celic so pokazali, da nobena izmed izpostavitvev, s katerimi smo v celicah inducirali celično smrt, v primerjavi z neizpostavljenimi celicami ni statistično značilno vplivala na aktivnost AChE v celicah. Prav tako so naši rezultati pokazali, da α -tokoferol, ferostatin in OK, za katere smo pokazali, da znižujejo delež celične smrti, povzročene s SPIONi, ne vplivajo na aktivnost AChE v primerjavi z aktivnostjo AChE v celicah, ki so bile izpostavljene samo SPIONom. Ker smo aktivnost merili le v eni časovni točki, to je po 24-urni izpostavljenosti celic, iz rezultatov težko sklepamo, kako apoptoza in ferroptoza pri endotelijskih celicah vplivata na aktivnost AChE. V prihodnosti bi bilo zanimivo izmeriti aktivnost v različnih časovnih točkah. Prav

tako bi bilo zanimivo, podobno kot v preteklih študijah, izmeriti izražanje in količino AChE ter rezultate primerjati z že obstoječimi literaturnimi podatki.

6 SKLEPI

- SPIONi se pri koncentraciji 50 $\mu\text{g/mL}$ po 24 urah internalizirajo v celice HUVEC, kjer se nahajajo v endocitotskih veziklih in amfiosomih.
- SPIONi s koncentracijo 50 $\mu\text{g/mL}$ so po 24 urah za celice HUVEC citotoksični in povzročijo približno 60 % celično smrt.
- SPIONi v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno povečujejo količino ROS.
- Antioksidanta N-acetilcistein in α -tokoferol do določene mere zmanjšata količino ROS in celično smrt, ki jo v celicah HUVEC povzročajo SPIONi.
- SPIONi s koncentracijo 50 in 100 $\mu\text{g/mL}$ v celicah HUVEC povzročajo kopičenje LK. Do kopičenja LK prihaja zaradi zmanjšane razgradnje LK in ne zaradi povečane sinteze. To pomeni, da ovržemo našo prvo hipotezo.
- OK v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno povečujejo količino LK.
- Pri koncentracijah do 100 μM OK ne povzroča celične smrti in ne povečuje količine ROS v celicah HUVEC.
- OK znižuje s SPIONi povzročeno celično smrt, pri čemer vgradnja OK v LK ni bistvena za njeno zaščitno vlogo. To pomeni, da ovržemo našo drugo hipotezo.
- Višje koncentracije OK (50 μM ali 100 μM) so ob preprečeni sintezi TAG toksične za celice HUVEC.
- SPIONi v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno povečujejo lipidno peroksidacijo. OK znižuje s SPIONi povzročeno lipidno peroksidacijo.
- SPIONi v celicah HUVEC statistično značilno znižujejo izražanje GPX4.
- SPIONi ter induktorji apoptoze in ferroptoze statistično značilno ne vplivajo na aktivnost AChE v celicah HUVEC.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

SPIONi imajo zaradi svojih superparamagnetnih lastnosti velik potencial za uporabo v medicini, kjer se lahko uporabljajo kot magnetni nosilci zdravil, pri zdravljenju z magnetno hipertermijo, kot kontrastna sredstva pri slikanju z magnetno resonanco in za slikanje s superparamagnetnimi ND (Waddington in sod., 2020; Hedayatnasab in sod., 2020; Samrot in sod., 2021). SPIONi na splošno veljajo za varne in biokompatibilne, vendar nedavne študije kažejo, da imajo lahko na celice tudi kvarne učinke (Patil in sod., 2018; Vakili-Ghartavol in sod., 2020), kar zmanjšuje njihovo klinično uporabnost. Nekateri SPIONi so bili zaradi stranskih učinkov umaknjeni s tržišča. Podrobno razumevanje interakcij med SPIONi in celicami ter novi pristopi za zmanjšanje njihovih neželenih učinkov bi v prihodnosti lahko povečali uporabo SPIONov za medicinske namene.

SPIONi se za medicinske namene običajno aplicirajo intravensko, zato so endotelijske celice, ki prekrivajo krvne žile, med prvimi, ki pridejo v stik z njimi. SPIONi s hidrodinamskim premerom med 10 in 50 nm se v krvnem obtoku lahko zadržujejo do 30 ur (Neuwelt in sod., 2009), zato so učinki SPIONov na endotelijske celice in sposobnost celic, da se spopadejo z izpostavljenostjo SPIONom, zelo pomembni.

V okviru doktorskega dela smo preučevali učinke SPIONov na endotelijske celice HUVEC in ugotavljali, ali lahko OK zaščiti celice pred njihovimi škodljivimi učinki. Glede na rezultate številnih objavljenih študij, ki so pokazale, da različni ND v celicah povzročajo kopičenje LK, smo predvidevali, da bodo tudi SPIONi v celicah HUVEC inducirali sintezo LK in povzročili njihovo kopičenje. Poleg tega smo predvidevali, da bi z uporabo OK v celicah HUVEC lahko spodbudili sintezo LK, ki bi celice zaščitile pred kvarnimi učinki SPIONov. Vplive SPIONov in OK na celice smo preučevali s pomočjo testov viabilnosti, pretočne citometrije, mikroskopije, IR spektroskopije in z imunodetekcijo proteinov.

Naši rezultati so pokazali, da endotelijske celice v 24 urah internalizirajo SPIONE, ki so za celice citotoksični pri koncentracijah nad 25 $\mu\text{g/mL}$. V nadaljevanju smo pokazali, da SPIONi v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno povečujejo količino ROS. To je v skladu z rezultati drugih študij, ki so pokazale, da je proizvodnja ROS in posledično oksidativni stres glavni mehanizem toksičnosti železooksidnih ND, med katere sodijo tudi SPIONi (Naqvi in sod., 2010; Paunovic in sod., 2020; Shen in sod., 2018; Yarjanli in sod., 2017; Zhu in sod., 2010; Gaharwar, 2015). Ko smo celice hkrati izpostavili SPIONom in enemu od antioksidantov (NAC ali α -tokoferolu), smo ugotovili, da oba antioksidanta zmanjšata količino ROS in citotoksičnost SPIONov, kar kaže, da je

citotoksični učinek SPIONov dejansko povezan z oksidativnim stresom.

Oksidativni stres v celicah vpliva na presnovo lipidov, zaradi česar v celicah lahko prihaja do kopičenja LK (Lee in sod., 2015; Liu in sod., 2015). Pretekle študije so že pokazale, da nekateri ND preko povzročene oksidativnega stresa v različnih tipih celic spodbujajo kopičenje LK (Khatchadourian and Maysinger, 2009; Vesterdal in sod., 2014; Yang in sod., 2020; Cao in sod., 2014). Tudi naši rezultati so pokazali, da SPIONi v celicah HUVEC povzročajo kopičenje LK. Ko smo celice sočasno izpostavili SPIONom in DGAT inhibitorjem, ki zavirajo sintezo TAG in posledično sintezo LK, smo ugotovili, da DGAT inhibitorji ne vplivajo na kopičenje LK v celicah, ki so izpostavljene SPIONom. Iz tega sklepamo, da SPIONi ne inducirajo sinteze novih LK, temveč zavirajo razgradnjo že obstoječih. S tem smo ovrgli našo prvo hipotezo, v kateri smo predvidevali, da SPIONi v endotelijskih celicah inducirajo sintezo LK.

Glede na to, da imajo LK v celicah pomembno vlogo pri obvladovanju stresa, smo predpostavljali, da so celice, v katerih z dodatkom lipidov predhodno stimuliramo sintezo LK, bolj zaščitene pred stresom, kot je na primer izpostavljenost različnim ND. To sta že raziskovala Khatchadourian in Maysinger in pokazala, da se preživetje celic feokromocitoma (PC12) ob izpostavljenosti kovinskim ND poveča, če so bile celice predhodno izpostavljene OK, ki spodbudi sintezo LK (Khatchadourian in Maysinger, 2009). Tudi mi smo za indukcijo sinteze LK izbrali OK in potrdili, da pri koncentraciji 100 μM v celicah HUVEC inducira sintezo LK ter hkrati ne vpliva na količino ROS in nima citotoksičnih učinkov. S tem smo potrdili prvi del druge hipoteze, kjer smo predvidevali, da bo OK v celicah HUVEC inducirala sintezo LK.

Pri nadaljnjih poskusih smo celice HUVEC najprej izpostavili 100 μM OK, ki je v celicah stimulirala sintezo LK, nato pa smo celice za 24 ur izpostavili SPIONom. Rezultati pretočne citometrije so pokazali, da OK poveča preživetje celic, ki so izpostavljene SPIONom, njen zaščitni učinek pa je povezan z zmanjšanjem oksidativnega stresa. Naše ugotovitve se skladajo s preteklimi študijami, ki so pokazale, da OK ščiti celice pred oksidativnim stresom in celično smrtjo (Yamasaki in sod., 2008; Haeiwa in sod., 2014; Magtanong in sod., 2019; Zeng in sod., 2020).

Rezultati IR spektroskopije so pokazali, da SPIONi v celicah HUVEC povzročajo metabolno neravnovesje, oksidativni stres, lipidno peroksidacijo in celično smrt. Predhodna izpostavitve celic OK je zmanjšala zgoraj navedene negativne učinke SPIONov, kar potrjuje zaščitno vlogo OK. Zaščitno vlogo OK pred lipidno peroksidacijo in posledično ferroptozo so v svoji študiji potrdili tudi Magtanong in sod. (Magtanong in sod., 2019).

Pomen vgradnje OK v LK za preprečitev njene lipotokisčnosti smo preverili tako, da smo

v celicah zavrli sintezo TAG z inhibicijo encimov DGAT1 in DGAT2 ter hkrati izpostavili celice različnim koncentracijam OK. Ugotovili smo, da OK v prosti (nezaestreni) obliki pri nižjih koncentracijah (30 μM in manj) za celice ni toksična, pri višjih koncentracijah (50 μM in več) pa prosta OK za celice postane lipotoksična, zato jo celice uskladiščijo v obliki TAG, za kar je odgovor encim DGAT1. To je v skladu s študijo Lianga in sod. (2008), v kateri so pokazali, da je DGAT1 odgovoren za zaščito celic pred lipotoksičnostjo, kadar so celice izpostavljene visokim koncentracijam MK.

V nadaljevanju smo želeli preveriti, ali je za zaščitno funkcijo OK pomembno, da se nemoteno vgrajuje v LK in da se iz njih nemoteno sprošča. Z namenom, da bi preverili vpliv sproščanja OK iz LK, smo v celicah utišali gen za ATGL, ki katalizira prvo stopnjo hidrolize TAG v LK. Transfekcija celic in utišanje gena za ATGL je bilo uspešno, vendar pa utišanje gena za ATGL ob dodatku 100 μM OK ni bistveno vplivalo na količino LK v celicah, iz česar sklepamo, da pri danih pogojih proces hidrolize TAG ni zelo izrazit ali pa so pri tem udeležene druge lipaze in/ali lipofagija. V prihodnosti bi bilo smiselno preveriti, kako na zaščitno vlogo OK vpliva utišanje gena za HSL, ki katalizira drugo stopnjo hidrolize TAG.

Da bi preverili vpliv vgradnje OK v LK za njeno zaščitno vlogo, smo v celicah inhibirali encima DGAT1 in DGAT2 ter celice izpostavili 30 μM OK in SPIONom. Rezultati so presenetljivo pokazali, da OK zavira s SPIONi povzročeno celično smrt tudi ob prisotnosti zaviralcev DGAT inhibitorjev, kar kaže, da zaščitni učinek OK ni odvisen le od njene vgradnje v LK. S tem smo ovrgli drugo hipotezo, v kateri smo predvidevali, da bo OK v celicah HUVEC inducirala sintezo LK in da bodo te LK celice zaščitile pred kvarnimi učinki SPIONov. Naši rezultati se skladajo z rezultati Magtanonga in sod. (2019), ki so v svoji študiji pokazali, da zaščitna funkcija OK ne temelji na njeni vgradnji v LK, ampak na izpodrivanju lahko oksidabilnih polinenasičenih MK iz membran. Posledica tega je, da so membrane manj dovzetne za lipidno peroksidacijo. Izkazalo se je, da je pri tem ključna aktivacija encima ACSL3, ki aktivira MK za vgradnjo v membranske fosfolipide, zato bi bilo v prihodnosti smiselno preveriti, kako utišanje gena za ACSL3 vpliva na zaščitno funkcijo OK ob izpostavitvi SPIONom.

Rezultati IR spektroskopije so pokazali, da je citotoksičnost SPIONov povezana tudi s tem, da SPIONi v celicah HUVEC povzročajo lipidno peroksidacijo. To smo še dodatno preverili s pretočno citometrijo in potrdili, da SPIONi v celicah HUVEC koncentracijsko odvisno povečujejo lipidno peroksidacijo, pri čemer OK znižuje delež lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija v celicah vodi v ferroptozo, tip regulirane celične smrti, zato smo preverili, kako na lipidno peroksidacijo, ki jo povzročajo SPIONi, vplivata dva različna inhibitorja ferroptoze, α -tokoferol in ferostatin-1. Naši rezultati so pokazali, da oba inhibitorja ferroptoze popolnoma izničita učinke SPIONov na lipidno peroksidacijo, ferostatin-1 pa tudi statistično značilno znižuje količino ROS v celicah in

delež celične smrti, kar nakazuje na to, da SPIONi v celicah povzročajo ferroptozo. Da bi preverili svojo hipotezo, smo v celicah določili tudi izražanje proteina GPX4, katerega znižano izražanje je pogosto uporabljen biomarker za ferroptozo. Ugotovili smo, da SPIONi v celicah HUVEC statistično značilno znižujejo izražanje GPX4 v primerjavi z neizpostavljenimi celicami. Pri celicah, ki so bile sočasno izpostavljene ferostatinu-1 in SPIONom ali OK in SPIONom, se izražanje GPX4 statistično značilno ni razlikovalo od izražanja pri neizpostavljenih celicah. Iz rezultatov sklepamo, da SPIONi v celicah HUVEC inducirajo ferroptozo in da OK celice ščiti pred ferroptozo.

Na koncu smo želeli preveriti, kako različni tipi celične smrti v celicah HUVEC vplivajo na aktivnost encima AChE. Pretekle študije so pokazale, da med apoptozo prihaja do povečanega izražanja AChE (Park in sod., 2004) oz. da se med apoptozo količina AChE poveča (Xie in sod., 2011). Študija na endotelijskih celicah je pokazala, da je količina AChE povečana tudi pri induciranem vnetju (De Oliveira in sod., 2012). V celicah HUVEC smo inducirali apoptozo s staurosporinom ter ferroptozo z RSL3 in erastinom. Celice smo izpostavili tudi SPIONom, za katere smo s predhodnimi poskusi ugotovili, da povzročajo celično smrt in da gre pri tej celični smrti vsaj deloma za ferroptozo. Naši rezultati so pokazali, da pri celicah HUVEC zgoraj naštetih induktorjih celične smrti po 24 urah nimajo vpliva na aktivnost AChE.

V okviru doktorskega dela smo pokazali, da SPIONi v celicah HUVEC povzročajo oksidativni stres, lipidno peroksidacijo, ferroptozo in kopičenje LK. OK celice ščiti pred kvarnimi učinki SPIONov, pri tem pa vgradnja OK v LK ni pogoj za njeno zaščitno delovanje.

7.2 SUMMARY

Due to their superparamagnetic properties, SPIONs have great potential for medical applications where they can be used as magnetic drug carriers, in magnetic hyperthermia treatments, as contrast agents in magnetic resonance imaging, and for superparamagnetic imaging with NPs (Waddington et al., 2020; Hedayatnasab et al., 2020; Samrot et al., 2021). SPIONs are generally considered safe and biocompatible, but recent studies suggest that they may also have deleterious effects on cells (Patil et al., 2018; Vakili-Ghartavol et al., 2020), which reduces their clinical utility. Some SPIONs have been withdrawn from the market due to side effects. A detailed understanding of SPION-cell interactions and novel approaches to reduce their side effects may increase the use of SPIONs for medical purposes in the future.

SPIONs are usually injected intravenously for medical purposes so that the endothelial cells lining blood vessels are the first to come into contact with them. SPIONs with a hydrodynamic diameter between 10 and 50 nm can remain in the bloodstream for up to

30 hours (Neuwelt et al., 2009), so the effects of SPIONs on endothelial cells and the ability of cells to cope with SPION exposure are of great importance.

In our dissertation, we examined the effects of SPIONs on HUVEC cells and determined whether OA can protect cells from their deleterious effects. Given the results of several published studies showing that various NPs induce LD accumulation in cells, we hypothesized that SPIONs would also induce LD synthesis in HUVECs and cause LD accumulation. In addition, we hypothesized that the application of OA in HUVEC cells could induce LD synthesis, which would protect the cells from the deleterious effects of SPIONs. The effects of SPIONs and OA on cells were investigated by viability assays, flow cytometry, microscopy, IR spectroscopy, and protein immunodetection.

Our results showed that endothelial cells internalize SPIONs, which are cytotoxic to cells at concentrations above 25 $\mu\text{g/ml}$, within 24 hours. We also showed that SPIONs increased the amount of ROS in HUVECs in a concentration-dependent manner. This is consistent with the results of other studies that have shown that the production of ROS and the resulting oxidative stress is the main mechanism for the toxicity of iron oxide NPs, which include SPIONs (Naqvi et al., 2010; Paunovic et al., 2020; Shen et al., 2018; Yarjanli et al., 2017; Zhu et al.). When cells were simultaneously exposed to SPIONs and one of the antioxidants (NAC or α -tocopherol), we found that both antioxidants reduced the amount of ROS and cytotoxicity of SPIONs, suggesting that the cytotoxic effect of SPIONs is indeed related to oxidative stress.

Oxidative stress in cells impairs lipid metabolism, which may lead to the accumulation of LDs in cells (Lee et al., 2015; Liu et al., 2015). Our results also showed that SPIONs induced the accumulation of LD in HUVEC cells. When cells were simultaneously exposed to SPIONs and DGAT inhibitors, which inhibit TAG synthesis and consequently LD synthesis, we found that DGAT inhibitors did not affect the accumulation of LD in cells exposed to SPIONs. Thus, we conclude that SPIONs do not induce the synthesis of new LDs but inhibit the degradation of existing LDs. This refutes our first hypothesis, in which we assumed that SPIONs induce LD synthesis in endothelial cells.

Because LDs play an important role in the control of cellular stress, we hypothesized that cells in which LD synthesis is prestimulated by lipid supplementation are better protected against stress, such as exposure to various NPs. This was previously studied by Khatchadourian and Maysinger, who showed that survival of pheochromocytoma cells (PC12) is increased upon exposure to metallic NPs when the cells were previously exposed to OA, which stimulates LD synthesis (Khatchadourian and Maysinger, 2009). We also selected OA for induction of LD synthesis and confirmed that it induces LD synthesis at a concentration of 100 μM in HUVEC cells, while at the same time it does not affect the amount of ROS and has no cytotoxic effects. This confirmed the first part of our second hypothesis that OA would induce LD synthesis in HUVEC cells.

In further experiments, HUVECs were first exposed to 100 μM OA, which stimulated LD synthesis in the cells, and then the cells were exposed to SPION for 24 hours. Flow cytometry results showed that OA increased the survival of cells exposed to SPIONs and that the protective effect was associated with a reduction in oxidative stress. Our results are consistent with previous studies showing that OA protects cells from oxidative stress and cell death (Yamasaki et al., 2008; Haeiwa et al., 2014; Magtanong et al., 2019; Zeng et al., 2020).

IR spectroscopy results showed that SPIONs induced metabolic imbalance, oxidative stress, lipid peroxidation, and cell death in HUVEC cells. Prior exposure of cells to OA reduced the above negative effects of SPIONs, confirming that OA plays a protective role. The protective role of OA against lipid peroxidation and subsequent ferroptosis was also confirmed by Magtanong et al. in their study (Magtanong et al., 2019).

The importance of incorporating OA into LDs to prevent its lipotoxicity was verified by inhibiting the synthesis of TAG in cells by inhibiting the enzymes DGAT1 and DGAT2 while the cells were exposed to different concentrations of OA. We found that free OA is not toxic to cells at low concentrations (30 μM and below), but at higher concentrations (50 μM and above) free OA becomes lipotoxic to cells and is stored by cells in the form of TAG, for which the enzyme DGAT1 is responsible. This is consistent with the study by Liang et al. which showed that DGAT1 is responsible for protecting cells from lipotoxicity when cells are exposed to high concentrations of FA.

Next, we wanted to test whether it is important for the protective function of OA to be smoothly incorporated into and released from LDs. To test the effects of releasing OA from LDs, we knocked out the ATGL gene that catalyzes the first step of TAG hydrolysis in LDs. Transfection of the cells and silencing of the ATGL gene were successful, but silencing of the ATGL gene had no significant effect on the amount of LDs after addition of 100 μM OA, suggesting that under the given conditions the process of TAG hydrolysis is not very pronounced or that other lipases and/or lipophagy are involved. In the future, it would be interesting to investigate how the protective role of OA is affected by silencing of the HSL gene that catalyzes the second step of TAG hydrolysis.

To test how incorporation of OA into LDs affects its protective function, we inhibited DGAT1 and DGAT2 enzymes in the cells and exposed the cells to 30 μM OA and SPIONs. Surprisingly, the results showed that OA inhibited SPION-induced cell death even in the presence of DGAT inhibitors, suggesting that the protective effect of OA does not depend solely on its incorporation into LDs. This refuted our second hypothesis, which assumed that OA would induce LD synthesis in HUVECs and that these LD would protect cells from the deleterious effects of SPIONs. Our results are consistent with those of Magtanong et al. (Magtanong et al., 2019), who showed in their study that the protective function of OA is not due to its incorporation into LDs but to the displacement

of easily oxidizable polyunsaturated FAs from membranes. As a result, membranes are less susceptible to lipid peroxidation. Activation of the enzyme ACSL3, which activates FAs for incorporation into membrane phospholipids, has been shown to be critical in this regard, and it would be worthwhile to investigate in the future how silencing of the ACSL3 gene affects this protective function of LDs when exposed to SPIONs.

The results of IR spectroscopy showed that the cytotoxicity of SPIONs is also related to the fact that SPIONs induce lipid peroxidation in HUVEC cells. This was further verified by flow cytometry, confirming that SPIONs increase lipid peroxidation in HUVEC cells in a concentration-dependent manner, whereas OA decreases the level of lipid peroxidation. Lipid peroxidation in cells leads to ferroptosis, a form of regulated cell death. We therefore investigated how lipid peroxidation induced by SPIONs is affected by two different ferroptosis inhibitors, α -tocopherol and ferrostatin-1. Our results showed that both ferroptosis inhibitors completely abolished the effects of SPIONs on lipid peroxidation, and ferrostatin-1 also statistically significantly reduced the amount of ROS in cells and the proportion of cell death, suggesting that SPIONs induce ferroptosis in cells. To test our hypothesis, we also determined the expression of GPX4 in the cells, because decreased expression of GPX4 is a commonly used biomarker for ferroptosis. We found that SPIONs in HUVECs statistically significantly downregulated GPX4 expression compared with unexposed cells. In cells exposed to ferrostatin-1 and SPIONs or OA and SPIONs, GPX4 expression was not statistically significantly different from that in unexposed cells. These results suggest that SPIONs induce ferroptosis in HUVECs and that OA protects cells from ferroptosis.

Finally, we wanted to test how different types of cell death in HUVECs affect AChE activity. Previous studies have shown that AChE expression is increased during apoptosis (Park et al, 2004) or that AChE levels are increased during apoptosis (Xie et al, 2004). A study in endothelial cells showed that AChE levels are also increased during inflammation (De Oliveira et al., 2012). Apoptosis was induced in HUVEC cells with staurosporine and ferroptosis with RSL3 and erastin. We also exposed the cells to SPIONs, which we had previously found to induce cell death and that this cell death was at least partially due to ferroptosis. Our results showed that the above triggers of cell death in HUVEC cells had no effect on AChE activity after 24 hours of exposure.

In our PhD work, we showed that SPIONs induce oxidative stress, lipid peroxidation, ferroptosis, and LD accumulation in HUVEC cells. OA protects cells from the deleterious effects of SPIONs, but incorporation of OA into LDs is not a prerequisite for its protective effect.

8 VIRI

- Abumrad N.A., Cabodevilla A.G., Samovski D., Pietka T., Basu D., Goldberg I.J. 2021. Endothelial cell receptors in tissue lipid uptake and metabolism. *Circulation Research*, 128: 433–450
- Ackerman D., Tumanov S., Qiu B., Michalopoulou E., Spata M., Azzam A., Xie H., Simon M.C., Kamphorst J.J. 2018. Triglycerides promote lipid homeostasis during hypoxic stress by balancing fatty acid saturation. *Cell Reports*, 24: 2596–2605
- Apopa P.L., Qian Y., Shao R., Guo N.L., Schwegler-Berry D., Pacurari M., Porter D., Shi X., Vallyathan V., Castranova V., Flynn D.C. 2009. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Particle and Fibre Toxicology*, 6: 1–14
- Astanina K., Simon Y., Cavelius C., Petry S., Kraegeloh A., Kiemer A.K. 2014. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles impair endothelial integrity and inhibit nitric oxide production. *Acta Biomaterialia*, 10: 4896–4911
- Bai Y., Meng L., Han L., Jia Y., Zhao Y., Gao H., Kang R., Wang X., Tang D., Dai E. 2019. Lipid storage and lipophagy regulates ferroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508: 997–1003
- Bailey A.P., Koster G., Guillermier C., Hirst E., MacRae J.I., Lechene C.P., Postle A.D., Gould A.P. 2015. Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of *drosophila*. *Cell*, 163: 340–353
- Bertrand N., Grenier P., Mahmoudi M., Lima E.M., Appel E.A., Dormont F., Lim J.M., Karnik R., Langer R., Farokhzad O.C. 2017. Mechanistic understanding of *in vivo* protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. *Nature Communications*, 8: 777, doi: 10.1038/s41467-017-00600-w: 8 str.
- Blohberger J., Kunz L., Einwang D., Berg U., Berg D., Ojeda S.R., Dissen G.A., Fröhlich T., Arnold G.J., Soreq H., Lara H., Mayerhofer A. 2015. Readthrough acetylcholinesterase (AChE-R) and regulated necrosis: pharmacological targets for the regulation of ovarian functions? *Cell Death & Disease*, 6, 3: e1685, doi: 10.1038/cddis.2015.51: 10 str.
- Bosma M., Dapito D.H., Drosatos-Tampakaki Z., Huiping-Son N., Huang L.S., Kersten S., Drosatos K., Goldberg I.J. 2014. Sequestration of fatty acids in triglycerides prevents endoplasmic reticulum stress in an *in vitro* model of cardiomyocyte lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841: 1648–1655
- Buyukhatipoglu K., Clyne A.M. 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96: 186–195
- Cao J., Dai D.L., Yao L., Yu H.H., Ning B., Zhang Q., Chen J., Cheng W.H., Shen W., Yang Z.X. 2012. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 364: 115–129
- Cao Y., Jacobsen N.R., Danielsen P.H., Lenz A.G., Stoeger T., Loft S., Wallin H., Roursgaard M., Mikkelsen L., Møller P. 2014. Vascular effects of multiwalled carbon nanotubes in dyslipidemic ApoE^{-/-} Mice and cultured endothelial cells.

- Toxicological Sciences, 138: 104–116
- Carluccio M.A., Massaro M., Bonfrate C., Siculella L., Maffia M., Nicolardi G., Distanto A., Storelli C., De Caterina R. 1999. Oleic acid inhibits endothelial activation: A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the Mediterranean diet. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19: 220–228
- Cegnar M., Kerč J. 2012. Nanozdravila. *Farmaceutski vestnik*, 63: 82-87
- Chen X., Comish P.B., Tang D., Kang R. 2021. Characteristics and Biomarkers of Ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9: 1-9
- Conrad M., Lorenz S.M., Proneth B. 2020. Targeting ferroptosis: new hope for as-yet-incurable diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 27, 2: 113-122
- Curcio A., Van De Walle A., Serrano A., Preveral S., Péchoux C.P., Pignol D., Menguy N., Lefevre C.T., Espinosa A., Wilhelm C. 2019. Transformation cycle of magnetosomes in human stem cells: from degradation to biosynthesis of magnetic nanoparticles anew. *ACS Nano*, 14, 2: 1406–1417
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., Cantley A.M., Yang W.S., Morrison B., Stockwell B.R. 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149: 1060–1072
- Dixon S.J., Winter G.E., Musavi L.S., Lee E.D., Snijder B., Rebsamen M., Superti-Furga G., Stockwell B.R. 2015. Human haploid cell genetics reveals roles for lipid metabolism genes in nonapoptotic cell death. *ACS Chemical Biology*, 10: 1604–1609
- Dogra S., Kar A.K., Girdhar K., Daniel P.V., Chatterjee S., Choubey A., Ghosh S., Patnaik S., Ghosh D., Mondal P. 2019. Zinc oxide nanoparticles attenuate hepatic steatosis development in high-fat-diet fed mice through activated AMPK signaling axis. *Nanomedicine Nanotechnology, Biology and Medicine*, 17: 210–222
- Dong B., Song W., Lu Y., Sun Y., Lin W. 2020. Revealing the viscosity changes in lipid droplets during ferroptosis by the real-time and in situ near-infrared imaging. *ACS Sensors*, 6: 22–26
- Duan J., Du J., Jin R., Zhu W., Liu L., Yang L., Li M., Gong Q., Song B., Anderson J.M., Ai H. 2019. Iron oxide nanoparticles promote vascular endothelial cells survival from oxidative stress by enhancement of autophagy. *Regenerative Biomaterials*, 6, 4: 221-229
- Dulińska-Litewka J., Łazarczyk A., Hałubiec P., Szafranski O., Karnas K., Karewicz A. 2019. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles-current and prospective medical applications. *Materials*, 12, 4: 617, doi: 10.3390/ma12040617: 26 str.
- Dumas P., Sockalingum G.D., Sulé-Suso J. 2007. Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications? *Trends in Biotechnology*, 25: 40–44
- Dunn L.L., Rahmanto Y.S., Richardson D.R. 2007. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in Cellular Biology*, 17: 93–100
- Elkhenany H., Abd Elkodous M., Ghoneim N.I., Ahmed T.A., Ahmed S.M., Mohamed I.K., El-Badri N. 2020. Comparison of different uncoated and starch-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Implications for stem cell tracking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143: 763–774
- Farjadian F., Ghasemi A., Gohari O., Roointan A., Karimi M., Hamblin M.R. 2019.

- Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities. *Nanomedicine*, 14, 1: 93-126
- Feng Q., Liu Y., Huang J., Chen K., Huang J., Xiao K. 2018. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Scientific Reports*, 8: 1–13
- Filippi M., Nguyen D.V., Garello F., Pertion F., Bégin-Colin S., Felder-Flesch D., Power L., Scherberich A. 2019. Metronidazole-functionalized iron oxide nanoparticles for molecular detection of hypoxic tissues. *Nanoscale*, 11: 22559-22574
- Friedrich R.P., Zaloga J., Schreiber E., Tóth I.Y., Tombácz E., Lyer S., Alexiou C. 2016. Tissue plasminogen activator binding to superparamagnetic iron oxide nanoparticle—covalent versus adsorptive approach. *Nanoscale Research Letter*, 11: 1–11
- Fröhlich E. 2012. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 5577–5591
- Gaharwar U.S., Paulraj R. 2015. Iron oxide nanoparticles induced oxidative damage in peripheral blood cells of rat. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 8: 274–286
- Gutiérrez L., Romero S., Da Silva G.B., Costo R., Vargas M.D., Ronconi C.M., Serna C.J., Veintemillas-Verdaguer S., Del Puerto Morales M. 2015. Degradation of magnetic nanoparticles mimicking lysosomal conditions followed by AC susceptibility. *Biomedical Technology*, 60: 417–425
- Hadjidemetriou M., Kostarelou K. 2017. Nanomedicine: Evolution of the nanoparticle corona. *Nature Nanotechnology*, 12: 288–290
- Haeiwa H., Fujita T., Saitoh Y., Miwa N. 2014. Oleic acid promotes adaptability against oxidative stress in 3T3-L1 cells through lipohormesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 386: 73–83
- Hedayatnasab Z., Dabbagh A., Abnisa F., Wan Daud W.M.A. 2020. Polycaprolactone-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vitro magnetic hyperthermia therapy of cancer. *European Polymer Journal*, 133: e109789, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109789: 12 str.
- Hohnholt M.C., Dringen R. 2013. Uptake and metabolism of iron and iron oxide nanoparticles in brain astrocytes. *Biochemical Society Transactions*, 41: 1588–1592
- Jarc E., Petan T. 2019. Lipid droplets and the management of cellular stress. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 92: 435–452
- Jarc E., Petan T. 2020. A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators. *Biochimie*, 169: 69–87
- Jin Q.H., He H.Y., Shi Y.F., Lu H., Zhang X.J. 2016. Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 8: 1013-1021
- Kawashima K., Fujii T. 2008. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: Overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *Journal of Pharmacological Sciences*, 106: 167–173
- Khatchadourian A., Maysinger D. 2009. Lipid droplets: Their role in nanoparticle-induced oxidative stress. *Molecular Pharmaceutics*, 6: 1125–1137
- Kononenko V., Erman A., Petan T., Krizaj I., Kralj S., Makovec D., Drobne D. 2017. Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO₂-SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells.

- Nanotoxicology, 11: 419–429
- Kounakis K, Chaniotakis M, Markaki M, Tavernarakis N. 2019. Emerging roles of lipophagy in health and disease. *Frontiers in - Cell and Developmental Biology*, 7: 1–8
- Kuo A., Lee M.Y., Sessa W.C. 2017. Lipid droplet biogenesis and function in the endothelium. *Circulation Research*, 120: 1289–1297
- Lee J.H., Ju J.E., Kim B., Pak P.J., Choi E.K., Lee H.S. 2014. Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33: 2759–2766
- Lee J., Homma T., Kurahashi T., Kang E.S., Fujii J. 2015. Oxidative stress triggers lipid droplet accumulation in primary cultured hepatocytes by activating fatty acid synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464: 229–235
- Lee J.S., Mendez R., Heng H.H., Yang Z.Q., Zhang K. 2012. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *American Journal of Translational Research*, 4: 102–113
- Li J., Cao F., Yin H.L., Huang Z.J., Lin Z.T., Mao N., Sun B., Wang G. 2020. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death & Disease*, 11: 88, doi: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>: 13 str.
- Liang C., Yen E., Stone S.J., Koliwad S., Harris C., Farese R.V. 2008. Thematic review series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 49, 11: 2283–301
- Liu L., Zhang K., Sandoval H., Yamamoto S., Jaiswal M., Sanz E., Li Z., Hui J., Graham B.H., Quintana A., Bellen H.J. 2015. Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell*, 160: 177–190
- Liu M., Liu B., Liu Q., Du K., Wang Z., He N. 2019. Nanomaterial-induced ferroptosis for cancer specific therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 382: 160–180
- Long J., Ma W., Yu Z., Liu H., Cao Y. 2019. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) promoted lipid accumulation in THP-1 macrophages through modulation of endoplasmic reticulum (ER) stress. *Nanotoxicology*, 13: 938–951
- Longmire M., Choyke P.L., Kobayashi H. 2008. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: Considerations and caveats. *Nanomedicine*, 3, 5: 703–717
- Magtanong L., Ko P.J., Dixon S.J. 2016. Emerging roles for lipids in non-apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 23: 1099–1109
- Magtanong L., Ko P.J., To M., Cao J.Y., Forcina G.C., Tarangelo A., Ward C.C., Cho K., Patti G.J., Nomura D.K., Olzmann J.A., Dixon S.J. 2019. Exogenous monounsaturated fatty acids promote a ferroptosis-resistant cell state. *Cell Chemical Biology*, 26: 420–432
- Mahmoudi M., Simchi A., Milani A.S., Stroeve P. 2009. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336: 510–518
- Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., Sen T. 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63: 24–46
- Maier-Hauff K., Ulrich F., Nestler D., Niehoff H., Wust P., Thiesen B., Orawa H., Budach V., Jordan A. 2011. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on

- patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology*, 103: 317–324
- Matuszak J., Dörfler P., Zaloga J., Unterweger H., Lyer S., Dietel B., Alexiou C., Cicha I. 2015a. Shell matters: Magnetic targeting of SPIONs and *in vitro* effects on endothelial and monocytic cell function. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 61, 2: 259-277
- Matuszak J., Zaloga J., Friedrich R.P., Lyer S., Nowak J., Odenbach S., Alexiou C., Cicha I. 2015b. Endothelial biocompatibility and accumulation of SPION under flow conditions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380: 20–26
- Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*, 19: 311–330
- Mulens-Arias V., Rojas J.M., Sanz-Ortega L., Portilla Y., Pérez-Yagüe S., Barber D.F. 2019. Polyethylenimine-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles impair *in vitro* and *in vivo* angiogenesis. *Nanomedicine*, 21: e102063, doi: 10.1016/j.nano.2019.102063: 13 str.
- Naqvi S., Samim M., Abdin M.Z., Ahmed F.J., Maitra A.N., Prashant C.K., Dinda A.K. 2010. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, 5: 983–989
- Neuwelt E.A., Hamilton B.E., Varallyay C.G., Rooney W.R., Edelman R.D., Jacobs P.M., Watnick S.G. 2009. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): A future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney International*, 5: 465–474
- Ogasawara Y., Tsuji T., Fujimoto T. 2020. Multifarious roles of lipid droplets in autophagy – Target, product, and what else? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108: 47–54
- De Oliveira P., Gomes A.Q., Pacheco T.R., Vitorino De Almeida V., Saldanha C., Calado A. 2012. Cell-specific regulation of acetylcholinesterase expression under inflammatory conditions. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 51: 129–137
- Olzmann J.A., Carvalho P. 2019. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20: 137–155
- Onal G., Kutlu O., Gozuacik D., Dokmeci Emre S. 2017. Lipid droplets in health and disease. *Lipids in Health and Disease*, 16: 1–15
- Orlando A., Colombo M., Prosperi D., Gregori M., Panariti A., Rivolta I., Masserini M., Cazzaniga E. 2015. Iron oxide nanoparticles surface coating and cell uptake affect biocompatibility and inflammatory responses of endothelial cells and macrophages. *Journal of Nanoparticle Research*, 17: 1–13
- Pachetti M., Zupin L., Venturin I., Mitri E., Boscolo R., D'amico F., Vaccari L., Crovella S., Ricci G., Pascolo L. 2020. Ftir spectroscopy to reveal lipid and protein changes induced on sperm by capacitation: Bases for an improvement of sample selection in art. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 1–16
- Park S.E., Kim N.D., Yoo Y.H. 2004. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Research*, 64, 8: 2652-2655
- Partikel K., Korte R., Stein N.C., Mulac D., Herrmann F.C., Humpf H.U., Langer K. 2019. Effect of nanoparticle size and PEGylation on the protein corona of PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 141: 70–80

- Patil R.M., Thorat N.D., Shete P.B., Bedge P.A., Gavde S., Joshi M.G., Tofail S., Bohara R.A. 2018. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13: 63–72
- Paunovic J., Vucevic D., Radosavljevic T., Mandić-Rajčević S., Pantic I. 2020. Iron-based nanoparticles and their potential toxicity: Focus on oxidative stress and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 25, 316: e108935, doi: 10.1016/j.cbi.2019.108935: 4 str.
- Petan T. 2020. Lipid Droplets in Cancer. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, doi: 10.1007/112_2020_51: 34 str.
- Poller J.M., Zaloga J., Schreiber E., Unterweger H., Janko C., Radon P., Eberbeck D., Trahms L., Alexiou C., Friedrich R.P. 2017. Selection of potential iron oxide nanoparticles for breast cancer treatment based on *in vitro* cytotoxicity and cellular uptake. *International Journal of Nanomedicine*, 19, 12: 3207-3220
- Poller W.C., Pieber M., Boehm Sturm P., Ramberger E., Karamelas V., Möller K., Schleicher M., Wiekhorst F., Löwa N., Wagner S., Schnorr J., Taupitz M., Stangl K., Stangl V., Ludwig A. 2018. Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Long-term fate and metabolic processing in atherosclerotic mice. *Nanomedicine*, 14: 2575–2586
- Prakash Sharma V., Sharma U., Chattopadhyay M., Shukla V.N. 2018. Advance applications of nanomaterials: A review. *Materials Today: Proceedings*, 5: 6376–6380
- Sakai O., Yasuzawa T., Sumikawa Y., Ueta T., Imai H., Sawabe A., Ueshima S. 2017. Role of GPx4 in human vascular endothelial cells, and the compensatory activity of brown rice on GPx4 ablation condition. *Pathophysiology*, 24, 1: 9-15
- Sales-Campos H., Reis de Souza P., Crema Peghini B., Santana da Silva J., Ribeiro Cardoso C. 2013. An overview of the Modulatory Effects of oleic acid in health and disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13: 201–210
- Samrot A.V., Sahithya C.S., Selvarani A.J., Purayil S.K., Ponnaiah P. 2021. A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4: e100042, doi: 10.1016/j.crgsc.2020.100042: 13 str.
- Sanchez-Cano C., Carril M. 2020. Recent developments in the design of non-biofouling coatings for nanoparticles and surfaces. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 3: 1007, doi: 10.3390/ijms21031007: 24 str.
- Sargeant T.J., Lloyd-Lewis B., Resemann H.K., Ramos-Montoya A., Skepper J., Watson C.J. 2014. Stat3 controls cell death during mammary gland involution by regulating uptake of milk fat globules and lysosomal membrane permeabilization. *Nature Cell Biology*, 16: 1057–1068
- Shen Z., Liu T., Li Y., Lau J., Yang Z., Fan W., Zhou Z., Shi C., Ke C., Bregadze V.I., Mandal S.K., Liu Y., Li Z., Xue T., Zhu G., Munasinghe J., Niu G., Wu A., Chen X. 2018. Fenton-reaction-acceleratable magnetic nanoparticles for ferroptosis therapy of orthotopic brain tumors. *ACS Nano*, 12: 11355–11365
- Sherwood J., Lovas K., Rich M., Yin Q., Lackey K., Bolding M.S., Bao Y. 2016. Shape-dependent cellular behaviors and relaxivity of iron oxide-based T1 MRI contrast agents. *Nanoscale*, 8: 17506–17515
- Shin D.W. 2020. Lipophagy: molecular mechanisms and implications in metabolic disorders. *Molecules and Cells*, 43, 8: 686–693

- Stuart B.H. 2012. Infrared spectroscopy of biological applications: An overview. Encyclopedia of Analytical Chemistry, doi: 10.1002/9780470027318.a0208.pub2: 12 str.
- Su L., Han L., Ge F., Zhang S.L., Zhang Y., Zhao B.X., Zhao J., Miao J.Y. 2012. The effect of novel magnetic nanoparticles on vascular endothelial cell function *in vitro* and *in vivo*. Journal of Hazardous Materials, 236: 316–325
- Tadic M., Kralj S., Jagodic M., Hanzel D., Makovec D. 2014. Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment. Applied Surface Science, 322: 255–264
- Tang D., Chen X., Kang R., Kroemer G. 2020. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. Cellular Research, 31: 107–125
- Toropova Y.G., Golovkin A.S., Malashicheva A.B., Korolev D.V., Gorshkov A.N., Gareev K.G., Afonin M.V., Galagudza M.M. 2017. *In vitro* toxicity of FemOn, FemOn-SiO₂ composite, and SiO₂-FemOn core-shell magnetic nanoparticles. International Journal of Nanomedicine, 12: 593-603
- Vakili-Ghartavol R., Momtazi-Borojeni A.A., Vakili-Ghartavol Z., Aiyelabegan H.T., Jaafari M.R., Rezayat S.M., Arbabi Bidgoli S. 2020. Toxicity assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different tissues. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 48: 443–451
- Ventola C.L. 2017. Progress in nanomedicine: Approved and investigational nanodrugs. Physical Therapy, 42, 12: 742–755
- Vesterdal L.K., Danielsen P.H., Folkmann J.K., Jespersen L.F., Aguilar-Pelaez K., Roursgaard M., Loft S., Møller P. 2014. Accumulation of lipids and oxidatively damaged DNA in hepatocytes exposed to particles. Toxicology and Applied Pharmacology, 274: 350–360
- Waddington D.E.J., Boele T., Maschmeyer R., Kuncic Z., Rosen M.S. 2020. High-sensitivity *in vivo* contrast for ultra-low field magnetic resonance imaging using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Science Advances, 6: 998–1015
- Walther T.C., Farese R.V. 2009. The life of lipid droplets. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1791: 459–466
- Wang S., Luo J., Zhang Z., Dong D., Shen Y., Fang Y., Hu L., Liu M., Dai C., Peng S., Fang Z., Shang P. 2018. Iron and magnetic: new research direction of the ferroptosis-based cancer therapy. American Journal of Cancer Research, 8: 1933–1946
- Wei H., Hu Y., Wang J., Gao X., Qian X., Tang M. 2021. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, metabolism, and cellular behavior in biomedicine applications. International Journal of Nanomedicine, 16: 6097-6113
- Welte M.A. 2015. Expanding roles for lipid droplets. Current Biology, 25: 470–481
- Welte M.A., Gould A.P. 2017. Lipid droplet functions beyond energy storage. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1862: 1260–1272
- Wen T., Du L., Chen B., Yan D., Yang A., Liu J., Gu N., Meng J., Xu H. 2019. Iron oxide nanoparticles induce reversible endothelial-to-mesenchymal transition in vascular endothelial cells at acutely non-cytotoxic concentrations. Particle and Fibre Toxicology, 16: 1–13
- Wessler I., Kirkpatrick C.J. 2008. Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans. British Journal of Pharmacology, 154: 1558–1571
- Wu L., Wen W., Wang X., Huang D., Cao J., Qi X., Shen S. 2022. Ultrasmall iron oxide

- nanoparticles cause significant toxicity by specifically inducing acute oxidative stress to multiple organs. *Particle and Fibre Toxicology*, 19: 1–14
- Wu X., Tan Y., Mao H., Zhang M. 2010. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Nanomedicine*, 5: 385–399
- Xie J., Jiang H., Wan Y.H., Du A.Y., Guo K.J., Liu T., Ye W.Y., Niu X., Wu J., Dong X.Q., Zhang X.J. 2011. Induction of a 55 kDa acetylcholinesterase protein during apoptosis and its negative regulation by the Akt pathway. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3: 250–259
- Xu T., Ding W., Ji X., Ao X., Liu Y., Yu W., Wang J. 2019. Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23: 4900–4912
- Yamasaki M., Tachibana H., Yamada A., Ochi Y., Madhyastha H., Nishiyama K., Yamada K. 2008. Oleic acid prevents apoptotic cell death induced by trans10, cis12 isomer of conjugated linoleic acid via p38 MAP kinase dependent pathway. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 44: 290–294
- Yang H., Li J., Yang C., Liu H., Cao Y. 2019. Multi-walled carbon nanotubes promoted lipid accumulation in human aortic smooth muscle cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 374: 11–19
- Yang T., Chen J., Gao L., Huang Y., Liao G., Cao Y. 2020. Induction of lipid droplets in THP-1 macrophages by multi-walled carbon nanotubes in a diameter-dependent manner: A transcriptomic study. *Toxicology Letters*, 332: 65–73
- Yarjanli Z., Ghaedi K., Esmaeili A., Rahgozar S., Zarrabi A. 2017. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. *BMC Neuroscience*, 18: 1–12
- Zeng X., Zhu M., Liu X., Chen X., Yuan Y., Li L., Liu J., Lu Y., Cheng J., Chen Y. 2020. Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutrition & Metabolism*, 17: 1–14
- Zhang X.J., Yang L., Zhao Q., Caen J.P., He H.Y., Jin Q.H., Guo L.H., Alemany M., Zhang L.Y., Shi Y.F. 2002. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death & Differentiation*, 9, 8: 790-800
- Zhao Z., Ukidve A., Kim J., Mitragotri S. 2020. Targeting strategies for tissue-specific drug delivery. *Cell*, 181, 1: 151-167
- Zhu M.T., Wang Y., Feng W.Y., Wang B., Wang M., Ouyang H., Chai Z.F. 2010. Oxidative stress and apoptosis induced by iron oxide nanoparticles in cultured human umbilical endothelial cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10: 8584–8590