

Vijabilnost stanične linije HEK 293 u prisustvu radiolitički sintetiziranih nanočestica delta-FeOOH

Fratrić, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:111506>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Paula Fratrić

**Vijabilnost stanične linije HEK 293 u prisustvu radiolitički
sintetiziranih nanočestica δ -FeOOH**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je pod vodstvom dr. sc. Marijana Gotića i dr. sc. Inge Marijanović i predložen Biološkom odsjeku Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja magistra edukacije kemije i biologije.

Zahvale

Zahvaljujem mentorima dr. sc. Marijanu Gotiću i dr. sc. Ingi Marijanović na iskazanom povjerenju, predloženoj temi, stručnom vodstvu, uloženom vremenu i trudu te korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Iskrenu zahvalu upućujem dr. sc. Tanji Jurkin na razumijevanju, strpljenju, na nesebičnoj pomoći i sugestijama prilikom izrade i pisanja rada, ugodnoj radnoj atmosferi i susretljivosti.

Zahvaljujem Maji Pušić, mag. mol. biol., na uloženom trudu i pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada kao i korisnim savjetima pri pisanju.

Dr. sc. Goranu Dražiću s Kemijskog instituta u Ljubljani zahvaljujem na analizama sintetiziranog uzorka transmisijom elektronskom mikroskopijom atomske rezolucije.

Dipl. inž. Stanislavu Martinu zahvaljujem na mjerenju koncentracija nanočestica δ -FeOOH uređajem NanoSight NS300.

Svim kolegama i kolegicama te mojoj prijateljici Marti Jančec, hvala na pomoći i savjetima, ispijenim kavama, provodima, druženjima unutar i izvan faksa. Hvala im što su mi svojim prisustvom uljepšali i obogatili studentske dane.

Najveću zahvalu želim uputiti svojoj majci Zorici te sestri Ivani što su vjerovali u mene svih ovih godina i omogućili mi da ostvarim svoje ciljeve. Hvala im na neizmjerne podršci i ljubavi koju su mi pružali.

U Zagrebu, 2017. godine.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojoj majci Zorici.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Vijabilnost stanične linije HEK 293 u prisustvu radiolitički sintetiziranih nanočestica δ -FeOOH

Paula Fratrić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Magnetske nanočestice željezovih oksida (magnetske NČ) spadaju u važnu skupinu materijala s primjenom u katalizi i biomedicini. Magnetske NČ se koriste kao kontrastna sredstva u oslikavanju magnetskom rezonancijom, kao nosioci lijekova za njihovo kontrolirano otpuštanje i kao terapijska sredstva za uništavanje stanica raka postupkom hipertermije. δ -FeOOH je slabo kristalni materijal koji ima veliku specifičnu površinu, veliki broj hidroksilnih skupina i mnogo bolja adsorpcijska svojstva u odnosu na nanočestice magnetita i maghemita. Magnetske NČ δ -FeOOH nedavno su sintetizirane radiolitičkim postupkom, međutim citoksičnost tako sintetiziranih NČ δ -FeOOH do sada nije ispitivana. U ovom diplomskom radu magnetske NČ δ -FeOOH sintetizirane su γ -ozračivanjem (radiolitičkom sintezom). Sintetizirane NČ δ -FeOOH aplicirane su na embrionalne stanice bubrega čovjeka HEK 293, a vijabilnost stanica ispitana je testom MTT. Test MTT rađen je 24 sata i 48 sati nakon tretiranja HEK 293 stanica nanočesticama δ -FeOOH. Rezultati dobiveni invertnim mikroskopom pokazali su da nanočestice δ -FeOOH ulaze u stanice i da agregiraju unutar njih. Također, rezultati dobiveni invertnim mikroskopom u skladu su s rezultatima testa MTT, odnosno u oba slučaja HEK 293 stanice su pokazale dobru vijabilnost nakon izlaganja nanočesticama δ -FeOOH u koncentracijskom rasponu od $0,95 \times 10^{11}$ do $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹. Novi radiolitički način sinteze magnetskih NČ δ -FeOOH i potvrda njihove netoksičnosti snažan je poticaj za istraživanja njihove moguće primjene u biomedicini.

(40 stranice, 18 slika, 2 tablice, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: test MTT, nanočestice δ -FeOOH, vijabilnost, radiolitička sinteza

Voditelji: dr. sc. Marijan Gotić i dr. sc. Inga Marijanović

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Inga Marijanović

izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Viability of cell line HEK 293 in the presence of radiolytically synthesized δ -FeOOH nanoparticles

Paula Fratrić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Magnetic iron oxide nanoparticles (magnetic NPs) belong to an important group of materials with applications in catalysis and biomedicine. Magnetic NPs are used as contrast media in magnetic resonance imaging, as carriers of controlled release drugs, and as therapeutic agents for the eradication of cancer cells by hyperthermia. δ -FeOOH is a weak crystalline material having a large specific surface, a large number of hydroxyl groups, and much better adsorption properties than magnetite and maghemite NPs. Recently, δ -FeOOH NPs have been radiolytically synthesized, however, the cytotoxicity of thus synthesized δ -FeOOH NPs has not been investigated so far. In this graduate thesis the magnetic δ -FeOOH NPs were synthesized using γ -irradiation (radiolytical synthesis). Synthesized δ -FeOOH NPs were applied to human embryonic kidney cells HEK 293, and cell viability was tested for MTT. Cell monitoring was tested by MTT test for 24 hours and 48 hours after treatment with δ -FeOOH nanoparticles. The results obtained by an invert microscope showed that δ -FeOOH NPs entered and aggregated within the cells. Besides, the results obtained by the invert microscope are in accordance with the MTT test results, *i.e.* in both cases HEK 293 cells showed quite good viability after exposure to δ -FeOOH NPs at a concentration range of 0.95×10^{11} to 1.9×10^{12} NPs L⁻¹. The new radiolytical synthesis of δ -FeOOH NPs and their non-toxicity verification have shown that δ -FeOOH NPs possess great potential for use in biomedical applications.

(40 pages, 18 pictures, 2 tables, 43 references, original in: Croatian)

Keywords: MTT assay, δ -FeOOH nanoparticles, viability, radiolytic synthesis

Supervisors: dr. sc. Marijan Gotić i dr. sc. Ingi Marijanović

Reviewers: dr. Inga Marijanović, assistant professor

dr. Ines Radanović, associate professor

dr. Iva Juranović Cindrić, associate professor

Substitute: dr. Tomislav Jednačak, assistant professor

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Nanočestice željezovih oksida.....	2
1.2 Nanočestice δ -FeOOH.....	2
1.3 Utjecaj polimera na sintezu nanočestica željezovih oksida.....	3
1.4 Radiolitička sinteza nanočestica (γ -zračenjem).....	4
1.4.1 Osnovni pojmovi radijacijske kemije.....	4
1.4.2 Sinteza nanočestica γ -zračenjem.....	6
1.5 Primjena nanočestica.....	7
1.6 Cilj istraživanja.....	7
2. MATERIJALI I METODE.....	9
2.1 Materijali korišteni za sintezu nanočestica.....	9
2.2 Instrumenti i pribor korišteni za sintezu nanočestica.....	9
2.3 Sinteza nanočestica.....	9
2.4 Materijali korišteni za test vijabilnosti stanica i ispitivanje citotoksičnosti.....	11
2.5 Instrumenti i pribor korišteni za uzgoj HEK 293 stanica, test vijabilnosti i ispitivanje citotoksičnosti.....	12
2.6 Uzgoj stanične linije HEK 293.....	12
2.6.1 Određivanje broja vijabilnih stanica bojanjem tripanskim modrilom.....	13
2.6.2 Tretiranje stanica nanočesticama.....	14
2.7 Ispitivanje vijabilnosti stanica testom MTT i invertnim mikroskopom.....	15
2.8 Obrada podataka.....	17
3. REZULTATI.....	18
3.1 Mikrostrukturalna karakterizacija nanočestica δ -FeOOH.....	18
3.2 Vijabilnost stanične linije HEK 293 nakon izlaganja nanočesticama δ -FeOOH.....	22
3.3 Morfološke promjene na HEK 293 staničnoj liniji	
4. RASPRAVA.....	31
5. ZAKLJUČAK.....	37
6. LITERATURA.....	38

POPIS KRATICA

DEAE - dekstran – *engl. dietilaminoetil-dekstran hidroklorid*

DMEM medij - *engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - *engl. Dimethyl sulfoxide*

El. staklena tikvica - Erlenmayerova staklena tikvica

HEK 293 - *engl. human embrionic kidney cells 293*, epitelne stanice dobivene iz humanih embrionalnih stanica bubrega

ICDD - *engl. International Centre for Diffraction Data*

MTT - *engl. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*

NČ – nanočestice

NČŽO - Nanočestice željezovih oksida NČŽO

NPs – *engl. nanoparticles*

NTA – *engl. Nanoparticle Tracking Analysis*

PBS- *engl. Phosphate-buffered saline*

TEM - transmisijska elektronska mikroskopija

VTEM - visoko rezolucijska transmisijska elektronska mikroskopija

1. UVOD

Magnetske i superparamagnetske čestice željezovih oksida (magnetit i maghemit) imaju vrlo veliku primjenu kao senzori, u biomedicini kao kontrastna sredstva u magnetskom oslikavanju (MRI), za obilježavanje i separaciju stanica, imunološko određivanje, obnavljanje tkiva, za kontrolirano otpuštanje lijekova i kao terapijsko sredstvo za uništavanje stanica raka hipertermijom (Kandasamy i Maity, 2015.; Chagas i sur., 2013.; Pinto i sur., 2012.; De Jong i sur., 2008). Svojstva, funkcionalnost i toksičnost, a time i primjena NČ ovise o mnogim fizičko-kemijskim parametrima poput veličine, oblika, površinskog naboja, kemijskog sastava i magnetskih svojstava. Danas nanočestice privlače veliku pozornost upravo zbog njihovih jedinstvenih svojstava (Pallem i sur., 2009). Agregacija je ozbiljan problem u pripremi i skladištenju takvih magnetskih nanočestica znatno ograničavajući njihove praktične primjene (Carlson i sur., 2007). Ovaj problem se može riješiti površinskom modifikacijom nanočestica s organskim molekulama pripremom u prisutnosti površinski aktivnih liganada (Perez-Sanz i sur., 2006). Suprotno ostalim ferimagnetičnim željezovim oksidima, feroksihit može nastati na sobnoj temperaturi i kod atmosferskog tlaka (blagi uvjeti) i stoga ima veliku količinu površinskih hidroksilnih skupina lako dostupnih za ciljne izmjene (Dickson i sur., 2010). Štoviše, feroksihit posjeduje slojevitú strukturu, veliku specifičnu površinu i izražena adsorpcijska svojstva (J.-W. Yoo i sur., 2010). Feroksihit je također sudionik kompleksnih organsko-anorganskih procesa u biokemijskim sustavima (Tsung-Shune i sur., 1994). Prirodni polielektroliti, odnosno humusne tvari, predloženi su za kontrolu *in situ* rasta nanočestica feroksita koji utječu na veličinu i poboljšanje koloidne stabilnosti u vodenim otopinama s jakom ionskom jakošću (Carlson i sur., 1980). Svojstva, funkcionalnost i toksičnost, a time i primjena NČ ovise o mnogim fizičko-kemijskim parametrima poput veličine, oblika, površinskog naboja, kemijskog sastava i magnetskih svojstava. Biomedicinska primjena magnetskih NČ magnetita (Fe_3O_4) i maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) je često istraživana (Kandasamy i Maity, 2015.), dok biomedicinska primjena i citotoksičnost magnetskih nanočestica $\delta\text{-FeOOH}$ gotovo da nije istraživana (Polyakov i sur., 2012., Chagas i sur., 2013.). $\delta\text{-FeOOH}$ je slabo kristalni materijal koji ima veliku specifičnu površinu, veliki broj hidroksilnih skupina i mnogo bolja adsorpcijska svojstva u odnosu na nanočestice magnetita i maghemita (Chagas i sur., 2013.; Pinto i sur., 2012.; Koch i sur., 1995.). U ovom diplomskom radu magnetske NČ $\delta\text{-FeOOH}$ sintetizirane su γ -ozračivanjem (radiolitičkom sintezom). Sintetizirane magnetske NČ $\delta\text{-FeOOH}$ aplicirane su na embrionalne stanice bubrega čovjeka HEK 293 (*engl. human embryonic kidney cells 293*), a vijabilnost stanica ispitivala se testom MTT.

1.1 Nanočestice željezovih oksida

Nanočestice željezovih oksida (NČŽO) zajednički su naziv za nanočestice željezovih oksida, oksihidroksida i hidroksida. NČŽO se nalaze u prirodi, a mogu se sintetizirati i u laboratoriju (Cornell i Schwertmann, 2014). NČŽO se koriste kao pigmenti, katalizatori, senzori, adsorbensi i materijali za magnetsko zapisivanje podataka. NČŽO se često koriste kao modelni sustavi u površinskoj i koloidnoj kemiji (Cornell i Schwertmann, 2014). Mineraloški nazivi i kemijske formule najčešće upotrebljivanih nanočestica željezovih oksida i oksihidroksida dani su u Tablici 1. Nanočestice magnetita (Fe_3O_4) i maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) moguće je privući permanentnim magnetom, odnosno te NČ posjeduju magnetska svojstva kod sobne temperature. NČ oksihidroksida (getita, akaganita i lepidokrokita) nisu magnetske, osim NČ $\delta\text{-FeOOH}$ koje se poput magnetita i maghemita mogu privući magnetom kod sobne temperature.

Tablica 1. Nazivi i kemijske formule odabranih nanočestica željezovih oksida i oksihidroksida.

Oksihidroksidi i hidroksidi	Oksidi
Getit, $\alpha\text{-FeOOH}$	Hematit, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Lepidokrokit, $\gamma\text{-FeOOH}$	Magnetit, Fe_3O_4
Akaganeit, $\beta\text{-FeOOH}$	Maghemit, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
$\delta\text{-FeOOH}$	
Feroksihit, $\delta'\text{-FeOOH}$	
Ferihidrit, $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	
Bernalit, $\text{Fe}(\text{OH})_3$	
Željezov(II) hidroksid, $\text{Fe}(\text{OH})_2$	

1.2 Nanočestice δ -FeOOH

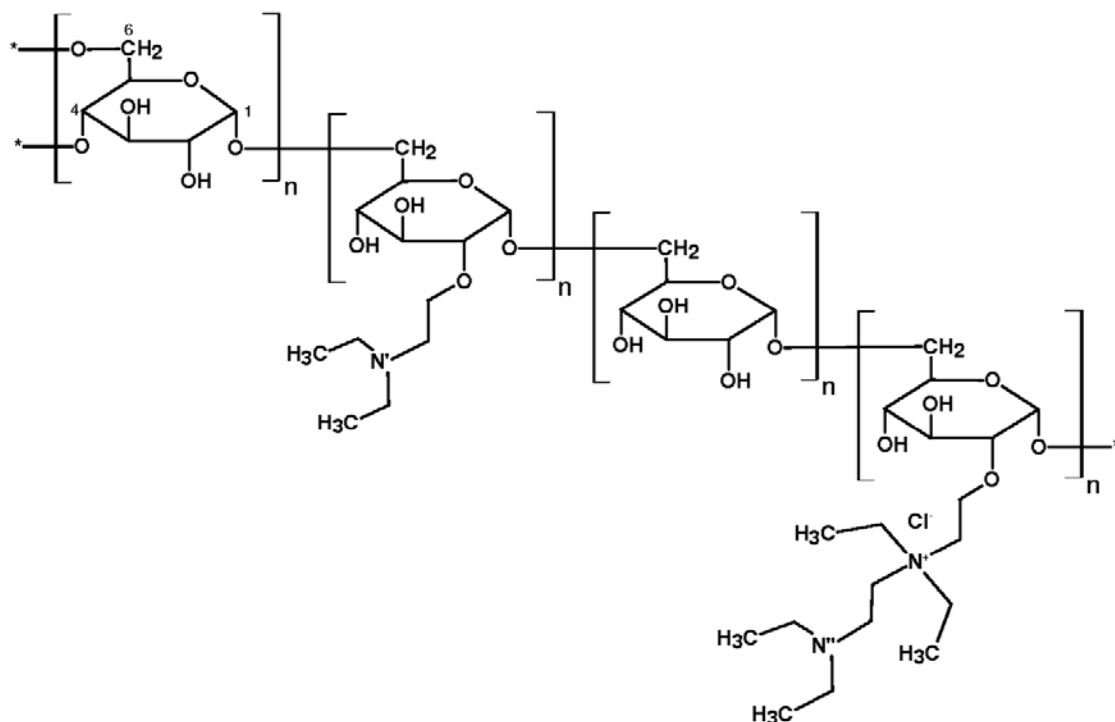
Magnetske nanočestice se koriste kao senzori, kontrastno sredstvo u magnetskom oslikavanju, za kontrolirano otpuštanje lijekova i kao terapijsko sredstvo za uništavanje stanica raka hipertermijom. Superparamagnetske nanočestice se mogu koristiti kao kontrastni agens u magnetskoj rezonanciji za dijagnozu bolesti i praćenje liječenja. Biomedicinska primjena magnetskih NČ magnetita (Fe_3O_4) i maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) je često istraživana, dok je biomedicinska primjena i citotoksičnost magnetskih nanočestica $\delta\text{-FeOOH}$ znatno manje istraživana. $\delta\text{-FeOOH}$ je slabo kristalni materijal koji ima veliku specifičnu površinu, veliki broj hidroksilnih skupina i mnogo bolja adsorpcijska svojstva u odnosu na nanočestice magnetita i maghemita.

Strukturni model $\delta\text{-FeOOH}$ ima heksagonalnu jediničnu ćeliju. Prema tom modelu Fe^{3+} ioni zauzimaju 40% oktaedarskih 5% tetraedarskih položaja. Pretpostavljeno je da prisutnost kationa u tetraedarskim položajima uzrokuje feromagnetična svojstva $\delta\text{-FeOOH}$ (Francombe i Rooksby, 1962).

Nanostrukturne čestice $\delta\text{-FeOOH}$ se mogu upotrebljavati kao fotokatalizator za proizvodnju vodika iz vode. $\delta\text{-FeOOH}$ ima mnoge prednosti za razlaganje vode na vodik i kisik, npr. veliku površinu, malu veličinu čestica. NČ $\delta\text{-FeOOH}$ je lako dispergirati u vodi čime se povećava fotolitička učinkovitost (Pereira i sur., 2011). Nanočestice $\delta\text{-FeOOH}$ su se koristile kao heterogeni katalizator kako bi se stimulirala degradacija organskih zagađivala kao što su kationska (metilen modro) i anionska boja (indigo karmin). Pokazano je da $\delta\text{-FeOOH}$ može aktivirati H_2O_2 da proizvede reaktivne radikale koji dalje potiču degradaciju organskih boja (Pinto i sur., 2012).

1.3 Utjecaj polimera na sintezu nanočestica željezovih oksida

Općenito, korištenje polimera ili surfaktanta utječe na veličinu i morfologiju nanočestica, njihovu stabilnost i disperzivnost. U ovom radu željezov(III) prekursor je ozračen γ -zrakama dietilaminoetil-dekstran hidroklorida (DEAE-dekstran) (Slika 1). DEAE-dekstran je amino-dekstran (polisaharidni polimer) posebno dizajniran za biomedicinske primjene i što je još važnije pogoduje nastajanju potpuno stabilnih monodisperznih nanočestica u vodenom mediju. DEAE-dekstran je hidrofilni polimer s amino skupinama koje su slobodne za dodatnu funkcionalizaciju. To je visoko biokompatibilni materijal koji se upotrebljava kao pomoćno sredstvo u cjepivima i kao stabilizator proteina.



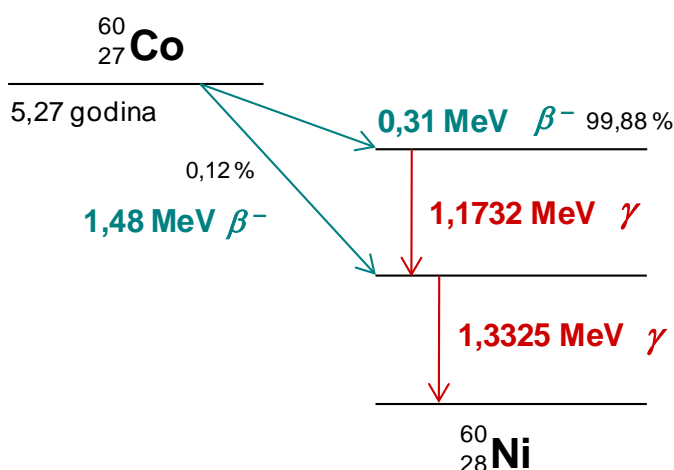
Slika 1. Kemijska struktura polimera dietilaminoetil-dekstran hidroklorida (DEAE-dekstran hidroklorid).

1.4 Radiolitička sinteza nanočestica (γ -zračenjem)

1.4.1 Osnovni pojmovi radijacijske kemije

γ -zračenje je elektromagnetsko zračenje (bez mase, naboja) velike energije (keV – MeV). Emitira ga radioaktivna jezgra, odnosno nastaje deekscitacijom pobuđene jezgre tijekom α - ili β -raspada (nuklearnih raspada). U radijacijskoj tehnologiji i za istraživanja najčešće se koriste γ -zrake radioaktivnog nuklida ^{60}Co , srednje energije 1,25 MeV (Slika 2). Vrijeme poluraspada ^{60}Co je 5,27 godina. Zbog svoje vrlo velike energije i iz razloga što je riječ o zračenju bez mase i naboja γ -zrake imaju vrlo veliku prodornost (domet). γ -zračenje je ionizirajuće zračenje, jer uzrokuje ionizaciju tvari i molekula kroz koje prolazi. Većina fotona prolazi kroz tvar bez promjene stanja, ali dio fotona u međudjelovanju s elektronima, protonima ili električkim poljem jezgre gubi energiju (energija se apsorbira ili rasprši). Apsorpcijom fotona (zračenja) dolazi do ionizacije tvari kroz koju ono prolazi

(oslobađanja elektrona). U tvari (molekulama) dolazi do kidanja kemijskih veza i stvaranja iona, radikala i stabilnih produkata. Slobodni radikali, fragmenti molekula sa jednim ili više elektrona nesparenih spinova, uzrokuju daljnje kemijske reakcije i glavni su nosioci radijacijsko-kemijskih promjena. Promjene na molekularnoj razini imaju onda fizičke, kemijske i biološke posljedice.



Slika 2. Shema radioaktivnog raspada ^{60}Co . Vrijeme poluraspada ^{60}Co je 5,27 godina.

Apsorbirana doza, D , ionizirajućeg zračenja definira se kao količina energije bilo koje vrste ionizirajućeg zračenja predana materiji, odnosno količina energije apsorbirana po jedinici mase

$$D = d\bar{E}/dm$$

gdje je \bar{E} prosječna energija predana materiji mase dm . Odnosno, D predstavlja energiju po jedinici mase koja ostaje u materiji i stvara efekte koji se pripisuju zračenju. Jedinica za apsorbiranu dozu je gray, $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$.

Brzina (apsorbirane) doze, \dot{D} , ionizirajućeg zračenja definirana je kao povećanje apsorbirane doze po jedinici vremena, odnosno promjena apsorbirane doze u vremenu,

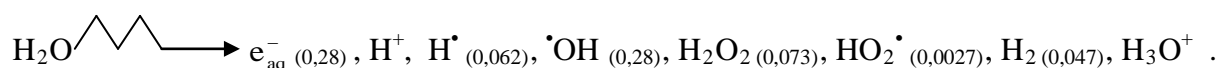
$$\dot{D} = dD/dt .$$

Jedinica za brzinu apsorbirane doze je $\text{Gy s}^{-1} = \text{J kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Brzina doze ovisi o jačini polja zračenja, odnosno o aktivnosti izvora (broj raspada u vremenu). Brzina doze se smanjuje s udaljenošću od izvora zračenja. Broj nastalih iona i radikala direktno je proporcionalan brzini doze.

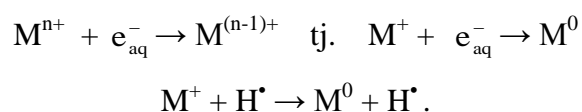
1.4.2 Sinteza nanočestica γ -zračenjem

Sinteza γ -zračenjem (ionizirajućim zračenjem) je relativno nov postupak pripreme nanokristalnih metala, legura, nanokompozita, čestica metalnih sulfida i metalnih oksida. γ -ozračivanje je moćna metoda za sintezu nanočestica kontrolirane veličine i oblika u otopini kao i u heterogenom mediju poput hidrogela. Prednost γ -ozračivanja je dobra kontrola redukcijskih uvjeta, odnosno solvatizirani elektroni i razni radikali koji mogu reducirati metalne ione zbog velike prodornosti zračenja (velika energija) nastaju homogeno u cijelom volumenu uzorka. Na taj način nema potrebe za dodatnim inicijatorom i redukcijskim sredstvom, a također nema i kontaminacije uzorka; nastali radikali su potpuno „čista” redukcijska sredstva sa stajališta zelene kemije. Osim toga, sinteza je moguća na sobnoj temperaturi i pod atmosferskim tlakom (u uobičajenim sintezama često su potrebne visoke temperature i tlakovi), a eksperimentalne uvjete je moguće dobro kontrolirati uvjetima ozračivanja (doza, brzina doze, atmosfera).

Jedan od načina sinteze čestica metala i metalnih oksida je ozračivanje vodene otopine njihovih soli. Osnovni princip sinteze nanočestica radiolizom u vodenoj otopini soli metala je indirektnim djelovanjem zračenja, odnosno redukcijom soli metala preko produkata radiolize vode. Djelovanjem zračenja na vodene otopine dolazi do radiolize vode:

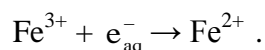


Nastali hidratizirani elektron, e_{aq}^- , i proton radikal, H^\bullet , su jaka redukcijska sredstva koja mogu reducirati katione metala:



Redukcija se u većoj mjeri odvija preko hidratiziranog elektrona.

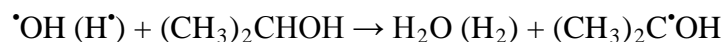
U slučaju Fe^{3+} :



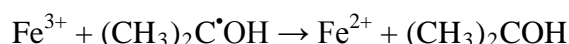
Hidroksilni radikal, $\cdot\text{OH}$, (kao i perhidroksilni radikal, $\text{HO}_2\cdot$) nastao radiolizom vode je dobar oksidans:



Kako bi se osigurali bolji reduksijski uvjeti u otopinu se dodaju alkoholi poput 2-propanola i tert-butanola koji su „hvatači“ (eng. *scavenger*) hidroksilnih radikala. Oni također „hvataju“ i proton radikale:



Nastali radikal $(\text{CH}_3)_2\text{C}^{\bullet}\text{OH}$ je također reduksijsko sredstvo koji može reducirati ione metala:



1.5 Nanočestice i vijabilnost stanica

Vijabilnost stanica može se prati kolorimetrijskom metodom MTT (*engl. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*) koja se temelji na mjerenju metaboličke aktivnosti stanica nakon izlaganja kemijskim spojevima ili nanočesticama. U živim stanicama dolazi do redukcije tetrazolijeve soli (MTT) u plavo obojene kristale formazana pomoću staničnih dehidrogenaza. Pored MTT-a postoje i topive tetrazolijeve soli XTT i WST-1, koje se također koriste u iste svrhe, a dostupne su u obliku komercijalnih kompleta.

Test MTT se obično koristi za proučavanje toksičnosti lijekova u staničnim linijama raka (Buch i sur., 2012). Kolorimetrijska je analiza temeljena na formiranju tamne formazanske boje redukcijom tetrazolijeve soli MTT metaboliziranih aktivnih stanica.

1.6 Cilj istraživanja

Područje nanočestica i nanomaterijala zadnjih nekoliko godina je rastuće područje istraživanja i spada u prioritetna područja istraživanja kako u Hrvatskoj tako i u svijetu. Svojstva, funkcionalnost i

toksičnost, a time i primjena NČ ovise o mnogim fizičko-kemijskim parametrima poput veličine, oblika, površinskog naboja, kemijskog sastava i magnetskih svojstava. Magnetske nanočestice δ -FeOOH imaju veliku specifičnu površinu, veliki broj hidroksilnih skupina i mnogo bolja adsorpcijska svojstava u odnosu na nanočestice magnetita i maghemita. Međutim dok je toksičnost nanočestica magnetita i maghemita intenzivno istražena, za nanočestice δ -FeOOH gotovo da nema podataka. Ispitivanje vijabilnosti stanica testom MTT u prisustvu radiolitički sintetiziranih nanočestica δ -FeOOH važan je prvi korak za njihovu potencijalnu biomedicinsku primjenu. Pored toga u ovom diplomskom radu nanočestice δ -FeOOH sintetizirane su originalnom metodom, odnosno radiolitičkim postupkom.

Glavni cilj ovog diplomskog rada je pokazati da radiolitički sintetizirane magnetske nanočestice δ -FeOOH nisu toksične za stanice i da bi zbog toga mogle primjenjivati u biomedicini.

Specifični ciljevi ovog diplomskog rada su: *(i)* radiolitički sintetizirati magnetske nanočestice δ -FeOOH, *(ii)* mikrostrukturno karakterizirati sintetizirane nanočestice i *(iii)* odrediti vijabilnost stanica HEK 293 kolorimetrijskim testom MTT nakon izlaganja stanica sa sintetiziranim magnetskim nanočesticama δ -FeOOH.

2. MATERIJALI I METODE

2.1 Materijali korišteni za sintezu nanočestica

Sve korištene kemikalije su bile analitičke čistoće. Željezov(III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), čistoće puriss. p.a. Reag.Ph.Eur. $\geq 99\%$, je od proizvođača Sigma-Aldrich. Natrijev hidroksid (NaOH), čistoće p.a. $>98\%$, i 2-propanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) p.a. od Kemike (Zagreb). Dietilaminoetil-dekstran hidroklorid (DEAE-dekstran hidroklorid), skraćeno dalje u tekstu DEAE-dekstran, proizveden iz dekstrana prosječne molekulske mase $M = 500.000$, a nabavljen je od proizvođača Sigma-Aldrich. Kemijska struktura DEAE-dekstran hidroklorida prikazana je na Slici 1. Za sve eksperimente korištena je Mili-Q deionizirana voda.

2.2. Instrumenti i pribor korišteni za sintezu nanočestica

- Laboratorijsko posuđe: Erlenmayerova tikvica od 250 mL, čaša od 25 ml, staklena posudica, stakleni štapić, pipeta
- pH indikatorske trakice
- Transmisijski elektronski mikroskop atomske rezolucije, model ARM200 CF, JEOL koji se nalazi na Kemijskom institutu u Ljubljani na Zavodu za kemiju materijala
- panoramski ^{60}Co izvor γ -zraka u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta "Ruđer Bošković".
- Rentgenski difraktometar praha Ital Structures APD 2000 na Institutu „Ruđer Bošković“.
- Za određivanje koncentracije nanočestica u suspenziji korišten je NanoSight NS300, Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), proizvođača Malvern.

2.3. Sinteza nanočestica

Pripravljene su sljedeće standardne vodene otopine: vodena otopina DEAE-dekstran hidroklorida masenog udjela 1,85 %, 2 M vodena otopina željezovog(III) klorid heksahidrata te 2 M vodena otopina NaOH. Zatim se odmjeri 1,232 ml 2 M FeCl_3 i 140 ml 1,85 % DEAE-dekstrana i dobro promiješa u Erlenmayerovoj staklenoj tikvici od 300 mL. Kako bi se osigurali bolji redukcijски uvjeti tijekom ozračivanja u tu otopinu dodano je 2,156 ml 2-propanola, pH otopine podešen je na 9 koristeći 2 M NaOH. pH je mjeren pH papirom s četiri indikatorske trakice (pH-Fix 0-14, proizvođač MACHEREY-NAGEL) i pH metrom (METTLER TOLEDO Seven Easy). Otopina je prije ozračivanja propuhivana 30 min dušikom čistoće 99,999 % kako bi se iz vodene otopine istjerao

otopljeni kisik i postigla inertna atmosfera. Nakon propuhivanja, tikvica se brzo zatvori s staklenim čepom i zabrtvi parafilmom. Tako zatvorena koloidna otopina je ozračena u panoramskom ^{60}Co izvoru γ -zraka u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta "Ruđer Bošković" (Slika 2). Tikvica s koloidnom otopinom uzorka je zračena u centru izvora brzinom doze $\sim 32 \text{ kGy h}^{-1}$ dok je apsorbirana doza bila 113 kGy.

Nakon zračenja dobivena je izuzetno stabilna sivo-bijelo-zelenkasta suspenzija koja nakon otvaranja tikvice i ulaska kisika naglo promijeni boju u zelenkasto-plavo-smeđu. Kako bi se izolirao talog, suspenzija je centrifugirana na 20 000 rpm i talog ispiran dva puta s MQ- H_2O i jedanput s etanolom uz naknadno centrifugiranje. Izolirani talog je crveno-smeđe boje i magnetičan je. Korištena je centrifuga velike brzine, model ScanSpeed 2236R High-Speed Centrifuge, *LaboGene*. Talog je sušen preko noći u vakuum sušioniku na sobnoj temperaturi.

Za strukturnu karakterizaciju uzoraka korišten je rentgenski difraktometar praha APD 2000, proizvođača *ItalStructures*, Riva Del Garda, Italija, na Institutu „Ruđer Bošković“. Difraktometar je namijenjen praškastim uzorcima i koristi $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54059 \text{ \AA}$) zračenje. Snimano je na 40 kV i 30 mA, uz grafitni monokromator i NaI-Tl detektor. Rendgenski difraktogrami su snimljeni u području od $10\text{--}120^\circ$ s korakom od 0.03° i zadržavanje od 23 sekunde po koraku pri 20°C . Uzorci su stavljeni u tankom sloju na silicijsku pločicu koja ne pokazuje maksimum u rendgenskom difraktogramu.

Transmisijski elektronski mikroskop atomske rezolucije, model ARM200 CF, JEOL koji se nalazi na Kemijskom institutu u Ljubljani na Zavodu za kemiju materijala korišten je za mikrostrukturnu karakterizaciju sintetiziranog uzoraka. Uzorak je nanošen na bakrene mrežicu i nakon toga dodatno osušen prije same analize u vakuum sušioniku prilagođenom nosaču uzoraka za ARM (engl. Atomic Resolution Microscope).

U ovom diplomskom radu koncentracija NČ je određena uređajem NanoSight NS300, Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), proizvođača Malvern. NanoSight NS300 uređaj je u mogućnosti vizualizirati i odrediti veličinu i koncentraciju nanočestica u razrijeđenoj suspenziji. Dakle, takav uređaj služi za određivanje distribucije veličine (nano)čestica, koncentracije, kao i vizualizaciju nanočestica u suspenzijama i koloidnim sustavima. Malvern NanoSight koristi analzu praćenja nanočestica (engl. *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)) za karakterizaciju čestica u rasponu od 10 nm do 2000 nm (ovisno o prirodi uzorka) u razrijeđenoj suspenziji. Svaka čestica je individualno analizirana izravnim promatranjem i mjerenjem difuzijskih događaja.

Sinteza i karakterizacija nanočestica napravljene su u Laboratoriju za sintezu novih materijala na Institutu „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, dok su biološki eksperimenti napravljeni na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

2.4. Materijali korišteni za test vijabilnosti stanica i ispitivanje citotoksičnosti

Za ispitivanje vijabilnosti stanica i ispitivanje toksičnog efekta korištena je stanična linija HEK 293, stanice se uzgajaju u DMEM mediju (*engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, *engl. Fetal bovine serum*, Life Technologies, Carlsbad, SAD), 5% penicilina i streptomicina, (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), pri 37 °C uz 5% CO₂ i 95% zraka.

Stanice se ispiru fosfatnim puferom, PBS (*engl. Phosphate-buffered saline*, PBS, 18912014, PBS Tablets, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, SAD).

DMSO (*engl. Dimethyl sulfoxide*, BioUltra, for molecular biology, ≥99, 5% (GC)), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Presadivanje stanica radi se pomoću tripsin-EDTA otopine (*engl. Trypsin-EDTA*, T 4049, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD).

Za određivanje broja vijabilnih stanica koristilo se tripansko modriilo (*engl. Trypan blue*, solution 0,5%, Biological Industries, SAD).

MTT (*engl. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*, M2128), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

2.5. Instrumenti i pribor korišteni za uzgoj HEK 293 stanica, test vijabilnosti i ispitivanje citotoksičnosti

- Mikrotitarski čitač, GloMax-Multi Detection System, Promega
- Inkubator (CO₂ Incubator, MCO-230AICUV), Panasonic
- Pipete, Eppendorf Research
- Multipipeta, TreffLab Treff-Pipette-8 Channel Pipette, American Laboratory Trading
- Laminar, Heraeus
- Invertni mikroskop, Axiovert 40 CFL, Zeiss

- Ploče s 6 jažica (*engl. Multiwell 6 Well*), Falcon
- Mikrotitarske ploče s 96 jažica (*engl. Microtest 96-Well*, Microtest III Tissue Culture Plate 96-Well), Falcon
- Petrijeva posuda (TC-Schale 100, Standard), Sarstedt
- Električni uređaj za pipetiranje, Falcon
- Pipete za električni uređaj za pipetiranje (5 mL, 10 mL, 25 mL), Falcon
- Flask (Tissue Culture Treated Flasks), Falcon
- Bürker-Türk-ova komoricaza brojanje stanica
- Centrifuga, ScanSpeed 2236R High-Speed Centrifuge, LaboGene

2.6. Uzgoj stanične linije HEK 293

Smrznute HEK 293 stanice prenesene su iz zamrzivača u vodenu kupelj na 37 °C. Nakon što su se otopile, cijeli volumen (5 mL) je dodan u 10 ml medija za rast HEK 293 stanica u Petrijevu posudu. HEK 293 stanice uzgajane su u DMEM mediju (*engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Medij je nadopunjen s 10% fetalnog goveđeg seruma i 1% penicilin-streptomicina. Stanice su održavane u kulturi u inkubatoru 2 dana na 37 °C s 5% CO₂ i 95% zrakom (Slika 3).

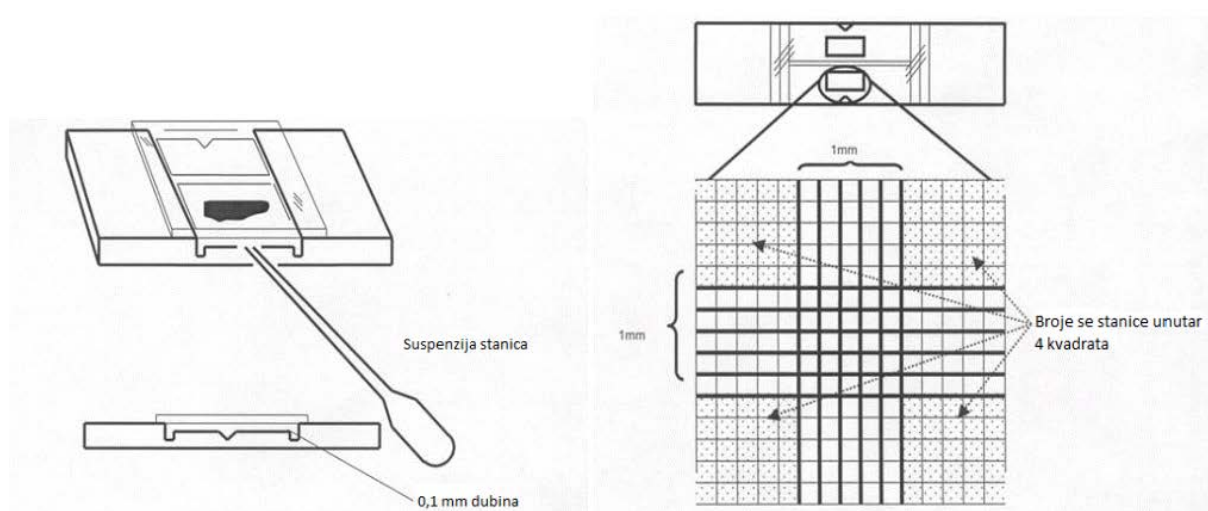


Slika 3. Prikaz inkubatora gdje su stanice održavane na 37 °C s 5% CO₂ i 95% zrakom

Nakon uklanjanja starog medija dodano je 10 ml sterilnog PBS-a. 1 mL otopine tripsin-EDTA je dodan direktno na stanice te ostavljen da djeluje 1-2 minute u inkubatoru, dok se stanice nisu odvojile od podloge. Čim su se stanice počele odvajati dodano je 5 mL istoga medija. Stanice su resuspendirane i prebačene u tubicu ependorf od 15 mL. Nakon dodatka medija stanice su centrifugirane 5 min pri 7000 RPM, 8 minuta (ScanSpeed 2236R High-Speed Centrifuge, LaboGene). Potom je sav medij uklonjen te su stanice resuspendirane u 2 ml medija.

2.6.1. Određivanje broja vijabilnih stanica bojanjem tripanskim modrilom

Ukupan broj stanica određuje se brojanjem stanica uz dodatak boje tripansko modrilo (0,4% m/v), koja omogućuje razlikovanje mrtvih, plavih stanica od živih stanica koje ostaju nebojane i svjetlije. Stanice se pripreme za brojanje tako da se najprije ukloni hranjivi medij i zatim doda potreban volumen otopine tripsina koji odvaja stanice od podloge. Stanice se vrate natrag u inkubator na oko 5 min kako bi tripsin djelovao, a onda se pod inverznim mikroskopom pogleda jesu li se stanice zaokružile i odvojile od površine. Nakon toga, dodaje se određen volumen medija sa serumom, koji je jednak volumenu tripsina, kako bi se zaustavilo njegovo daljnje djelovanje na stanice. Stanice se resuspendiraju te se uzme 20 μL suspenzije stanica i pomiješa se s 20 μL boje tripan-plavo. Zatim se s 20 μL tako pripremljene suspenzije napuni Bürker-Türk komorica za brojanje se stanice broje na invertnom mikroskopu (Slika 4).



Slika 4. Bürker-Türk komorica. (<http://fir.vef.unizg.hr/wp-uploads/2012/10/Brojenje-leukocita-2.-dio.pdf>).

2.6.2 Tretiranje stanica nanočesticama

U bunariće pločice (*engl. Falcon- Microtest III Tissue Culture Plate 96 Well*) nasađeno je 2000 stanica po bunariću u 200 μL medija te su stavljene na inkubaciju na 1 dan na 37 °C pri 5% CO_2 . Idućeg dana je odstranjen medij. Dodano je 200 μL novog medija te su nanosene nanočestice $\delta\text{-FeOOH}$ (feroksihit) na pločice sa 96 bunarića i stanice su inkubirane još 1 dan. Svi uzorci su

dodani u triplikatima. Na isti način su pripremljene još dvije pločice, samo bez stanica, tzv. „blank“ pločice (slijepa proba).

Nanočestice δ -FeOOH ($m= 0.0224$ g) dispergirane su u 10 mL MQ-H₂O, tako da je masena koncentracije NČ δ -FeOOH bila 2,24 g L⁻¹. U 10 mL te suspenzije dodano je 1000 μ L MQ-H₂O i zatim je izmjerena koncentracija NČ. Kod takvog razrjeđenja koncentracija NČ je bila $1,88 \times 10^8$ NČ/ml, odnosno ima koncentraciju nanočestica od $1,90 \times 10^{13}$ NČ L⁻¹. Prije svakog apliciranja nanočestica na stanice, tako pripravljena suspenzija je dispergirana na vorteksu. Stanice su tretirane sljedećim koncentracijama: $0,95 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹, $2,85 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹, $4,75 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹, $9,5 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹, $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹ (Tablica 2). Stanice su tretirane u triplikatima, a svaki triplikat imao je svoju slijepu probu (blank).

Tablica 2. Prikaz vrijednosti masenih koncentracija nanočestica korištenih za tretiranje stanica.

Dodani volumen	Masena koncentracija (g L ⁻¹)	Koncentracija nanočestica (NČ L ⁻¹)
$V(\delta\text{-FeOOH})= 1 \mu \text{ L}^{-1}$	$\gamma=1,12 \times 10^{-2}$	$0,95 \times 10^{11}$
$V(\delta\text{-FeOOH})= 3 \mu \text{ L}^{-1}$	$\gamma= 3,36 \times 10^{-2}$	$2,85 \times 10^{11}$
$V(\delta\text{-FeOOH})= 5 \mu \text{ L}^{-1}$	$\gamma=5,60 \times 10^{-2}$	$4,75 \times 10^{11}$
$V(\delta\text{-FeOOH})= 10 \mu \text{ L}^{-1}$	$\gamma=1,12 \times 10^{-1}$	$9,5 \times 10^{11}$
$V(\delta\text{-FeOOH})= 20 \mu \text{ L}^{-1}$	$\gamma=2.24 \times 10^{-1}$	$1,9 \times 10^{12}$

2.7 Ispitivanje vijabilnosti stanica testom MTT i invertnim mikroskopom

Test MTT metoda je za kvantitativno određivanje stanične proliferacije, odnosno kvantifikacije antiproliferativnog ili citotoksičnog djelovanja testiranih spojeva na stanice (Mickisch

i sur., 1990). Test se zasniva na nastanku ljubičastih kristala formazana, koji nastaju cijepanjem žute tetrazolijeve MTT soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid) pomoću mitohondrijskog enzima dehidrogenaze živih stanica. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica i očitava se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 570 nm pomoću mikročitača.

Nakon inkubacije 24 sata i 48 sati sa nanočesticama δ -FeOOH prema Tablici 2, MTT otopina je razrijeđena zagrijanim medijem u vodenoj kupelji u omjeru 1:10. Svakom bunariću na jednoj pločici sa stanicama i na jednoj pločici sa slijepom probom je dodano 40 μ L razrijeđenog MTT reagensa te je pločica vraćena u inkubator na 2 i pol sata. Nakon 2 i pol sata u obje pločice je dodano 170 μ L DMSO. Pločice su ostavljene na sobnoj temperaturi 10 minuta i nakon toga je izvršena detekcija na mikrotitarskom čitaču pločica.

Preživljenje testiranih stanica se izračunava kao postotak u odnosu na kontrolu:

$$\text{PREŽIVLJENJE (\%)} = (\Delta T - \Delta B / \Delta K - \Delta B) \times 100$$

ΔT = srednja vrijednost apsorbancije tretiranih stanica

ΔK = srednja vrijednost apsorbancije kontrole

ΔB = srednja vrijednost apsorbancije slijepa proba

Da bi se utvrdile morfološke promjene na stanicama HEK 293 izloženim nanočesticama δ -FeOOH, promatrane su pomoću invertnog mikroskopa Axiovert 40 CFL, povezanog sa računalom i softverom koji omogućuje snimanje i obradu slike. Stanice su nasadene u koncentraciji 1×10^5 st/mL, na ploču sa 6 bunarića koja je potom inkubirana kroz 24 sata i 48 sati u inkubatoru pri 37 °C i 5 % CO₂. Sljedeći dan su dodane koncentracije nanočestica prema Tablici 2. Kao kontrola korištene su netretirane stanice. Stanice su promatrane nakon 24 i 48 sati od dodavanja čestica.

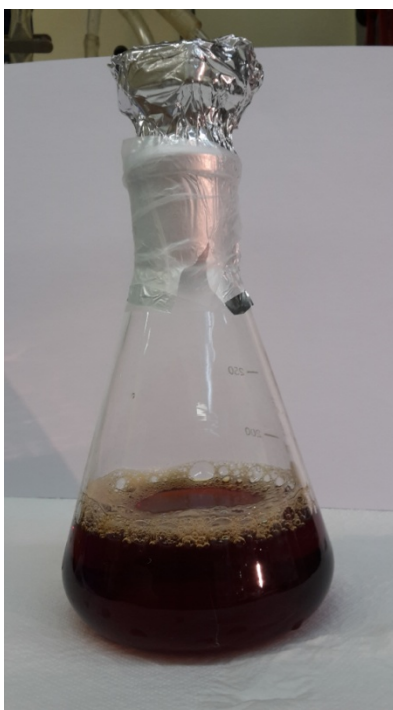
2.8 Obrada podataka

Rezultati istraživanja određeni su pomoću Microsoft Office Excel 2007. Rezultati istraživanja prezentirani su pomoću grafova uz raspravu i odgovarajuće zaključivanje o istraživanim pojmovima. Od statističkih parametara prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija ($\bar{X} \pm SD$). Statistički značajan utjecaj koncentracije smatran je onaj kod kojeg je izračunata vrijednost P bila manja od 0,05 ($P < 0,05$).

3. REZULTATI

3.1 Mikrostrukturalna karakterizacija nanočestica δ -FeOOH

U ovom radu pomiješano je 140 ml 1,85 % DEAE vodene otopine DEAE-dekstran hidroklorida i 1,232 ml 2 M vodena željezovog(III) klorid heksahidrata. Kako bi se osigurali bolji redukcijski uvjeti prilikom ozračivanja u tu otopinu dodano je 2,156 ml 2-propanola, a pH otopine podešen je na 9 koristeći 2 M NaOH. Takva otopina propuhivana je plinovitim dušikom da bi se iz otopine istjerao otopljeni kisik, i zatim je takva otopina (Slika 5) ozračena u izvoru γ -zraka s brzinom doze od 32 kGy h^{-1} . Ukupna apsorbirana doza iznosila je 113 kGy.



Slika 5. Prikaz crveno-smeđe prekursorske otopine prije zračenja. Pripravljena vodena otopina sadrži 1,232 ml 2 M FeCl_3 i 140 ml 1,85 % DEAE-dekstrana. Kako bi se osigurali bolji redukcijski uvjeti prilikom ozračivanja u tu otopinu dodano je 2,156 ml 2-propanola. pH otopine podešen je na 9 koristeći 2 M NaOH.

Nakon zračenja dobivena je stabilna zelenkasto-plavo-smeđa suspenzija (Slika 6).



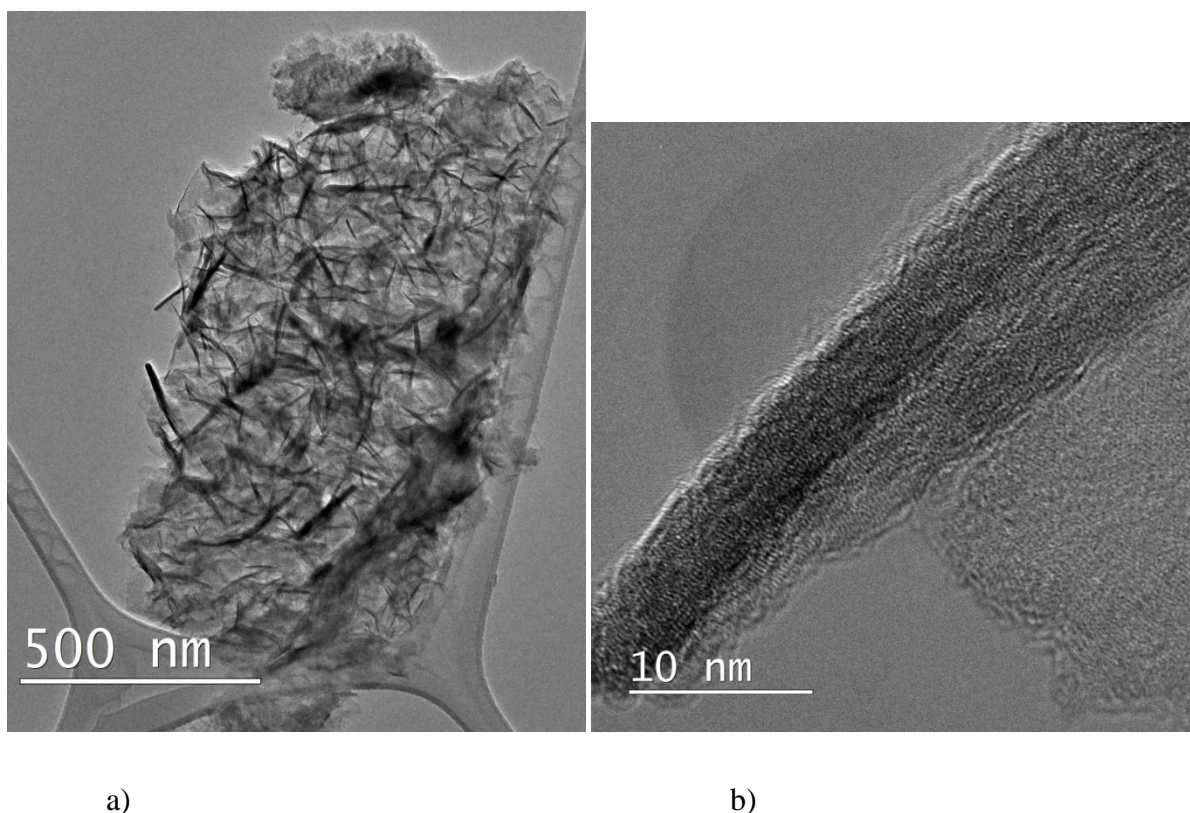
Slika 6. Dobivena suspenzija nakon zračenja otopine na slici 5. Dobivena je izuzetno stabilna zelenkasto-sivo-smeđa suspenzija.

Nakon zračenja suspenzija na slici 6 je izolirana centrifugiranjem i dobiven je praškasti uzorak crvene boje (Slika 7). Takav uzorak je analiziran difrakcijom X-zraka i visokorezolucijskom transmisijskom elektronskom mikroskopijom (VTEM).



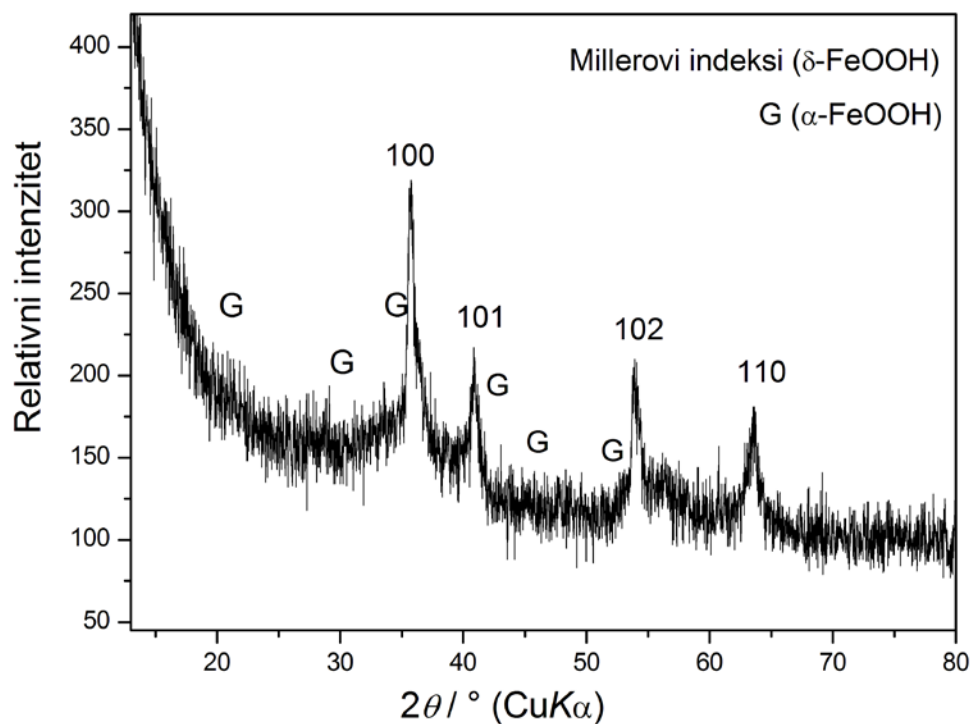
Slika 7. Praškasti uzorak crvene boje dobiven nakon centrifugiranja zelenkasto-sivo-smeđe suspenzije (Slika 6) i sušenja uzorka u vakuum sušioniku.

Mikrografija sintetiziranog uzorka dobivena je pomoću TEM i VTEM (Slika 8). Kod manjeg povećanja (Slika 8a) vidljivo je mnoštvo nanočestica štapičaste morfologije. Duljina štapića je oko 300 nm dok je njihova širina 10 do 15 nm (1D morfologija). Slika 8b prikazuje štapić kod velikog povećanja. Vidljive su ekvidistantne plohe nanokristala.



Slika 8. VTEM mikrografija sintetiziranog uzorka kod manjeg povećanja (a) i VTEM mikrografija čestice kod većeg povećanja (b). Vidljive su ekvidistantne plohe nanokristala.

Difrakcijska slika sintetiziranog uzorka dobivena je pomoću rentgenskog difraktometra praha. Difrakcijski maksimumi poklapaju se s difrakcijskim maksimumima feroksihita, prema ICDD (*engl. International Centre for Diffraction Data*) kartici br. 77-0247, što ukazuje da se uzorak sastoji od nanočestica δ -FeOOH (Slika 9). Difrakcijski maksimumi označeni su Millerovim indeksima također prema ICDD kartici broj 77-0247. Difrakcijski maksimumi su prošireni što ukazuje na činjenicu da je veličina kristala u nano području. Pored δ -FeOOH maksimuma na difrakcijskog slici 10 vidljivi su i jako slabi maksimumi koji pripadaju getitu (G).

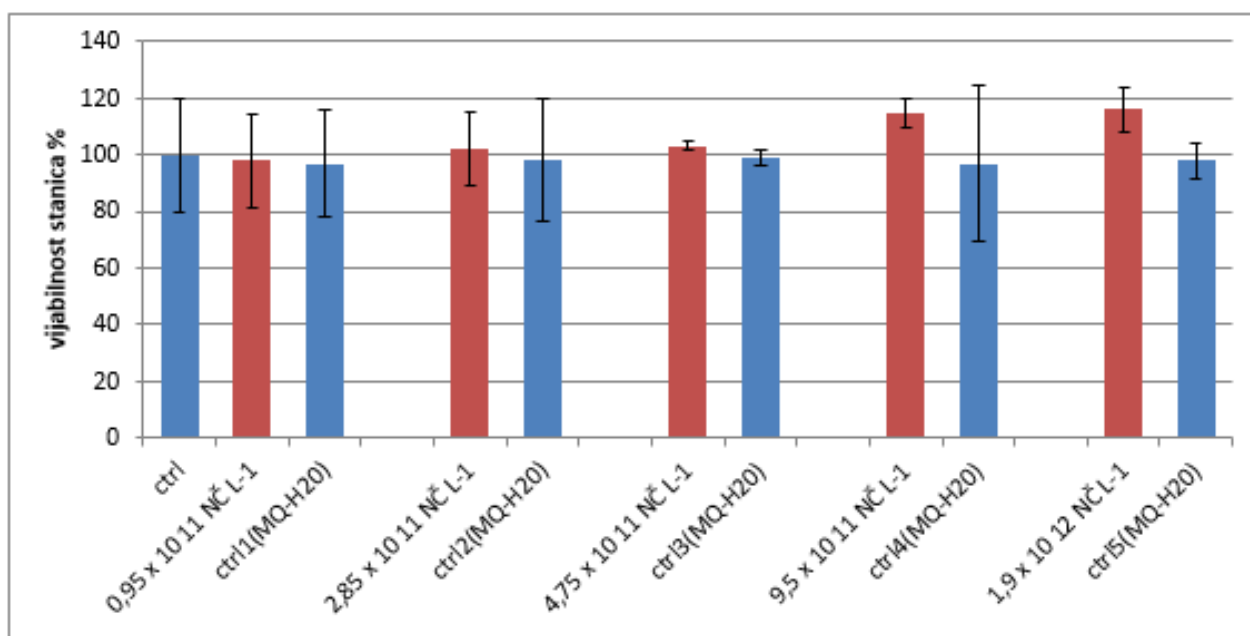


Slika 9. Difrakcijska slika sintetiziranog uzorka koji je karakteriziran na osnovi ICDD (*engl. International Centre for Diffraction Data*) kartice br. 77-0247. Brojevi iznad difrakcijskih maksimuma predstavljaju Millerove indekse. Difrakcijski maksimumi indeksirani su Millerovim indeksima također na osnovi ICDD kartice br. 77-0247. Difrakcijski maksimumi su prošireni što ukazuje na činjenicu da je veličina kristala u nano području. Pored δ -FeOOH maksimuma na difrakcijskog slici vidljivi su i jako slabi maksimumi koji pripadaju getitu (G).

3.2. Vijabilnost i morfologija stanične linije HEK 293 nakon izlaganja nanočesticama δ -FeOOH

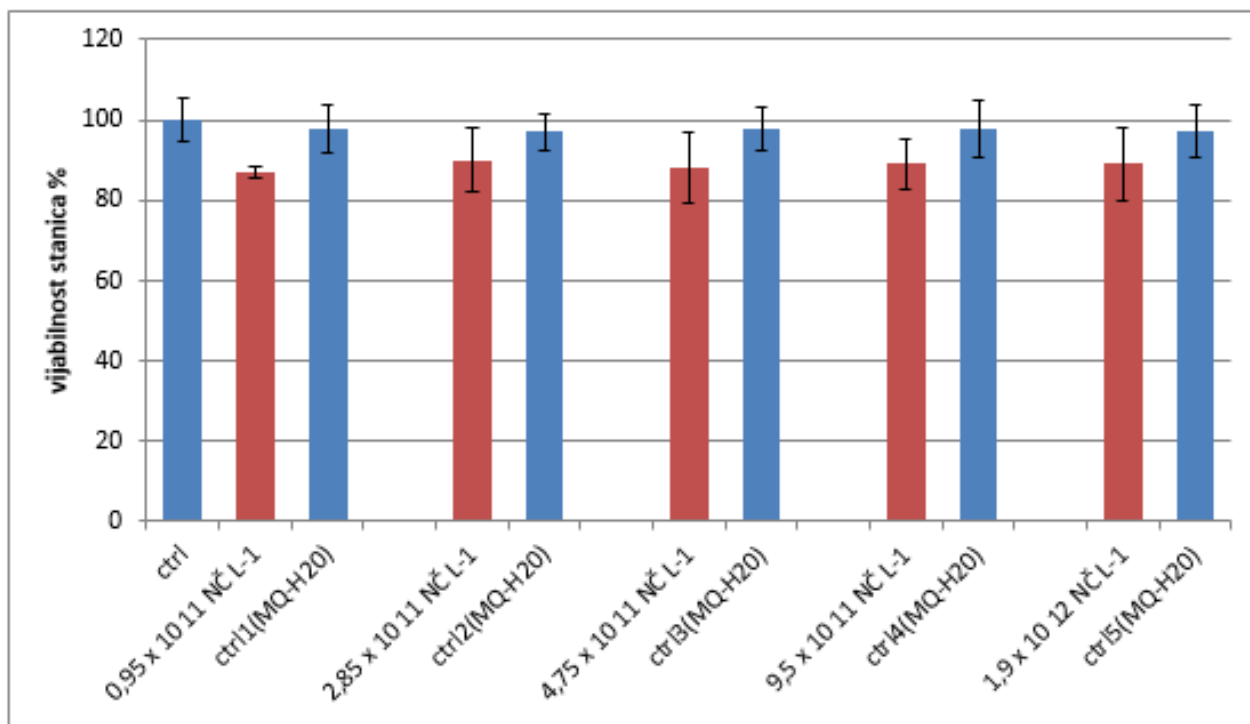
Citotoksični učinak nanočestica δ -FeOOH istražen je na staničnoj liniji HEK 293. Stanice su tretirane različitim koncentracijama NČ δ -FeOOH kroz 24 i 48 sati. Koncentracije dodanih NČ δ -FeOOH bile su : $0,95 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹, $2,85 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹, $4,75 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹, $9,5 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹ i $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹. Uočena je gotovo jednaka vijabilnost pri svim koncentracijama (Slika 10 i Slika 11).

Vijabilnost stanica inkubiranih s nanočesticama δ -FeOOH u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica (stanica bez nanočestica) koja se označava sa 100%, je slična, odnosno u prisustvu nanočestica δ -FeOOH stanice rastu i proliferiraju isto ili bolje. Nakon 24 sata i 48 sati stanice s nanočesticama pokazuju visoku vijabilnost u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Vijabilnost je nakon 48 sati neznatno manja nego nakon 24 sata. Rezultati MTT-testa pokazuju da nanočestice δ -FeOOH nisu citotoksične za HEK 293 stanice (Slika 10 i Slika 11).



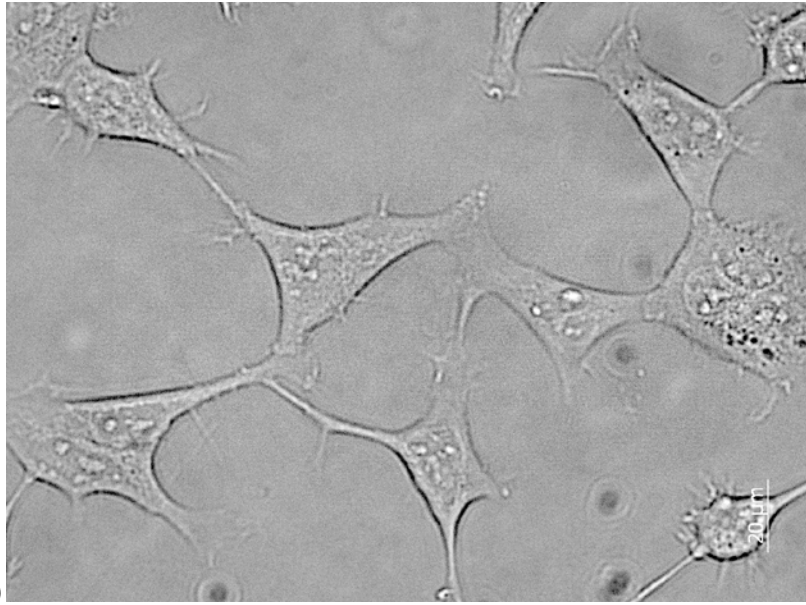
Slika 10. Prikaz vijabilnosti stanica HEK 293 24 h nakon tretiranja nanočesticama δ -FeOOH u koncentracijskom rasponu od $0,95 \times 10^{11}$ do $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹. ctrl - kontrolne netretirane stanice; NČ - nanočestice δ -FeOOH; MQ-H₂O - ultra čista voda.

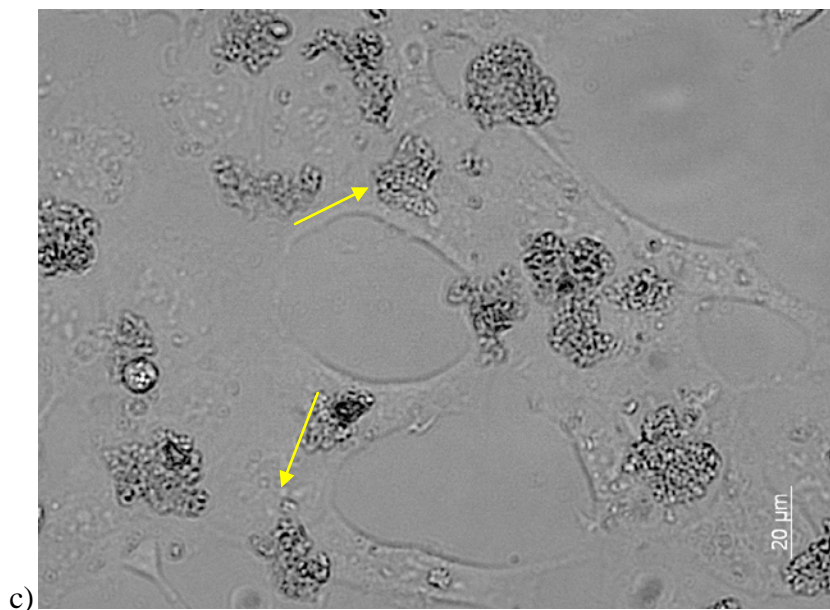
Svaki triplikata sa stanicama ima svoju slijepu probu u koju se dodavala filtrirana voda u istim volumenima u kojima su se dodavale nanočestice δ -FeOOH.



Slika 11. Prikaz vijabilnosti stanica HEK 293 48 h nakon tretiranja nanočesticama δ -FeOOH u koncentracijskom rasponu od $0,95 \times 10^{11}$ do $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹. ctrl - kontrolne netretirane stanice; NČ - nanočestice δ -FeOOH; MQ-H₂O - ultra čista voda.

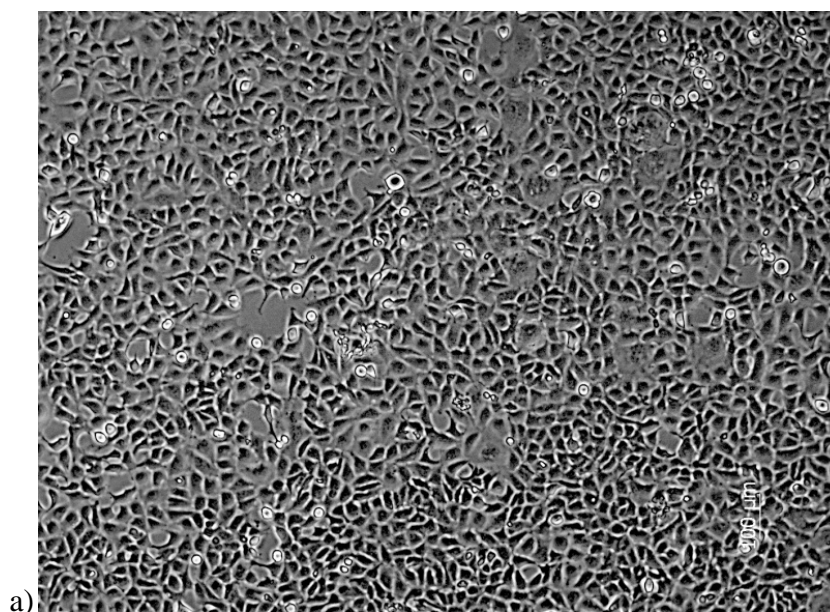
Nakon što su stanice tretirane 24 sata nanočesticama δ -FeOOH, promatrane su invertnim mikroskopom uz povećanje od 400x i 50x (Slika 12 i Slika 13). Uz povećanje od 400x rezultati su pokazali jasno nakupljanje nanočestica unutar stanica i medija. Pri većim koncentracijama nanočestica δ -FeOOH ($4,75 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹ i $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹) agregati NČ δ -FeOOH su vidljivi u obliku malih crnih točkica, s tim da staničnu vijabilnost stanica nije narušena (Slika 12b i Slika 12c). U odnosu na kontrolnu skupinu stanica koje nisu tretirane nanočesticama (Slika 12a) rezultati pokazuju da su stanice zadržale svoj karakterističan oblik (Slika 12b i Slika 12c).

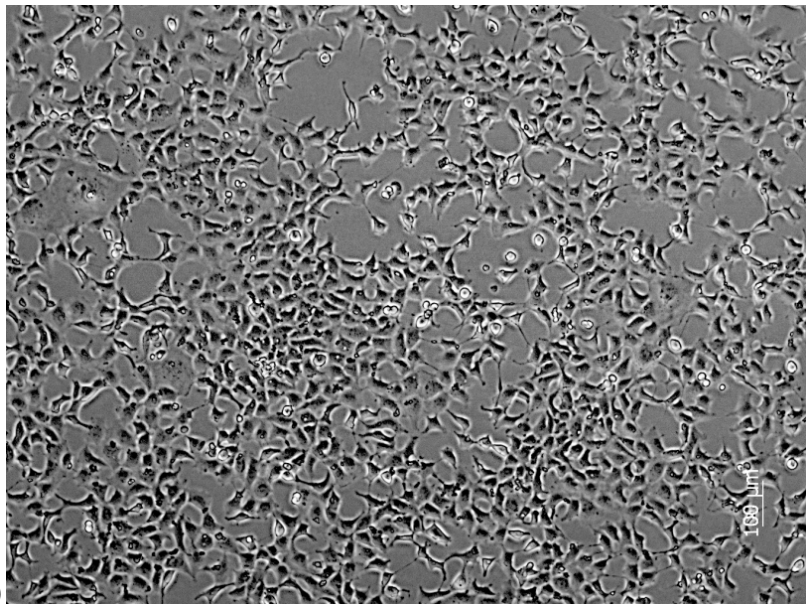
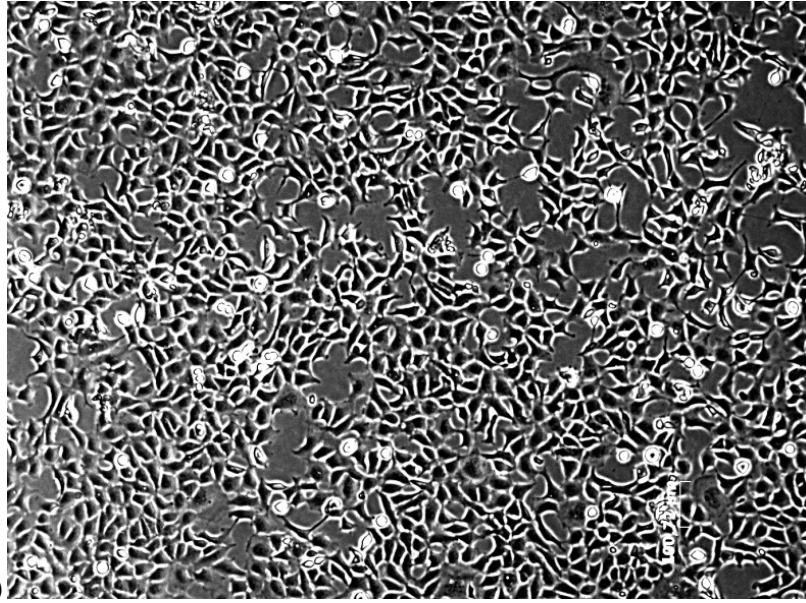


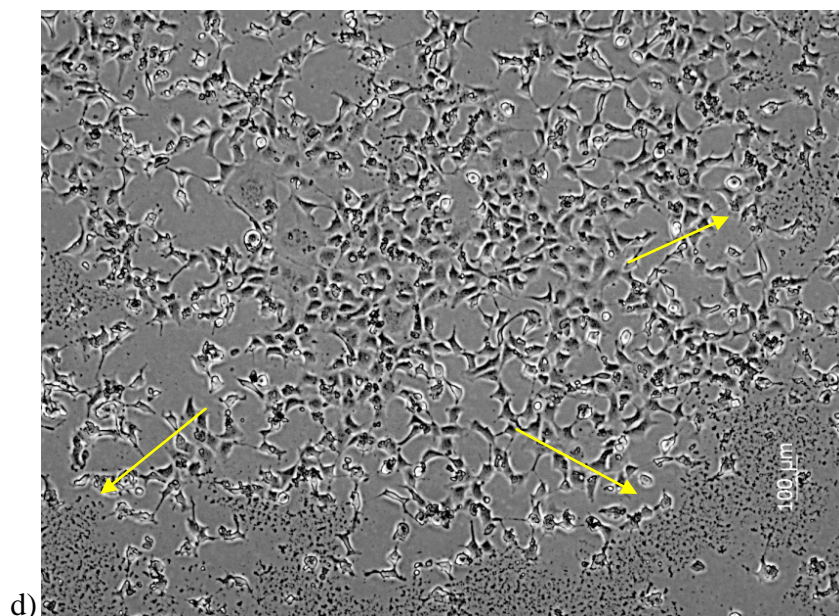


Slika 12. Stanična linija HEK 293 pod povećanjem od 400x. a) netretirane kontrolne stanice HEK 293, 24 sata nakon nasađivanja, b) stanice nakon dodavanja $4,75 \times 10^{11}$ NČ L^{-1} δ -FeOOH, c) nakon dodavanja $1,9 \times 10^{12}$ NČ L^{-1} δ -FeOOH. NČ-nanočestice δ -FeOOH. Strelice pokazuju nakupljanje nanočestica δ -FeOOH unutar stanica i u mediju.

Pod povećanjem od 50x vidljivo je nakupljanje nanočestica unutar stanica i mediju pri koncentraciji od $1,9 \times 10^{12}$ NČ L^{-1} (Slika 13c).

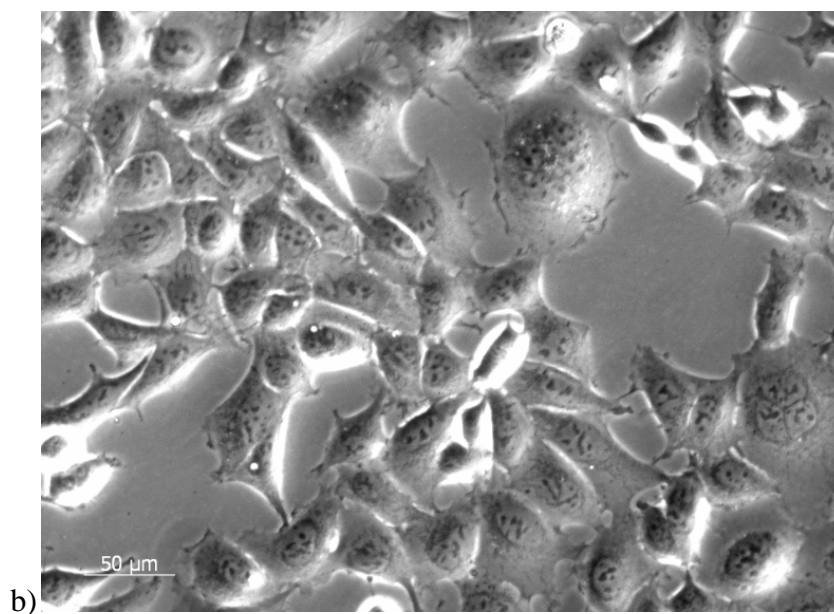
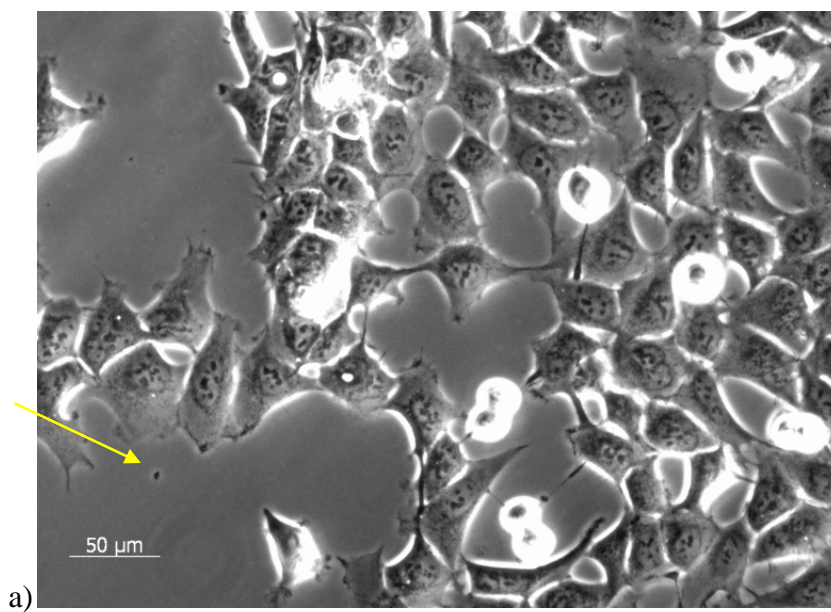


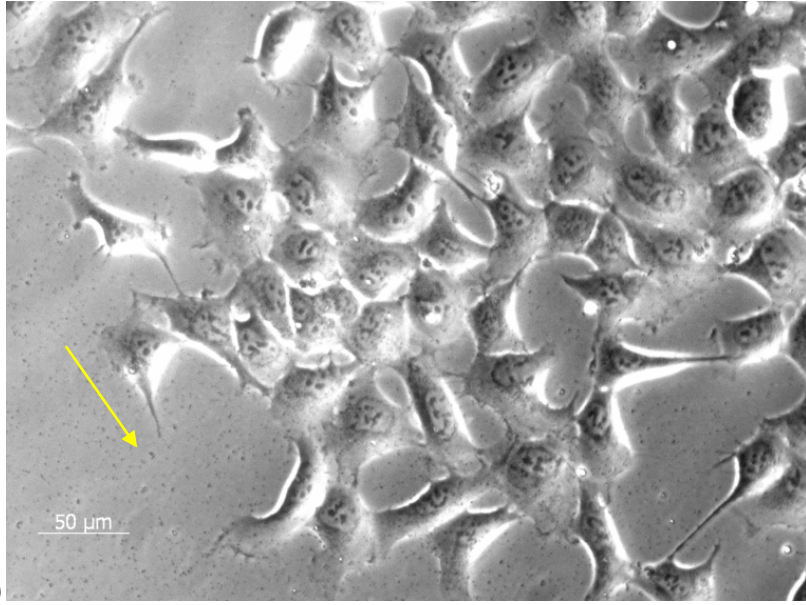




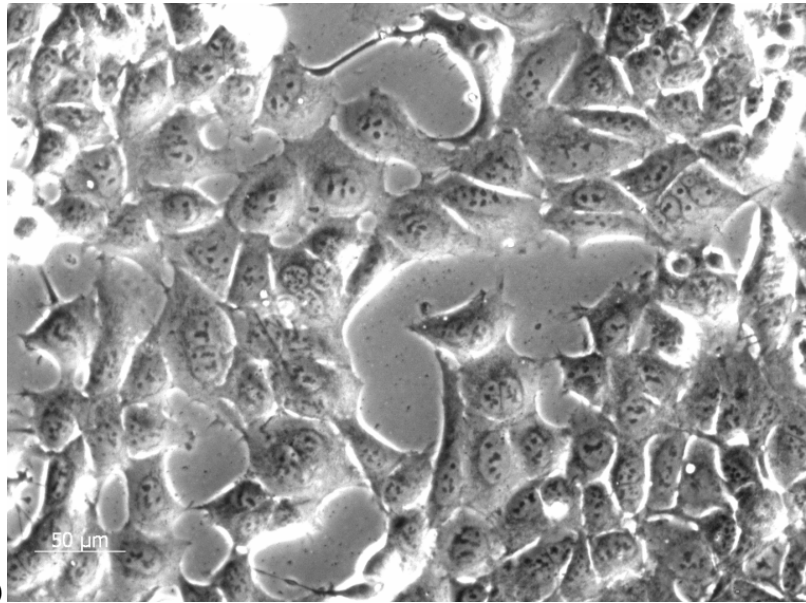
Slika 13. Stanična linija HEK 293 pod povećanjem od 50x. a) i b) kontrolne netretirane stanice HEK 293, 24 sata nakon nasađivanja. c) stanice nakon dodavanja $4,75 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹ δ -FeOOH, d) stanice nakon dodavanja $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹ δ -FeOOH. NČ- nanočestice δ -FeOOH. Strelice pokazuju nakupljanje nanočestica δ -FeOOH unutar stanica i u mediju.

Nakon 48 sati od tretmana nanočesticama δ -FeOOH, stanice su bile vijabilne kao netretirane kontrolne stanice (Slika 14a, Slika 14b, Slika 14c, Slika 14d, Slika 14e, Slika 14f). Izrazito nakupljanje nanočestica unutar stanica i u okolnom mediju vidljivo je nakon tretmana s $9,5 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹ i $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹ (Slika 14e, Slika 14f).

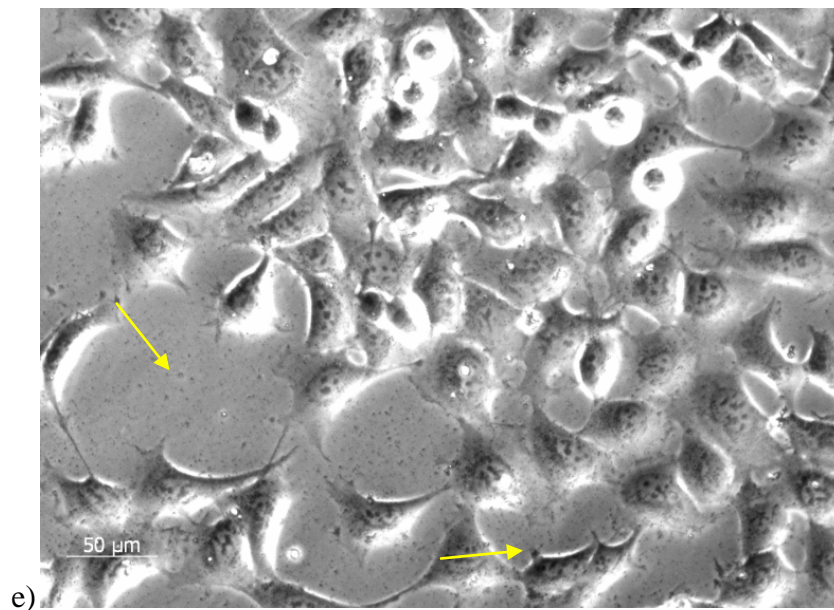




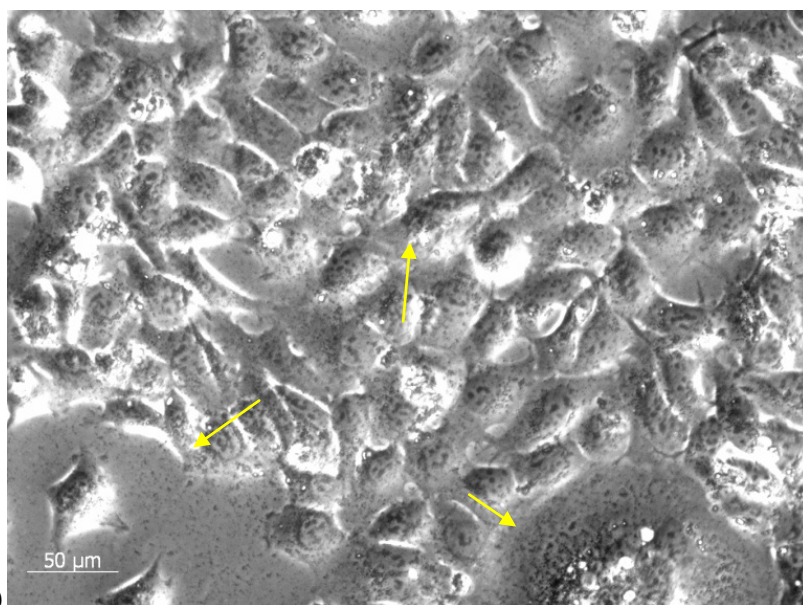
c)



d)



e)



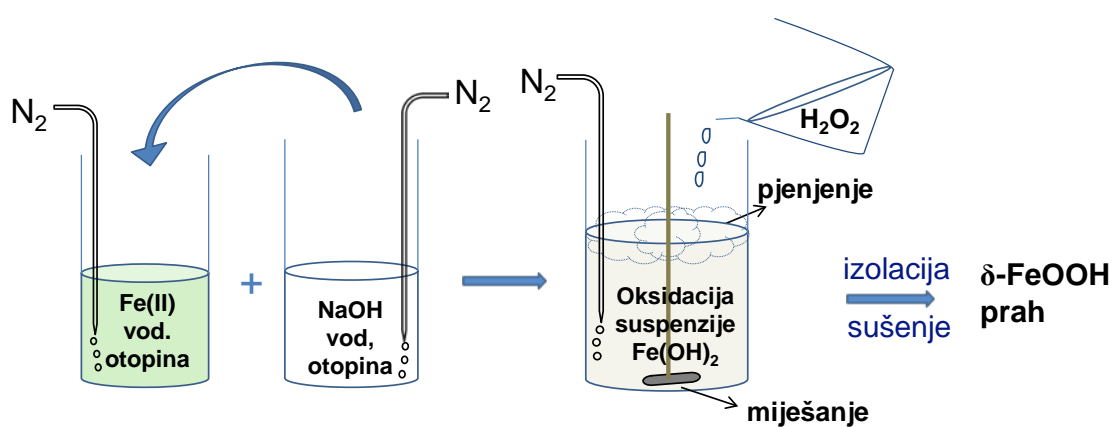
f)

Slika 14. Stanična linija HEK 293 pod povećanjem od 200x. a) kontrolna stanična linija HEK 293, 48 sati nakon nasađivanja, b) stanice nakon dodavanja $0,95 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹ δ -FeOOH, c) stanice nakon dodavanja $2,85 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹ δ -FeOOH, d) stanice nakon dodavanja $4,75 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹ δ -FeOOH, e) stanice nakon dodavanja $9,5 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹ δ -FeOOH, f) stanice nakon dodavanja $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹ δ -FeOOH. NČ - nanočestice δ -FeOOH. Strelice pokazuju nakupljanje nanočestica δ -FeOOH unutar stanica i u mediju.

4. RASPRAVA

U ovom radu magnetske nanočestice δ -FeOOH sintetizirane su novim radiolitičkim postupkom. Dobivene su nanočestice štapićastog oblika (Slika 8). Dobivena difrakcijska slika sintetiziranog uzorka (Slika 9) ukazuje da se uzorak sastoji od nanočestica δ -FeOOH. Ispitivanjem citotoksičnosti nanočestica testom MTT (Slika 10 i Slika 11) se pokazalo da nanočestice nisu citotoksične za staničnu liniju HEK 293.

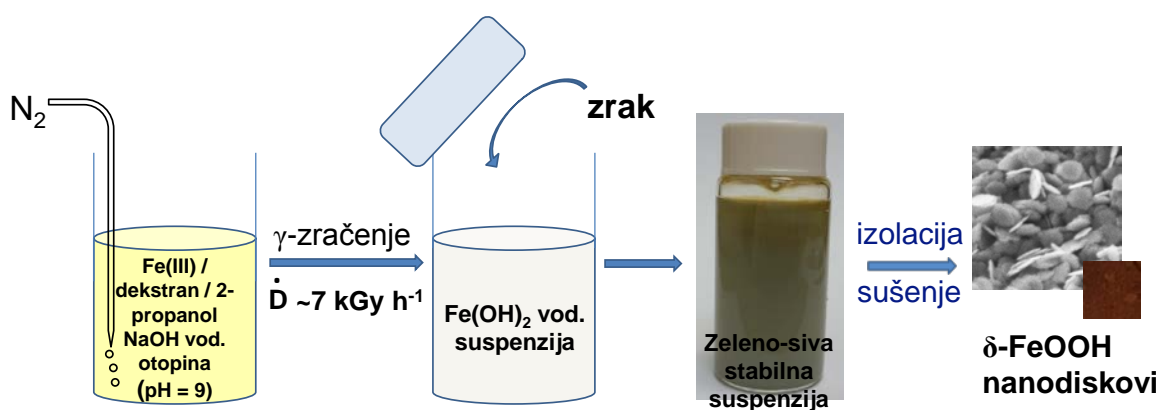
Klasična sinteza δ -FeOOH (Slika 15) počinju iz vodene otopine Fe(II) soli gdje se u inertoj atmosferi dodaje lužina, a nanočestice δ -FeOOH nastaju brzom oksidacijom željezovog(II) hidroksida uslijed dodavanja vodikovog peroksida (H_2O_2). Gotić i sur., (1994) su pokazali da je jaka lužnatost matičnice važan čimbenik za tvorbu δ -FeOOH putem brze oksidacije $\text{Fe}(\text{OH})_2$ s vodikovim peroksidom. Osim toga, pokazano je da mala količina Fe^{3+} iona prisutnih u suspenziji $\text{Fe}(\text{OH})_2$ prije brze oksidacije Fe^{2+} iona s H_2O_2 nije bila odlučujući faktor za formiranje nanočestica δ -FeOOH kao jedinog produkta.



Slika 15. Shematski prikaz sinteze nanočestica δ -FeOOH klasičnim postupkom taloženja Fe(II) iona s vodenom otopinom NaOH u inertoj atmosferi, a nanočestice δ -FeOOH nastaju brzom oksidacijom željezovog(II) hidroksida uslijed dodavanja vodikovog peroksida (H_2O_2) (Gotić i sur., 1994).

Jurkin i sur., (2016) sintetizirali su nanočestice δ -FeOOH radiolitičkim postupkom (Slika 16). Taj novi način sinteze nanočestica δ -FeOOH temelji se na γ -zračenju vodene suspenzije željezovog (III) klorida u prisutnosti 2-propanola i DEAE-dekstrana (dietilaminoetil-dekstran hidroklorida) kod pH \sim 9. pH suspenzije je bio podešen dodavanjem 2 M otopine NaOH. Suspenzije je prije γ -ozračivanja propuhivana plinovitim dušikom kako bi se iz vodene suspenzije istisnuo otopljeni kisik i tako naglasili redukcijski uvjeti tijekom γ -zračenja. Brzina doze γ -zračenja iznosila je ~ 7 kGy h^{-1} , a ukupna apsorbirana doza iznosila je 113 kGy. Pod tako jakim redukcijskim uvjetima nastala je bijela suspenzija karakteristična za željezov(II) hidroksid, odnosno $Fe(OH)_2$. Kada je takva bijela suspenzija došla u dodir s kisikom iz zraka, bijela suspenzija je brzo prešla u stabilnu zeleno-sivu suspenziju karakterističnu za „zelenu hrđu“ (engl. „green rust“). Olowe i sur., (1988) su pokazali da se δ -FeOOH može dobiti oksidacijom „zelene hrđe“ koja nastaje kao metastabilna faza taloženjem $Fe(OH)_2$ u suvišku OH^- iona.

Nakon centrifugiranja zeleno-sive suspenzije, nanočestica talože na dno kivete i nakon sušenja nastaje crveni prah koji se može privući permanentnim magnetom. Analiza difrakcijom X-zraka, transmisijskom elektronskom mikroskopijom je pokazala da se crveni prah sastoji od nanočestica δ -FeOOH u obliku nanodiskova.



Slika 16. Shematski prikaz sinteze nanočestica δ -FeOOH u obliku nanodiskova novim radiolitičkim postupkom prema radu Jurkin i sur., (2016).

U ovom diplomskom radu nanočestice δ -FeOOH sintetizirane su radiolitičkim postupkom prema radu Jurkin i sur., (2016) s tom razlikom da je brzina doze γ -zračenja umjesto $\dot{D} \sim 7 \text{ kGy h}^{-1}$ iznosila $\dot{D} \sim 32 \text{ kGy h}^{-1}$. Kod takvih eksperimentalnih uvjeta nastali su nanoštapići δ -FeOOH (Slika 8). Shematski prikaz radiolitičke sinteze nanoštapića δ -FeOOH prikazan je na slici 17. Ukupna apsorbirana doza kod obje sinteze iznosila je 113 kGy. Rezultati ovog diplomskog rada su potvrdili reproducibilnost radiolitičke sinteze nanočestica δ -FeOOH γ -zračenjem kod apsorbirane doze od 113 kGy. Međutim, ovaj diplomski rad je pokazao da oblik (morfologija) nanočestica δ -FeOOH ovisi o brzini doze γ -zračenja. Kod male brzine doze od $\sim 7 \text{ kGy h}^{-1}$ nastaju nanodiskovi (Slika 16), a kod znatno veće brzine doze od $\sim 32 \text{ kGy h}^{-1}$ nastaju 300-nm nanoštapići.



Slika 17. Shematski prikaz sinteze nanoštapića δ -FeOOH radiolitičkim postupkom korišten u ovom diplomskom radu. Brzina doze γ -zračenja bila je $\dot{D} \sim 32 \text{ kGy h}^{-1}$.

Chagas i sur., (2012) su pokazali da nanočestice δ -FeOOH oslobađaju kontroliranu količinu topline ako se stave pod magnetsko polje AC (engl. “*alternating current*”). Takav rezultat klasificirao je čestice δ -FeOOH kao obećavajući materijal za medicinske primjene. Relativno jednostavna sinteza male veličine čestica čine ovaj materijal obećavajući u daljnjem testiranju za medicinsku praksu kod terapija koje uključuju magnetsku hipertermiju u kliničkoj onkologiji.

Magnetska svojstva sintetiziranih nanoštapića δ -FeOOH nisu istražena u ovom radu, međutim jednostavnom provjerom pokazano je da sintetizirani praškasti uzorak moguće

privući magnetom, odnosno da je sintetizirani uzorak magnetičan na sobnoj temperaturi. Magnetske nanočestice jako je teško stabilizirati u vodenoj suspenziji zbog snažne tendencije magnetskih nanočestica k agregaciji. U ovom radu NČ δ -FeOOH su stabilizirane DEAE-dekstranom. DEAE-dekstran je amino-dekstran (polisaharidni polimer) posebno dizajniran za biomedicinske primjene i što je jako važno korišteni DEAE-dekstran je robustan polimer koji ima prosječnu molekulsku masu oko $M = 500,000$. Takav robustan polimer stabilizira nanočestice u ranoj fazi nastajanja, čime se omogućuje izvrsna disperzivnost i stabilnost nanočestica u vodenoj otopini. U ovom radu je pokazano da DEAE-dekstran može stabilizirati magnetske nanočestice u vodenoj suspenziji (Slika 6, Slika 17). Molday and Mackenzie, (1982) su prvi istraživali formiranje NČ magnetita u prisutstvu dekstrana. Utjecaj smanjenja terminalne glukoze dekstrana za formiranje i stabilnost dekstrana prekrivenog sa tankim slojem supermagnetskih željezovih oksida pokazalo je veliku važnost za veličinu čestica i magnetska svojstva. Za male molekulske mase dekstrana, redukcija je rezultirala 10-strukim ili većim smanjenjem omjera ugljikohidrata/željeza koji je potreban tijekom formiranja čestica da se dobije željena veličina čestica (<20 nm) u procesu koprecipitacije.

Pardoe i sur. ,(2003) su istraživali magnetska i strukturna svojstva NČŽO formiranih u prisutstvu dekstrana. Rezultati analize sugeriraju da prisutnost polimera ograničava veličinu čestica u usporedbi sa česticama koje su pripremljene bez polimera. Čini se da je važan faktor u izboru dekstrana povoljna veličina dekstranovih lanaca, što omogućuje optimalne polarne interakcije s površinama željezovog oksida. Iako je jedna veza sa vodikom relativno slaba, ukupna energija vezivanja vodikove veze preko dužine polisaharidne molekule može biti vrlo visoka zbog velikog relativnog broja hidroksilnih grupa po molekuli.

Jung , (2015) je predložio model za adsorpciju polimera u kojoj se interakcije odvijaju na različitim segmentima polimera. Međutim molekule dekstrana mogu biti desorbirane s površine željezovog oksida na temperaturi od 129°C . Uobičajeni način izbjegavanja desorpcije dekstrana je korištenje epiklorhidrina, tj. agensa koji pospješuje umrežavanje polimera (dekstrana).

Nedavno su Bautista i sur., (2005) istraživali utjecaj dekstrana na površinu superparamagnetskih nanočestica željezovih oksida pripremljenih laserskom pirolizom i metodom koprecipitacije.

Polyakov i sur. (2015) su istraživali humusne tvari kao novi, jeftini i učinkovit stabilizator za feroksihitne (δ -FeOOH) magnetske nanočestice, odnosno ulogu ove prirodne organske tvari u

sintezi δ -FeOOH nanočestica. Humusne tvari su mješavina prirodnih makromolekularnih spojeva u kojima dominiraju karboksilne i hidroksilne skupine. Serija feroksitnih nanočestica sintetizirana je pomoću 0,1 M vodene otopine FeCl₂ i vodene otopine H₂O₂ (30%) pri pH 8 u prisutnosti 100 mg/L humusnih tvari (HT) ili bez nje. HT su dodane u reakcijsku smjesu u obliku alkalne vodene otopine (pH 12) koja je pripremljena otapanjem suhih uzoraka kalij-humusnih tvari uz dodatak lužine ultrazvučnim postupkom. Postignuto je deprotoniranje karboksilnih i fenolnih skupina kod humusnih tvari, te su one postale aktivne za stabilizaciju δ -FeOOH nanočestica. U prisutnosti humusnih tvari (prirodni polielektroliti) nastale su anizotropne magnetske δ -FeOOH nanočestice. Pokazano je da humusne tvari jako smanjuju prosječnu veličinu δ -FeOOH nanočestica i pojačavaju koloidnu stabilnost δ -FeOOH u vodenoj otopini.

Zbog velike primjene u biomedicini, veoma važno je utvrditi toksičnost magnetskih nanočestica. Magnetske nanočestice δ -FeOOH imaju veliku specifičnu površinu, veliki broj hidroksilnih skupina i mnogo bolja adsorpcijska svojstva u odnosu na nanočestice magnetita i maghemita što im omogućuje veliku potencijalnu primjenu u biomedicini. U ovom diplomskom radu vijabilnost stanica HEK 293 izlaganih nanočesticama δ -FeOOH istražena je testom MTT. Kod ispitivanja vijabilnosti stanica veoma je važno poznavati koncentraciju nanočestica u suspenziji, odnosno u bunariću sa stanicama. Koncentraciju nanočestica u suspenziji predstavlja broj nanočestica u jedinici volumena (NČ L⁻¹). Koncentracija NČ u suspenziji ne ovisi samo o masenoj koncentraciji, već je ovisna o veličini čestica. U ovom diplomskom radu koncentracija NČ je određena uređajem NanoSight NS300, proizvođača Malvern. NanoSight NS300 je u mogućnosti vizualizirati i odrediti veličinu i koncentraciju čestica. Instrument služi za određivanje distribucije veličine (nano)čestica, ali i koncentracije nanočestica, kao i vizualizaciju nanočestica u suspenzijama i koloidnim sustavima. To je komplementarna tehnika klasičnoj tehnici dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS). U usporedbi s klasičnim DLS-om NanoSight može razlikovati nanočestice po veličini i koncentraciji. Dakle, NTA tehnika daje važnu informaciju o koncentraciji nastalih NČ po jedinici volumena, koja se ne može dobiti klasičnim DLS-om. Vijabilnost stanica ispitana je testom MTT 24 sata i 48 sati nakon tretiranja stanica HEK 293 nanočesticama δ -FeOOH. Polyakov i sur. ,(2015) su istraživali također i vijabilnost stanica L929 u prisustvu nanočestica δ -FeOOH. Vijabilnost L929 stanica mjerena je primjenom testa MTT i pokazano je da nanočestice δ -FeOOH ne djeluju citotoksično na stanice. Rezultati testova MTT pokazuju da NČ δ -FeOOH nisu toksične za HEK 293 stanice u koncentracijskom rasponu od $0,95 \times 10^{11}$

do $1,9 \times 10^{12}$ NČ L⁻¹ (Slika 10, Slika 11). U tom koncentracijskom području stanice u prisustvu nanočestica δ -FeOOH pokazuju vijabilnost jednaku netretiranim stanicama. Također rezultati dobiveni invertnom mikroskopijom pokazuju da nanočestice δ -FeOOH ulaze u stanice i da agregiraju unutar njih. Mogući razlog agregacije nanočestica δ -FeOOH unutar stanica je prisutnost proteina i ostalih organskih molekula u stanici i mediju koji onda mogu stvoriti takozvanu koronu oko nanočestica δ -FeOOH, a posljedica je narušavanje stabilnosti i agregacija nanočestica. Rezultati dobiveni invertnim mikroskopom u skladu su s rezultatima testa MTT, odnosno u oba slučaja HEK 293 stanice pokazuju izrazito dobru vijabilnost nakon izlaganja nanočesticama δ -FeOOH.

5. ZAKLJUČAK

- Magnetske nanočestice δ -FeOOH sintetizirane su novim radiolitičkim postupkom uz stabilizaciju s DEAE - dekstranom.
- U ovom radu pokazano je da kod γ -zračenja s relativno velikom brzinom doze (~ 32 kGy h^{-1}) nastaju 300-nm nanoštapići δ -FeOOH (Slika 8), dok kod znatno manje brzine doze od ~ 7 kGy h^{-1} nastaju nanodiskovi δ -FeOOH (Jurkin i sur., 2016). U oba slučaja ukupna absorbirana doza iznosila je 113 kGy.
- Koncentracije nanočestica δ -FeOOH u razrijeđenim suspenzijama određene su NanoSight NS300 uređajem za analizu i praćenje nanočestica (*engl. Nanoparticle Tracking Analysis*).
- Nanočestice δ -FeOOH nisu toksične za HEK 293 stanice u koncentracijskom rasponu od $0,95 \times 10^{11}$ do $1,9 \times 10^{12}$ NČ L^{-1} .
- Nanočestice δ -FeOOH ulaze u stanice i agregiraju unutar njih.
- Nanočestice δ -FeOOH nisu citotoksične i mogle bi se primijeniti u biomedicini.

6. LITERATURA

- Alex van der Eb. "USA FDA CTR For Biologics Evaluation and Research Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting" , 13, 14–22, (2012).
- Alkilany A.M., C.J. Murphy, Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?, *Journal of Nanoparticle Research*, 20, 2313–2333, (2010).
- Barreto JA, O'Malley W, Kubeil M, Graham B, Stephan H, Spiccia L. Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy. *Adv Mater*, 5 , 136-232, (2011).
- Birnie D.P., N. J. Bendzko, *Mater. Chem. Phys.*, 26, 59-62, (1999).
- Blume, H. P. ,The fate of Fe during soil formation in humid-temperate environments, 12, 28-46, (2002).
- Carmen M. Bautista, Sabino Veintemillas-Verdaguer Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation, 8, 20-27, (2005).
- Chagas P. , Adilson Ca[^]ndido da Silva , Edson Caetano Passamani, Jose´ Domingos Ardisson, Luiz Carlos Alves de Oliveira, Jose´ Domingos Fabris , Roberto M. Paniago , Douglas Santos Monteiro, Ma´rcio Ce´sar Pereira, δ -FeOOH: a superparamagnetic material for controlled heat release under AC magnetic field, 23, 245-255, (2013).
- Chagas P., A.C. da Silva, E.C. Passamani, J.D. Ardisson, L.C.A. de Oliveira, J.D. Fabris, R.M. Paniago, D.S. Monteiro, M.C. Pereira, δ -FeOOH: a superparamagnetic material for controlled heat release under AC magnetic field, *J Nanopart Res.* 15, 1–7, (2013).
- Chukhrov, B. B. Zvyagin, A. I. Gorshkov, L. P. Yermilova, V. V. Korovushkin, Ye. S. Rudnitskaya ,Feroxyhyte, a new modification of FeOOH, 18, 873-890, (2009).
- D. Reidel, *Iron in Soils and Clay Minerals.*, 5, 749–777, (1987).
- Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*,7, 771-820, (2008).
- De Jong, Wim H, and Paul JA Borm. "Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards." *International Journal of Nanomedicine* 3, 2, 133–49, (2008).
- Dickson, I. Rozenson, The Characterization of Iron Complexes with Soil Organic Matter , 25, 677-687, (2009).
- Drits V. A., B. A. Sakharov , A. Manceau, Clay Minerals Structure of feroxyhyte as determined by simulation of X –ray diffraction curves , 25, 345-367, (1992).

- Feitknecht W. /P. Schindler, Solubility constants of metal oxides, metal hydroxides and metal hydroxide salts in aqueous solution, 30, 801- 858, (2009).
- Fujishima, K. Honda, *Nature* , 37, 238, (1972).
- Gotić M., S. Popović, S. Musić, Formation and characterization of δ -FeOOH, *Mater. Lett.* 21, 289–295, (1994).
- Gudrun Smichdt, Properties of polymer–nanoparticle composites, 21, 103-108, (2003).
- Jurkin T, Štefanić G, Dražić G and Gotić M, Synthesis route to δ -FeOOH nanodiscs, *Materials Letters* 173, 55–59, (2016).
- Kandasamy G., D. Maity, Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics, *International Journal of Pharmaceutics*, 496, 191–218 (2015).
- Karl Buch, Tanja Peters, Thomas Nawroth, Markus Sängler, Heinz Schmidberger and Peter Langguth , Determination of Cell Survival after Irradiation via Clonogenic Assay versus Multiple MTT Assay, 38, 34-56, (2012).
- Koch C.B., C.A. Oxborrow, S. Mørup, M.B. Madsen, A.J. Quinn, J.M.D. Coey, Magnetic properties of ferrihydrite (δ -FeOOH), *Phys. Chem. Miner*, 22 ,333–341, (1995).
- Kuzmann E., S. Nagy and A. Vértes, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Second Edition, 25, 156-178, (2010).
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Mulle, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization , 34, 86-134, (2008).
- Minelli C, Lowe SB, Stevens MM. , *Engineering Nanocomposite Materials for Cancer Therapy*, 12, 12-13, (2011).
- Nam J, Kim W, Lee S, Jeong S, Yoo JW, Dextran-5-(4-ethoxycarbonylphenylazo) salicylic acid ester, a polymeric colon-specific prodrug releasing 5-aminosalicylic acid and benzocaine, ameliorates TNBS-induced rat colitis, 45, 344-367, (2010).
- Okamoto Shoichi, Structure of δ -FeOOH, 13, 10-11, (2014).
- Osborn J.A., *Proceedings of the Seventh Conference on Magnetism and Magnetic Materials*, 39, 1203-1204, (1962).
- Pereira M.C., E.M. Garcia, A.C. da Silva, E. Lorençon, J.D. Ardisson, E. Murad, et al., Nanostructured δ -FeOOH: a novel photocatalyst for water splitting, *J. Mater. Chem.* 21, 10280–10282, (2011).
- Perez-Sanz A., M.C. Graham, *Chemosphere*, Characterization of Fe-humic complexes in an Fe-enriched biosolid by-product of water treatment, 22, 234-344, (2006).

- Pinto I.S.X., P.H.V.V. Pacheco, J.V. Coelho, E. Lorençon, J.D. Ardisson, J.D. Fabris, et al., Nanostructured δ -FeOOH: An efficient Fenton-like catalyst for the oxidation of organics in water, *Appl. Catal. B: Environ*, 25, 119–120 i 75–182, (2012).
- Polyakov A.Y., A.E. Goldt, T.A. Sorkina, I.V. Perminova, D.A. Pankratov, E.A. Goodilin, Y.D. Tretyakov, Constrained growth of anisotropic magnetic δ -FeOOH nanoparticles in the presence of humic substances, *CrystEngComm*, 14 , 233-245, (2012).
- Richard L. Cohen *Applications of Mössbauer Spectroscopy* , 23, 33-45, (2013).
- Silverman B. D. and Daniel. E. Platt IBM Thomas J. Watson Research Center, Yorktown Heights, *Comparative Molecular Moment Analysis* , 13, 22-23, (2012).
- Singh N., G.J.S. Jenkins, R. Asadi, S.H. Doak, Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), *Nano Reviews*., 22, 45-50, (2010).
- Sivula K., R. Zboril, F. Le Formal, R. Robert, A. Weidenkaffet, J. Tucek, J. Frydrych and M. Gratzel, *J. Am. Chem. Soc.*, 20, 78-81, (2010).
- Vasanta L . Pallem, Holly A . Stretz, Martha J. M. Wells , *Environ. Sci. Technol.*, 11, 45-67, (2009).
- Xie J, Lee S, Chen XY. Nanoparticle-based theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev.*, 18, 44-45, (2010).