Utjecaj nanočestica željezovih oksida obloženih PEG-om i D-manozom na vijabilnost i diferencijaciju hondrocita

Marić, Tihana

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:491388

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tihana Marić

Utjecaj nanočestica željezovih oksida obloženih PEG-om i D-manozom na vijabilnost i diferencijaciju hondrocita

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biomedicinu na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Inge Marijanović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Ingi Marijanović na iskazanom povjerenju, predlaganju veoma zanimljive teme, stručnom vodstvu, uloženom vremenu, trudu i pomoći. Zahvalila bih se i na korisnim savjetima koji su doprinijeli ovom radu.

Posebno se zahvaljujem Maji Pušić, mag. biol. exp., koja je nesebično prenosila svoje teorijsko i praktično znanje, pomagala prilikom provedbe eksperimenata, uvijek upućivala korisne savjete te razjašnjavala i omogućila shvaćanje korištenih metoda. Veliko hvala na ukazanoj pomoći pri izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem se i djelatnicima na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, koji su nesebično pomagali oko histološkog dijela rada.

Zahvalila bih se i svojoj sestri Ivani koja je uvijek bila podrška kao i roditeljima i bratu Zvonimiru bez kojih studiranje i diploma ne bi bili mogući.

Zahvalila bih se i proširenoj obitelji, svim dragim osobama i bliskim prijateljima na lijepim i sretnim trenucima tijekom studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

UTJECAJ NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA OBLOŽENIH PEG-OM I D-MANOZOM NA VIJABILNOST I DIFERENCIJACIJU HONDROCITA

Tihana Marić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj nanočestica željezovih oksida obloženih PEG-om i D-manozom na adherentnu i diferencijacijsku kulturu hondrocita. Nanočestice su nanometarske strukture koje imaju potencijalnu primijenu u praćenju i vizualizaciji stanica i tkiva magnetskom rezonancom. Pomoću bojenja kristal-violetom i testa isključenja tripanskog modrila praćeno je preživljenje i proliferacija hondrocita tretiranih nanočesticama što je vizualno potvrđeno testom *Live/Dead*. Preživljenja su bila visoka za obje vrste nanočestica, a najviše su proliferirali uzorci tretirani nanočesticama manoze. Bojanjem berlinskim modrilom provjerena je uspješnost obilježavanja hondrocita te je utvrđeno kako samo nanočestice manoze obilježavaju stanice. Rediferencijacijski potencijal hondrocita, provjeren u uvjetima koji potiču njihovu diferencijaciju, nije bio narušen nakon tretmana nanočesticama što se pratilo pomoću histoloških bojanja hemalaun-eozinom i safraninom O. Budući da su samo nanočestice manoze detektirane nakon 14 dana hondrogene kulture hondrocita, ekspresija hondrogenih markera se provjerila metodom qPCR u stvarnom vremenu. Hondrociti u diferencijacijskoj kulturi su eksprimirali hondrogene markere te je histološka provjera tkiva kvantitativno potvrđena. Nanočestice manoze bi mogle obilježavati hondrocite u adherentnoj kulturi, dok se nanočestice PEG-a ispiru te bi bilo dobro ispitati mogućnost drugačijeg načina njihovog obilježavanja.

(50 stranica, 15 slika, 7 tablica, 49 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: PEG, manoza, nanočestice, hondrociti, preživljenje, diferencijacija

Voditelj: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Ocjenitelji:

1. Dr. sc. Inga Marijanović, doc.
2. Dr. sc. Vesna Benković, izv. prof.
3. Dr. sc. Damjan Franjević, izv. prof

Rad prihvaćen: 30.11.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

EFFECTS OF PEG AND D-MANNOSE COATED IRON OXIDE NANOPARTICLES ON CHONDROCYTE VIABILITY AND DIFFERENTIATION

Tihana Marić

Roosevelt square 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this study was to investigate the nanoparticle effect on the nasal chondrocytes in 2D and 3D culture. Viability assays showed no significant reduction in chondrocyte survival after treatment with PEG coated and D-mannose coated nanoparticles. Even treatment with the highest concentration of nanoparticles did not affect chondrocyte survival. Proliferation rate was also determined and showed a positive proliferation trend for treated and control cells. Interestingly, cells treated with D-mannose nanoparticles had higher proliferation rate than control cells or cells treated with PEG-coated nanoparticles. Next, chondrocytes were pretreated with both types of nanoparticles and cultivated in chondrogenic medium for 14 days. Histological staining and qPCR for chondrogenic markers showed that differentiation potential of treated chondrocytes was similar as in control cells. Lastly, the labeling efficiency assay showed that only D-mannose nanoparticles labeled chondrocytes in 2D and 3D culture were internalized. PEG coated nanoparticles were washed away.

(50 pages, 15 figures, 7 tables, 49 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: PEG, mannose, nanopraticles, chondrocytes, viability, differentiation

Supervisor: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Reviewers:

1. Dr. sc. Inga Marijanović, Asst. Prof
2. Dr. sc. Vesna Benković, Assoc. Prof.
3. Dr. sc. Damjan Franjević, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 30.11.2017.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Nanotehnologija i nanočestice 1

1.2 Superparamagnetske nanočestice željezovih oksida 2

1.3. Svojstva površine SPION-a 5

1.3.1. Nanočestice Fe_3O_4-SiO_2-PEG 6

1.3.2. Nanočestice D-manoza-γ-Fe_2O_3 7

1.4. Upotreba SPION-a za praćenje i vizualizaciju bioloških sustava metodom MRI 8

1.5. Upotreba SPION-a u tkivnom inženjerstvu hrskavice 9

1.5.1 Svojstva hrskavičnog tkiva 9

1.5.2. Tkivno inženjerstvo hrskavice 10

1.5.3. Kultivacija hondrocita 11

1.5.4. Pretklinička ispitivanja u tkivnom inženjerstvu zglobne hrskavice 11

1.5.5. Vizualizacija hrskavičnih presadaka pomoću SPION-a 12

1.6. Cilj istraživanja i hipoteza 13

2. METODE 14

2.1. Kultura primarnih hondrocita izoliranih iz nosnog septuma ovce 14

2.2. Određivanje preživljenja hondrocita bojanjem kristal-violet 14

2.3. Određivanje preživljenja hondrocita testom isključenja tripanskog modrila 15

2.4. Vizualizacija mrtvih i živih hondrocita testom *Live/Dead* 16

2.5. Detekcija nanočestica berlinskim modrilom 17

2.6. Uspostavljanje 3D kulture hondrocita 17

2.7. Fiksacija i parafinizacija 3D kulture hondrocita 18

2.8. Histološka analiza prereza 3D peleta hondrocita 18

2.9. Izolacija RNA iz hondrocita u 3D kulturi 19

2.10. Tretman DNazom i reverzna transkripcija RNA 20

2.11. Analiza ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu ... 21

3. REZULTATI 23

3.1. Preživljenje hondrocita u adherentnoj kulturi nakon tretmana nanočesticama 23

3.1.1. Preživljenje hondrocita određeno kolorimetrijskim testom kristal-violet 23

3.1.2. Preživljenje i proliferacija hondrocita određeni testom isključenja tripanskog modrila 24

3.1.3. Vizualizacija živih i mrtvih stanica testom *Live/Dead* 26

3.2. Detekcija nanočestica berlinskim modrilom u fiksiranim uzorcima hondrocita 28

3.3. Histološka analiza 3D kulture peleta hondrocita 32

3.4. Razina ekspresije markera hondrogeneze određena metodom qPCR u stvarnom vremenu 35

4. RASPRAVA 40

5. ZAKLJUČAK 45

6. LITERATURA 46

7. ŽIVOTOPIS 50

Popis kratica

3D kultura – trodimenzionalna kultura

cDNA – komplementarna DNA, engl. *complementary DNA*

DEPC – dietilpirokarbonat, engl. *diethyl pyrocarbonate*

DMEM-HG – engl. *Dublecco's Modified Eagle's Medium – high glucose*

DMSO – dimetil sulfoksid, engl. *dimethyl sulfoxide*

ECM – izvanstanični matriks, engl. *extracellular matrix*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*

FBS – fetalni goveđi serum, engl. *fetal bovine serum*

FDA – Američka uprava za hranu i lijekove, engl. *Food and Drug Administration*

FGF-2 – faktor rasta fibroblasta – 2, engl. *fibroblast growth factor – 2*

GAPDH – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

HEPES – engl. *hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*

MRI – magnetska rezonanca, engl. *magnetic resonance imaging*

NFR – engl. *Nuclear fast red*

PBS – fosfatni pufer, engl. *phosphate-buffered saline*

PEG – polietilen glikol

PFA – paraformaldehid

PLGA – poli-latična-ko-glikolna kiselina

PVA – polivinilni alkohol

PVP – polivinilpirolidon

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom, engl. *quantitative polymerase chain reaction*

ROS – reaktivni kisikovi spojevi, engl. *reactive oxygen spicies*

SDS – natrijev dodecil sulfat, engl. *sodium dodecyl sulfate*

SPION – superparamagnetske nanočestice željezovih oksida, engl. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*

1. UVOD

1.1. Nanotehnologija i nanočestice

Razvoj sve moćnijih mikroskopskih metoda čija rezolucija razaznaje veoma male udaljenosti doveo je do razvoja grane znanosti koja se bavi proučavanjem struktura na nanometarskoj razini – nanotehnologije. Zbog izuzetno malih dimenzija, nano-svijet pokazuje promijenjena tj. specifična kemijska i fizikalna svojstva od materijala većih dimenzija te shodno tome i drugačiji utjecaj na biološke sustave. Nanotehnologija, stoga, pokušava razumjeti svojstva i funkciju čestica dimenzija do 100 nm te istražuje moguću primjenu takvih struktura. Upotrebljavanje nanotehnologije u svrhu istraživanja bioloških sustava te medicinskog napretka obuhvaća grana znanosti zvana nanomedicina (Bhatia, 2016).

Nanočestice su mikroskopske čestice promjera do 100 nm te mogu biti načinjene od više različitih vrsta atoma, iona, molekula ili polimera. Zbog različitog sastava materijala od kojeg nanočestica može biti građena, njena kompleksa struktura je podijeljena u nekoliko slojeva (Khan i sur., 2017). Jezgra se nalazi u centru nanočestice te se često ime nanočestice odnosi na sastav jezgre. Sljedeći sloj je ljuska nanočestice koja oblaže i štiti jezgru te može biti drugačijeg sastava i strukture od jezgre (Christian i sur., 2008). Omjer površine i volumena nanočestice je veoma visok što može dovesti do nestabilnosti i agregacije nanočestica u vodenim i drugim otopinama. Stoga se dodaje površinski sloj kako bi povećao odbojne sile među nanočesticama te poboljšao njihovu stabilnost u otopini. Najčešće se dodaju surfaktanti poput SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulfate*), sintetski polimeri ili biološke makromolekule proteina i polisaharida te nabijene skupine koje mogu tvoriti polimere poput karboksilata, sulfata, itd. (Zhang, 2014) S obzirom na morfologiju, veličinu i kemijska svojstva mogu se podijeliti u različite kategorije. Jedna od češćih podjela je na sljedeće skupine: globularne ugljikove nanočestice i nano-cijevi ugljikovih atoma, nanočestice s metalnom jezgrom poput bakra, srebra, zlata i željeza, nanočestice anorganskih ili nemetalnih spojeva, semikonduktorske nanočestice sa svojstvima metala i nemetala, nanočestice koje sadrže organske polimere te lipidne nanočestice (Khan i sur., 2017).

1.2 Superparamagnetske nanočestice željezovih oksida

Željezovi oksidi su spojevi željeza i kisika, mogu biti u obliku oksida, hidroksida ili oksida i hidroksida te se u prirodi nalazi 16 vrsta. Najuobičajeniji su magnetit (Fe_3O_4), maghemit (γ-Fe_2O_3) i hematit (α- Fe_2O_3). Magnetit i maghemit su ujedno spojevi koji se mogu sintetizirati u obliku jezgre nanočestice dimenzija do 100 nm. Znanstvenici su uvidjeli potencijal ovakvih čestica što ih je učinilo veoma zanimljivim predmetom istraživanja u tehnologiji, znanosti i medicini (Ali i sur., 2016).

Nanočestice željezovih oksida dijele nekoliko bitnih svojstava na koje se valja osvrnuti. Karakterizira ih specifično svojstvo superparamagnetičnosti zbog čega se nazivaju još i SPION (engl. *superparamagnetic iron oxide nanoparicle*). Superparamagnetičnost znači da, ukoliko se izlože vanjskom magnetskom polju, pojavljuje se inducirani magnetski moment jedinstven kroz cijelu nanočesticu te raste s jačinom magnetskog polja sve do zasićenja. U takvom stanju, nanočestica veoma brzo odgovara na promjene magnetskog polja. Nakon što se magnetsko polje ukloni, nanočestice izgube magnetski moment, te se bez upotrebe dodatne energije demagnetiziraju (Huber, 2005).

Nadalje, nanočestice magnetita i maghemita se generalno smatraju nisko toksičnima i odobrene su od strane Američke uprave za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA), američke državne agencije koja kontrolira kvalitetu i sigurnost raznih prehrambenih i medicinskih proizvoda. Istraživanja su pokazala slabu citotoksičnost nanočestica željezovih oksida na različite vrste stanica poput humanih mezenhimskih matičnih stanica (Kasten i sur., 2014), humanih živčanih matičnih stanica (Pongrac i sur., 2016) te mišjih embrionalnih matičnih stanica (Parsa i sur., 2015). Ipak, nepovoljan učinak na organizam postoji te je najzapaženiji indukcija reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen spicies*, ROS) u stanicama. Nakupljanje ROS-a može dovesti do pojave oksidativnog stresa u stanicama koji za posljedicu ima oštećenje unutarstaničnih proteina i DNA te hiperpolarizaciju membrane mitohondrija što može voditi staničnoj smrti odnosno apoptozi. Iako je pokazano kako većinom ne uzrokuju značajno smanjenje vijabilnosti stanica, pri istraživanjima s ljudskim i životinjskim modelima treba biti oprezan te podobno ispitati toksičnost nanočestica željezovih oksida, pogotovo ako je u pitanju daljnja primjena u medicini (Pongrac i sur., 2016).

Nanočestice željezovih oksida su hidrofobne te ih karakterizira velik omjer površine naspram volumena. To im omogućuje ostvarivanje mnogih površinskih interakcija s drugim

hidrofobnim tvarima. Problem je, ako nanočestice međusobno stupe u interakciju te počnu stvarati aglomerate što im dodatno povećava hidrofobnu površinu. Ukoliko je dovoljan broj čestica u aglomeratu, doći će do stvaranja malog magnetskog polja oko nanočestica. Magnetsko polje će privlačiti ostale nanočestice u otopini te će se aglomeracija nastaviti. Takva nakupina se ne može više otopiti u vodi, a u organizmu može biti toksična ili uklonjena pomoću retikuloendotelnog sustava koji uklanja štetne tvari iz krvotoka. Stoga, jezgra nanočestica sama često ne može obnašati željenu funkciju te se kao rješenje uvode specifične površinske modifikacije (Ali i sur., 2016).

Fizikalno-kemijska svojstva su specifična za pojedinu vrstu SPION-a i utječu na njihovo ponašanje u organizmu. Uključuju morfologiju čestica, dimenzije i svojstva površine s uvedenom površinskom modifikacijom. Morfološki nanočestice mogu biti sfere, štapići, vlakna, nano-kristali, itd., te će zadobiti oblik ovisno o načinu sinteze i korištenim kemikalijama tijekom procesa. Pokazano je kako različiti oblici mogu nejednako utjecati na distribuciju, uklanjanje iz organizma te kompatibilnost sa živim organizmom. Na primjer, makrofazi koji su fagocitirali štapićaste oblike su nakupljali nanočestice u slezeni, dok su sferične oblike odlagali u jetri te gdje su bili brže uklonjeni iz organizma. Razlika je utvrđena i u toksičnosti te su se sferični oblici pokazali toksičnijima od štapićastih ili kristalnih oblika nanočestica (Wahajuddin, 2012; Mahmoudi i sur., 2010). Sljedeće svojstvo, veličina, određuje koliko će se SPION zadržati u cirkulaciji u organizma. Tako se manje čestice (do 10 nm) lakše uklanjaju jer ih jednostavno filtriraju bubrezi, dok veće čestice (od 200 nm) fagociti odnose u slezenu. Dimenzije između 10 i 100 nm mogu proći kroz kapilare te izbjeći uklanjanje pomoću retikuloendotelnog sustava zbog čega se smatraju optimalnima za primjenu. Naposljetku, svojstvo površine ovisi o uvedenoj površinskoj modifikaciji kojoj je cilj stabilizirati nanočesticu u otopini i odrediti ili poboljšati funkciju nanočestice. Naboj površine utječe na mogućnost endocitoze i opstanak u cirkulaciji te će nabijene nanočestice bolje izbjegavati retikuloendotelni sustav no hidrofobne. Ako je površina nanočestice negativno nabijena, stanica će ju teže endocitirati zbog negativnog naboja koji se nalazi na vanjskoj strani stanične membrane (Wahajuddin, 2012). S obzirom na željena fizikalno-kemijska svojstva, odabiru se uvjeti i načini procesa sinteze.

Zbog osnovnih karakteristika i mogućnosti manipulacije fizikalno-kemijskim svojstvima, SPION-i su naišli na širok raspon potencijalnih primjena u biomedicini. Aktivno se radi na poboljšanju i dorađivanju nanočestica kako bi bile što sposobnije obavljati namijenjenu ulogu u

organizmu. Neke od potencijalnih uloga su opisane u nastavku. Moguće je koristit nanočestice za pregrijavanje ili hipertermiju tumorskog tkiva. Johannsen i sur., su 2005. godine prvi puta ispitali ovaj pristup na pacijentu koji boluje od raka prostate. Oprezno su injektirali SPION-e u tumorsko tkivo te su potom primjenom magnetskog polja specifično pregrijali tumorske stanice. Nakon nekoliko tjedana tretmana, zabilježeno je značajno smanjenje broja malignih stanica. SPION-i se pokušavaju iskoristiti kao prenositelji kemoterapeutika u tumorske stanice. Na površinu nanočestice se konjugira lijek, unesu se u organizam i primjenom vanjskog magnetskog polja se dovedu u područje zahvaćenom tumorom. Alexiou i sur., 2003, su pokazali kako na taj način puno veće koncentracije kemoterapeutika mogu doći do tumorskih stanica no klasičnom, oralnom primjenom. Također, u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu kostiju pokušavaju se iskoristit prednosti SPION-a. U nosače, strukture na koje se nasade stanice i služe kao pomoć pri *in vitro* formaciji tkiva, mogu se ugraditi nanočestice željezova oksida. Vanjskim magnetskim poljem inducira se magnetska sila unutar SPION-a koja doprinosi efikasnijoj proliferaciji gradivnih stanica kosti - osteoblasta. Istovremeno se potiče i sekrecija izvanstaničnog matriksa te je i brža degradacija nosača. Stoga, djelovanje nosača s nanočesticama na regeneraciju kosti se pokazalo efikasnim (Mortimer i Wright, 2017). Osim kosti, nanočestice su ispitivane u svrhu regeneracije živčanih stanica gdje su konjugirane s neurotrofnim faktorima rasta neurona što produžilo i poboljšalo djelovanje, inače kratkoživućih faktora, na neurone (Ziv-Polat i sur., 2015). SPION-i se također koriste za praćenje i detekciju obilježenih stanica i tkiva pomoću magnetske rezonance (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI) što će biti detaljnije opisano u poglavlju 1.4 (Estelrich i sur., 2015). Još jedna od potencijalnih uloga nanočestica je prenošenje tj. transdukcija stanica nukleinskim kiselinama i/ili virusima uz vodstvo magnetskim poljem. Nukleinske kiseline ili virusi se kroz elektrostatske interakcije konjugiraju na površinu nanočestice koja ima ulogu zaštite konjugata od razgradnje različitim unutarstaničnim restrikcijskim enzimima. Također, unos ovakvog konstrukta je moguć bez prisustva specifičnih receptora što povećava brzinu i efikasnost transdukcije (Polyak i Friedman, 2009). Prema navedenim primjerima može se vidjeti kako su SPION-i iskoristivi za najrazličitije primjene, od terapija za tumore i ozljede do dijagnostičkog praćenja raznih stanica.

1.3. Svojstva površine SPION-a

Karakteristika površine je veoma važan faktor u interakciji nanočestica s biološkim sustavom. Osim što izrazito utječe na stabilnost koloidne otopine nanočestica, točnije hoće li nanočestica agregirati ili biti dispergirana u otapalu, kazuje i o ponašanju u organizmu. Biološka podudarnost sustava i čestice te funkcija koju obnaša biti će oblikovane zajedno s površinom. Površinski naboj, koji se fizički predstavlja kao zeta-potencijal (ζ), je razlika u potencijalu između disperznog sredstva, tj. medija ili otapala u kojem se nanočestica nalazi, i površinskog sloja nanočestice. Što je veći zeta-potencijal, odnosno što površina ima veći naboj, odbojne sile među nanočesticama će biti istaknutije te će koloidna otopina biti stabilnija. Također, stabilnost ovisi i o okruženju u kojemu se nanočestica nalazi te promjene pH ili ionske jakosti mogu uzrokovati aglomeraciju ili taloženje (Polyak i Friedman, 2009).

Kako je sama jezgra SPION-a hidrofobna, površinski potencijal se uvodi preko raznih modifikacijskih molekula koje bi trebale biti biološki podudarne i razgradive u organizmu. Mogu se uvesti tijekom procesa sinteze ili nakon sinteze, kada se modificira ljuska. Korištene molekule mogu biti surfaktanti te sintetski ili prirodni polimeri. Surfaktanti koji se često koriste su masne kiseline poput oleinske, laurinske kiseline, zatim sulfonska kiselina te fosforasta kiselina. Hidrofobni dijelovi molekule surfaktanta se orijentiraju prema hidrofobnoj željezno-oksidnoj jezgri, dok hidrofilni dio prema otapalu. Nadalje, koriste se i polimeri s amfifilnim svojstvima kao što su polivinilpirolidon (PVP), poli-latična-ko-glikolna kiselina (PLGA), polietilen glikol (PEG) te polivinil alkohol (PVA). Prirodni polimeri modifikatori su želatina, dekstran, polilaktična kiselina, škrob, albumin, liposom te etil-celuloza. U tablici 1. su ukratko opisane prednosti modifikatora zanimljivih za upotrebu u biomedicini (Mahmoudi i sur., 2010).

Tablica 1. Površinske modifikacije i njihove prednosti te potencijalna primjena nanočestica (Mahmoudi i sur., 2010).

Površinska modifikacija	Svrha	Prednost
Polietilen glikol (PEG)	Vizualizacija *In vivo* magnetskom rezonancom	Biokompatibilnost, produženo vrijeme u cirkulaciji
Polivinil alkohol (PVA)	*In vivo* vizualizacija magnetskom rezonancom, dostava lijekova	Stabilizacija koloidne otopine
Polivinilpirolidon (PVP)	Vizualizacija magnetskom rezonancom i dostava lijekova	Stabilizacija koloidne otopine
Etil-celuloza	Ekstrakcija lijekova	Poboljšana apsorpcija lijekova u okolno tkivo
Dekstran	Izolacija *E.coli*, dostava lijekova, vizualizacija	Stabilizacija koloidne otopine
Škrob	Vizualizacija	Biokompatibilnost
Liposom	Vizualizacija, dostava lijekova, hipertermija	Produženo vrijeme u cirkulaciji
Albumin	Razdvajanje stanica	Biokompatibilnost
Želatina	Izolacija genomske DNA, dostava lijekova	Biokompatibilnost, efikasnost

Za ovaj rad su dvije vrste nanočestica željezovih oksida i popratne modifikacije bile od izuzetnog interesa, a to su SPION-i obloženi PEG-om i D-manozom te će u nastavku biti detaljnije opisani.

1.3.1. Nanočestice Fe_3O_4-SiO_2-PEG

Polietilen glikol (PEG) je polimerni spoj sastavljen od ponavljajuće jedinice etilen oksida. Broj i način ponavljanja se često razlikuju tako da PEG može imati od nekoliko do nekoliko tisuća podjedinica te biti linearan ili razgranat. Nije toksičan, kemijski je inertan i hidrofilan, lako se otapa u vodi i organskim otapalima. Glavna prednost PEG-a kao površinskog modifikatora nanočestica je što produžuje trajanje nanočestica u cirkulaciji izbjegavajući uklanjanje retikuloendotelnim sustavom. Retikuloendotelni sustav je izdanak imunološkog sustava, sastoji se od fagocitnih stanica (makrofazi, monociti) u optoku i organa poput jetre i slezene te se brine za uklanjanje trošnih tkiva i stanica te uzročnika infekcija iz cirkulacije. Nanočestice se također kao

strane strukture, uklanjaju iz organizma. Proces uklanjanja ide preko fagocita, koji uz pomoć proteina opsonina fagocitiraju ciljanu tvar. Opsonini prepoznaju i vežu tvar, tj. nanočesticu, te ju tako čine vidljivom fagocitima koji je potom razgrade ili uklone u slezenu ili jetru. Kako je PEG hidrofilan i razgranat, nanočestice obložene njime će duže optjecati cirkulacijom jer će adsorpcija opsonina na površinu nanočestice biti usporena. Ako SPION ne bi sadržavao PEG kao površinsku modifikaciju, opsonin bi se brže adsorbirao na površinu zbog povoljnijih hidrofobnih interakcija te bi proces uklanjanja tekao puno brže. Nadalje, PEG će pridonijeti stabilizaciji koloidne otopine nanočestica jer unosi steričke smetnje između nanočestica i tvori mnogo povoljnih interakcija sa otapalom (Jokerst i sur., 2011, Owens i Peppas, 2005).

Željezno oksidna jezgra se često oblaže i silicijevim dioksidom (SiO_2). Podudaran je s biološkim sustavom, kemijski inertan, termički stabilan te sadrži veliku površinu podložnu za daljnje specifične modifikacije. Prednost mu je što štiti jezgru, pogotovo ako je riječ o magnetitnoj jezgri, od oksidacije te omogućuje stabilnost koloidne otopine zbog hidrofilnosti. Silicijev dioksid je negativnog predznaka, što pogoduje interakciji s proteinima krvne plazme i procesu opsonizacije i fagocitoze te se zbog toga još dodatno modificira ili koristi u svrhu razdvajanja biomolekula (Kostiv i sur., 2017; Mahmuodi i sur., 2010).

Kostiv i sur., 2017, su sintetizirali monodisperzne magnetitne nanočestice s ljuskom od silicijeva dioksida te PEG-om kao površinskom modifikacijom. Uvidjeli su kako nisu značajnije reducirale vijabilnosti, iako su uzrokovale određene perturbacije koje vode k oksidativnom stresu. Zatim, nanočestice PEG-Fe_3O_4-SiO_2 nisu detektirane unutar stanica točnije stanice ih nisu endocitirale. Pokazale su se i veoma zanimljivim kontrastnim sredstvom za vizualizaciju tkiva magnetskom rezonancom. Stoga, nanočestice Fe_3O_4-SiO_2-PEG imaju potencijal za buduća istraživanja i moguću primjenu u području vizualizacije tkiva.

1.3.2. Nanočestice D-manoza-γ-Fe_2O_3

D-manoza je jednostavan monosaharid i u prirodi se može naći kod mikroorganizama, biljaka i životinja gdje se ulazi u sastavu polisaharidnih polimera. U stanicu se unosi pomoću nespecifičnih transportera za šećere sa 6 C atoma (heksoze). Unutar stanice se fosforilira u manoza-6-fosfat što dalje služi kao supstrat za enzime. Dva najvažnija su fosfomanoza izomeraza i fosfomanomutaza. Većina manoze u stanici se katalizira fosfomanoza izomerazom, dok samo manji dio fosfomanomutazom. Potonji enzim usmjerava manozu u proces glikozilacije pri čemu

nastaju glikani, ugljikohidratne komponente izvanstaničnog matriksa. Mogu biti u sastavu glikoproteina, glikolipida i proteoglikana (Sharma i sur., 2014).

Kako je D-manoza jednostavan, hidrofilan šećer te se prirodan supstrat membranskih receptora koji posreduju endocitozi u stanicu, predstavlja dobar kandidat za površinskog modifikatora. Horak i sur., 2007, sintetizirali su maghemitne nanočestice D-manoza-γ-Fe_2O_3 koje su okarakterizirane kao male čestice, stabilne u otopini, slabije podložne oksidaciji od magnetitnih te su ih stanice internalizirale. Također su detektirane metodom MRI što ih čini potencijalnim supstancama za praćenje bioloških uzoraka magnetskom rezonancom.

1.4. Upotreba SPION-a za praćenje i vizualizaciju bioloških sustava metodom MRI

Tehnika oslikavanja anatomije procesa u mekom tkivu i organima živog organizma naziva se magnetska rezonanca (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI). Djeluje na principu detekcije u promjeni spinova protona pod utjecajem magnetskog polja i radiovalova. Organizam izložen magnetskom polju i radiovalnom zračenju, mijenja spinsko stanje protona koji se nalaze kao dijelovi atoma tj. molekula sustava. Protoni, ovisno o kemijskom okruženju i prisutnosti vode, se različito relaksiraju što proizvodi slikovni prikaz na kojemu je moguće razlikovati anatomiju organa i tkiva. MRI je tako postala važna tehnika u kliničkoj dijagnostici. Kako bi se poboljšali kontrasti te naglasili određeni dijelovi organa ili tkiva, koriste se kontrastni reagensi. Njihova uloga je skratiti relaksacijsko vrijeme protona vode u dijelovima organizma koji se specifično proučavaju te dodatno naglasiti kontrast. Relaksacijsko vrijeme spina (T1) može biti dugotrajnije, pojačati intenzitet signala i dati pozitivan signal, odnosno svijetli kontrast. Kraće relaksacijsko vrijeme (T2) smanjuje intenzitet signala te daje negativan, tamni kontrast.

Kao kontrastni reagens intenzivno se istražuju SPION-i. Primjena neinvazivne metode MRI uz SPION-e kao kontrastne spojeve, nazire se u *in vivo* praćenju matičnih stanica tijekom terapija, detekciji stanica nakon diferencijacije u tkivnom inženjerstvu, praćenju upalnih procesa, tumora itd. Ovisno o dimenzijama mogu spadati u skupinu T1 ili T2 kontrasta – za T1 se potencijalno mogu koristit SPION-i malih dimenzija, dok za T2 oni s većim radijusom. Osim što će dimenzije nanočestica utjecati na vrstu i kvalitetu kontrasta, utjecati će i na zadržavanje u organizmu. Tako će male SPION-e bubrezi filtrirati veoma brzo, dok će veće retikuloendotelni fagociti efikasno ukloniti. Nadalje, zbog dužeg zadržavanja u organizmu, ali i specifičnog

prepoznavanja stanica i tkiva od interesa bitno je uvođenje površinskih modifikacija. Na taj način se lokalna koncentracija SPION-a povećava, a time i intenzitet kontrasta. Neke vrste SPION-a su odobrene od strane FDA za kliničku upotrebu. Usprkos tomu, ostalo je još mnogo prostora za istraživanje novih čestica koje će specifičnije i snažnije oslikavati kontraste (Esterlich i sur., 2015; Wei i sur., 2016).

1.5. Upotreba SPION-a u tkivnom inženjerstvu hrskavice

Kako su se SPION-i pokazali dobrim kontrastima za MRI, te nekoliko vrsta već u kliničkoj uporabi, njihova primjena se želi proširiti i u svrhu napretka tkivnog inženjerstva. Popravku hrskavičnih ozljeda, koje su ozljede sa slabim potencijalom obnove, se često pristupa metodama tkivnog inženjerstva te bi iznimno korisno bilo pratiti hrskavične presatke nakon vraćanja na mjesto ozljede, a SPION-i se čine kao potencijalno rješenje.

1.5.1 Svojstva hrskavičnog tkiva

Hrskavica je vezivno tkivo, građeno od hrskavičnih stanica, hondrocita, i izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix,* ECM) kojeg luče sami hondrociti te daje potporu i olakšava trenje kosti i mišića u nosu, ušima, trahejama, zglobovima, kralješcima. ECM se sastoji od makromolekularnih tvorevina kolagena II, IX i XI koji čine kolagensku mrežu i agrekana. Agrekan je proteoglikan što znači da ima proteinsku okosnicu koja je glikozilirana dugim lancima šećera – glikozaminoglikana koji se sastoje od ponavljajućih podjedinica disaharida. Najčešći glikozaminoglikani hrskavice su hondroitin sulfat i keratan sulfat koji doprinose razgranatosti makromolekule i negativnom naboju zbog velikog udjela sulfata. Još jedna sastavnica matriksa je polisaharid hijaluronan koji omogućuje vezanje hondrocita za matriks preko agrekana. Osim što ga veže hijaluronan, agrekan je još dodatno zarobljen u kolagenskoj mreži. Nadalje, pojedinačni ili u skupinama hondrociti se zatvaraju unutar fluidne kapsule zvane hondron. Hondroni obavija kolagenska mreža te su se pokazali kao veoma čvrste strukture, otporne na pritisak. Ova specifična građa daje hrskavici stabilna mehanička svojstva za potporu kostima, mišićima i zglobovima (Han i sur., 2011; Muir, 1995).

Za razliku od drugih tkiva, hrskavica je bogatija izvanstaničnim matriksom no stanicama te ne sadrži krvne i limfne žile niti živčane nastavke. Pošto nemaju izravan izvor hranjivih tvari, one dopiru do hondrocita difuzijom iz okoline. Stoga se nalaze u manjim koncentracijama kisika

no ostala tkiva, te energiju dobivaju fermentacijom glukoze u mliječnu kiselinu, kao što se inače zbiva u anaerobnim uvjetima. Također, hondrociti su dugoživuće stanice te nakon diferencijacije u zglobnu hrskavicu se više ne dijele kao i sami kolageni koji se starenjem troše. U normalnim uvjetima u organizmu, hondrociti su metabolički pasivne stanice te ukoliko ne dođe do oštećenja su, zajedno sa svojim komponentama veoma dugotrajne (Muir, 1995).

1.5.2. Tkivno inženjerstvo hrskavice

Regenerativna medicina je područje istraživanja koje, uz pomoć metoda tkivnog inženjerstva i saznanja o molekularnim mehanizmima, pokušava popraviti, zacijeliti ili zamijeniti oštećena tkiva i organe. Misao vodilja regenerativne medicine je autologna zamjena tkiva gdje se stanice, najčešće matične, izoliraju iz pacijenta, proliferiraju i/ili diferenciraju u *in vitro* uvjetima te presade na oštećeno područje. Metode tkivnog inženjerstva pokušavaju imitirati originalno tkivo ili organ, morfološki i funkcionalno. Kombiniraju prikladne stanice sa odgovarajućim faktorima rasta i nosačima koji su biokompatibilni materijali koji podupiru razvoj stanica u trodimenzionalnu (3D) strukturu (Hoshi i sur., 2012).

Hrskavično tkivo ima slab regeneracijski potencijal te ako se šteti zbog bolesti, starosti, deformacija ili ozljeda, vjerojatno neće doći do samoobnove. Problem je što tkivo veoma kompaktno zbog velike količine izvanstaničnog matriksa, nema povezanosti sa cirkulacijom, a stanice su izolirane u hondronima te progenitorske stanice iz krvotoka ne mogu doprijeti do mjesta ozljede (Bahardwaj i sur., 2014). Iako je dokazano kako postoji određena zaliha progenitorskih stanica hondrocita koje se kreću prema oštećenju u hrskavici, njihova uloga u reparaciji nije još razjašnjena kao ni njihov regenerativni potencijal (Chagin i Medvedeva, 2017). Nadalje, manje ozljede mogu napredovati do kosti koju zglobna hrskavica štiti, zbog neprestanog trenja zgloba tijekom kretanja. Zbog navedenih faktora, neprestano se razvijaju i nadograđuju pristupi liječenja hrskavičnih ozljeda. Jedan od istraživanih pristupa je popravak ozljede pomoću hrskavičnih presatka. Kod ovog pristupa, hondrociti pacijenta se izoliraju s dijela zglobne hrskavice koji je pod manjim opterećenjem. Potom se umnože u *in vitro* staničnoj kulturi te se nasađuju na biološki podudaran nosač, kada je broj stanica dostatan. Nakon nekoliko tjedana 3D kulture na nosačima, uz dodatak prikladnih faktora rasta, hondrociti počinju lučiti vlastiti ECM i stvarati strukturu zglobne hrskavice u *in vitro* uvjetima. Hrskavični presadak se operacijom vrati na mjesto ozljede te je potrebno pratit proces oporavka. Popravljanje ozljede pomoću hrskavičnih

presatka se već provodi u klinici te se novi pristupi neprestano ispituju u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima (Makris i sur., 2015).

1.5.3. Kultivacija hondrocita

Kod tkivnog inženjerstva hrskavice potrebno je prvo umnožiti hondrocite koji u adherentnoj kulturi pokazuju određena specifična ponašanja te prolaze kroz proces dediferencijacije. To znači da dolazi do promjene ekspresije gena što utječe na fenotip hondrocita te rezultira manje diferenciranim stanjem stanica. Kultivirani hondrociti fenotipski podsjećaju na fibroblaste te ne zadržavaju svoj karakterističan okrugao oblik. Nadalje, uočena je i promjena ekspresije gena koji igraju ključnu ulogu u održavanju fenotipa hondrocita. Sinteza komponenti izvanstaničnog matriksa, kao kolagena II, kolagena IX i agrekana, je negativno regulirana, dok se sintetizira kolagen I, polipeptid koji u zglobnim hondrocitima inače nije eksprimiran. Osim toga, cijeli niz gena koji utječu na sastav ECM-a je različit kod dediferenciranih hondrocita u kulturi no kod zrelih hondrocita u hrskavičnom tkivu. Ekspresija površinskih receptora koji obično stupaju u interakciju s komponentama ECM-a je također narušena. Iako su potvrđeni neki od markera pluripotentnosti, razlika između mezenhimskih matičnih stanica i dediferenciranih hondrocita je nedvojbena te dediferencirani hondrociti ne prelaze u stanje matičnosti.

Dediferencirani hondrociti imaju mogućnost rediferencijacije u zrele hondrocite koji nanovo eksprimiraju specifične markere poput kolagena II i agrekana. Kako bi došlo do rediferencijacije potrebno je prilagoditi uvjete kulture jer u adherentnoj kulturi proces nije moguć. Trodimenzionalni uvjeti kulture, gdje stanice mogu međusobno stupati u interakciju ili stupati u interakciju s nosačem izuzetno su povoljne za rediferencijaciju. Također, niže razine kisika pospješuju proces jer se hondrociti *in vivo* nalaze u uvjetima smanjene razine kisika. Stanice imaju i svoj vijek trajanja nakon kojeg dođu do nepovratne dediferencijacije. To je broj od 4 ili 5 pasaža, točnije broj presađivanja iste stanične linije. Stoga je važno pažljivo kultivirati hondrocite te uzeti u obzir njihova svojstva u staničnoj kulturi (Schulze-Tanzil, 2009; Caron i sur., 2012).

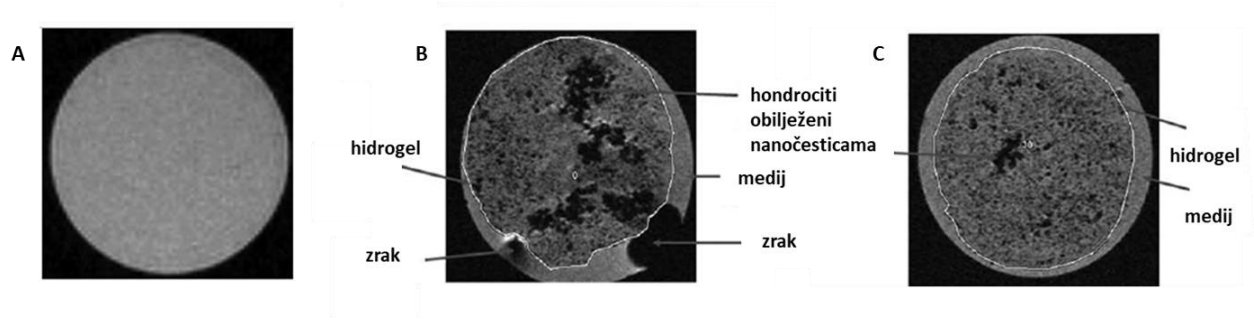
1.5.4. Pretklinička ispitivanja u tkivnom inženjerstvu zglobne hrskavice

Životinjski modeli su još uvijek neizostavan dio pretkliničkih istraživanja točnije istraživanja koja se provode radi provjere sigurnosti novih metoda liječenja prije ispitivanja na čovjeku. Mali životinjski modeli, poput glodavaca, prikladni su za proučavanje mehanizama

djelovanja, probira lijekova, supstanci ili naprava za daljnja istraživanja na velikim animalnim modelima. Veliki animalni modeli, kao što su psi, konji, ovce i koze, su reprezentativniji prikaz kako će ispitivana supstanca djelovati na čovjeka. Kada je u pitanju hrskavica, glodavci imaju različite karakteristike no veliki životinjski modeli i ljudi. Zglobovi glodavaca su mali, a zglobna hrskavica veoma tanka te imaju mogućnost stvaranja nove hrskavice kroz život. S druge strane, ozljeda hrskavice i načini liječenja kod velikih životinja će imati sličnije posljedice kao kod ljudi. Prilikom izvođenja eksperimenta na zglobnoj hrskavici modelne životinje preporuča se od strane FDA paziti na nekoliko stvari. Potrebno je odabrati prikladnu životinju s obzirom na mogućnost izvedbe eksperimenta na zglobu, debljinu hrskavice, vrstu, veličinu i mjesto ozljede te postupanje sa životinjom nakon operacije i točne pokuse za procjenu ishoda tretmana i operacije zgloba. Nadalje, treba odrediti starost životinje u kojoj su kosti i zglobne hrskavice sazrjele te razmotriti sve dijelove koji čine zglob. Također, potrebno je odrediti relevantne kontrolne skupine životinja. Studija bi trebala trajati određeno vrijeme, svakako dulje od 6 mjeseci kako bi se detaljno mogle istražiti posljedice tretmana i operacije. Nakon obavljenog postupka popravka zglobne hrskavice, ozlijeđeno mjesto se vizualizira magnetskom rezonancom ili provjerava kirurški, procjenjuje se reakcija tkiva i životinje u vidu boli, izljeva i mišićne mase te mogućnost kretanja. Na tkivu se obavljaju biokemijske i histološke analize te ukupna analiza sinuvijalne tekućine koja okružuje zglob, mjesta popravka i okolnih područja te kosti koju zglob štiti. Stoga, važno je pravilno isplanirati i izvesti eksperiment na životinjama, uzimajući u obzir etičnost te brigu za životinje, kako bi istraživanje bilo reprezentativno za daljnja klinička ispitivanja (Cook i sur., 2014).

1.5.5. Vizualizacija hrskavičnih presadaka pomoću SPION-a

Tehnika MRI postala neizostavan dijagnostički alat u vizualizaciji popravka hrskavičnih i drugih ozljeda. Liječenju ozljeda se sve više pristupa iz perspektive tkivnog inženjerstva ne samo zbog popravka ozljede, već i zbog zacjeljivanja - potpunog povratka morfologije i funkcije starog tkiva. Stoga je potrebno što bolje utvrditi što se događa sa terapijskim tkivom ili presatkom nakon transplantacije. Tu se nazire moguća primjena kontrastnih reagensa koji bi omogućili praćenje transplantiranih stanica na mjestu ozljede. SPION-i su se pokazali kao potencijalno rješenje za praćenje tkivnih konstrukta unutar organizma (Slika 1). Radi procjene kvalitete i djelovanja hrskavičnih presatka, korisno bi bilo pratit raspored i zadržavanje hondrocita u presatku nakon transplantacije u organizam (Ramaswamy i sur., 2009).



Slika 1. Vizualizacija i praćenje hondrocita u hrskavičnom presatku na podlozi od hidrogela metodom magnetske rezonance. SPION-i (engl. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) daju crni kontrast te se zadržavaju unutar hondrocita. **A)** Neobilježeni hondrociti nakon 30 dana diferencijacijske kulture, **B)** Obilježeni hondrociti SPION-ima prije diferencijacijske kulture, **C)** obilježeni hondrociti SPION-ima nakon 30 dana (Ramaswamy i sur., 2009).

1.6. Cilj istraživanja i hipoteza

Superparamagnetske nanočestice željezovih oksida su tijekom dosadašnjih istraživanja pokazale izniman potencijal kao kontrasti za vizualizaciju stanica i tkiva magnetskom rezonancom. Zbog nemogućnosti samoobnove u organizmu, kultivacija i mogućnost presađivanja *in vitro* uzgojene hrskavice se intenzivno proučava. U pretkliničkim istraživanjima često se koriste modelne životinje, od kojih je posebno zanimljiva ovca čiji se hondrociti nosnog septuma već koriste za proizvodnju hrskavičnih presadaka. Cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj superparamagnetskih nanočestica Fe_3O_4-SiO_2-PEG i D-manoza-γ-Fe_2O_3 na preživljenje i diferencijacijski kapacitet hondrocita izoliranih iz nosnog septuma ovce. Pretpostavka je kako nanočestice neće imati nepovoljan utjecaj na preživljenje niti diferencijaciju te da će to biti podloga za primjenu u daljnjim istraživanjima. Hondrociti će se umnožiti u adherentnoj kulturi nakon čega će se tretirati nanočesticama. Ispitat će se toksičnost i biološka podudarnost te uspješnost obilježavanja stanica nanočesticama. Provjerit će se rediferencijacijski potencijal hondrocita u prisutnosti nanočestica te uspješnost obilježavanja hondrocita tijekom hondrogeneze u 3D kulturi. Ovo istraživanje doprinijelo bi daljnjem proučavanju nanočestica u svrhu vizualizacije i praćenja hrskavičnih stanica i presadaka te boljem razumijevanju djelovanja PEG-om i D-manozom obloženih SPION-a na hondrocite u adherentnoj i trodimenzionalnoj staničnoj kulturi.

2. METODE

2.1. Kultura primarnih hondrocita izoliranih iz nosnog septuma ovce

Stanice korištene u svim eksperimentima su hondrociti izolirani iz hrskavice nosnog septuma ovce. Biopsije nosnog septuma ovce su provedene na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz odobrenje etičkog povjerenstva. Hondrociti izolirani iz nosnog septuma ovce proliferirani su 14 dana, tripsinizirani u pasaži 2 te smrznuti i pospremljeni na -80°C u mediju za smrzavanje koji se sastoji od 10% DMSO (engl. *dimethyl sulfoxide*, Sigma- Aldrich, Njemačka) i 90%-tnog fetalnog goveđeg seruma (FBS, engl. *fetal bovine serum*, Gibco, USA). Suspenzija stanica je odleđena na sobnoj temperaturi, centrifugirana 5 min pri 300 g. Medij za zamrzavanje je uklonjen, a talog hondrocita resuspendiran u osnovnom mediju koji se sastoji od: medija DMEM s visokim udjelom glukoze (engl. *Dublecco's Modified Eagle's Medium – high glucose*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka), 10%-tne otopine FBS-a, 1%-tnog pufera HEPES (engl. *hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*, Gibco, USA), 1%-tne otopine natrijeva piruvata (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) i 1%-tne mješavine antibiotika penicilin-streptomicin-glutamin (Gibco, USA) uz dodatak faktora rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor - 2*, FGF-2, R&D Systems, USA) u koncentraciji 5 ng/ml. Hondrociti su potom prebačeni u bočicu za staničnu kulturu volumena 75 mm^2 s filter-čepom te uzgajani u inkubatoru za staničnu kulturu (Panasonic, MCO-19M) na 37°C pri 5%-tnom CO_2. Nakon 24 h inkubacije stanice se adheriraju na podlogu bočice. Promjena medija se vršila svakih 2 do 3 dana nakon nasađivanja hondrocita, a volumen dodanog svježeg i izbačenog starog medija se određivao prema konfluentnosti stanica.

2.2. Određivanje preživljenja hondrocita bojanjem kristal-violet

Bojanje kristal-violet je kolorimetrijski test pomoću kojeg se određuje vijabilnost stanica na principu vezanja boje kristal-violet za DNA i proteine adherentnih odnosno živih stanica. Mrtve stanice zaostaju u mediju koji se uklanja, a jači intenzitet obojenja odnosno veća apsorbancija proporcionalna je vijabilnosti (Foektistova i sur., 2016).

Nakon proliferacije u staničnoj kulturi, hondrociti su odvojeni od podloge, centrifugirani pri 300 g, 5 minuta te izbrojani pomoću hemocitometra. Zatim su resuspendirani u osnovnom mediju DMEM-HG uz dodatak faktora rasta FGF-2 (c = 5 ng/ml) te nasađeni na tri pločice s

96 jažica. Nasađeni su tako da broj stanica po jažici iznosi 2000, a volumen stanične suspenzije po jažici 200 µl. Pločice su inkubirane 24 h u inkubatoru za staničnu kulturu na 37°C pri 5%-tnom CO_2. Stanice su tretirane nanočesticama Fe_3O_4-SiO_2-PEG (Kostiv i sur., 2017) i nanočesticama D-manoza-γ-Fe_2O_3 (Horak i sur., 2007) u koncentracijama od 2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1} resuspendiranim u osnovnom mediju DMEM-HG uz dodatak FGF-2. Svaka koncentracija je rađena u kvadriplikatu. Negativna kontrola su bile netretirane stanice kojima je promijenjen medij. Pripreme se i prazne kontrole bez stanica (engl. *blank*) koje su sadržavale ista razrjeđenja nanočestica kao i ona kojima su tretirane stanice. Rađene su kako bi se za izračun preživljenja u obzir uzela interferencija nanočestica s kolorimetrijskim testom. Inkubacija traje 24 h, 48 h i 72 h, u inkubatoru za staničnu kulturu na 37°C pri 5%-tnom CO_2. Nakon inkubacije odstranjen je medij i stanice su isprane dva puta s 200 µl fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline,* PBS, Gibco, USA). U svaku jažicu je dodano 50 µl 0,5%-tne boje kirstal-violet (0,5%-tni tris (4-(dismetilamino) fenil) metilni klorid, Fluka Chemie, Buchs, Njemačka) otopljene u 20%-tnom metanolu (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) te je pločica inkubirana 20 min na tresilici pri 30 rpm, na sobnoj temperaturi. Potom je pločica isprana pažljivim uranjanjem u destiliranu vodu kako bi se uklonila nevezana boja. Potrebno je dobro isprati pločicu jer je boja kristal-violet veoma intenzivna. Pločica je sušena između 2 - 24 h. Nakon sušenja, dodan je 100%-tni metanol, 200 µl/jažica te pločica inkubirana 20 minuta na tresilici, 30 rpm, pri sobnoj temperaturi. Očitana je apsorbancija pojedine jažice pri valnoj duljini 560 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Glowmax Multi Detection System, Promega, USA). Računa se preživljenje u odnosu na negativnu kontrolu te u račun uključuju prazne kontrole bez stanica.

2.3. Određivanje preživljenja hondrocita testom isključenja tripanskog modrila

Testom isključenja tripanskog modrila određen je broj živih i mrtvih stanica nakon tretmana nanočesticama. Tijekom brojanja pomoću hemocitometra, u vidnom polju se nalaze plavo obojene, mrtve, stanice kroz čiju narušenu staničnu stjenku je boja mogla proći te neobojene, žive, stanice. Ovim testom su provjereni i rezultati testa preživljenja kristal-violet kako bi se izuzela mogućnost interferencije nanočestica s apsorbancijom uzoraka.

Stanice su nasađene na tri pločice s 24 jažice. Stanična suspenzija je pripravljena uz pomoć osnovnog medija DMEM-HG uz dodatak faktora rasta FGF-2 tako da bude 30 000 stanica

po jažici u 400 µl medija. Nakon 24 h inkubacije u inkubatoru za staničnu kulturu na 37°C pri 5%-tnom CO_2, stanice su tretirane PEG i manozom obloženim nanočesticama u koncentracijama 2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1}, resuspendiranim u osnovnom mediju DMEM-HG uz dodatak faktora rasta FGF-2. Pločice su inkubirane 24 h, 48 h i 72 h. Negativna kontrola su bile netretirane stanice te se svaki tretman radio u triplikatu. Nakon inkubacije, sadržaj pločice je sakupljen u mikrotubicu, jažice su ispirane s 500 µl PBS-a te su stanice odvojene od podloge dodatkom 150 µl 0,25%-tne otopine tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) inkubacijom 4 minute u inkubatoru za staničnu kulturu na 37 °C. Dodan je medij DMEM-HG te se sadržaj jažice prikupio u mikrotubicu s prethodno prikupljenim medijem. Zaostale stanice se dodatno pokupe s 300 µl medija. Svaki uzorak se sakupi u posebnu mikrotubicu te se pomno resuspendira. Nakon resuspendiranja, 50 µl pojedine stanične suspenzije se pomiješa s 50 µl 0,4%-tne otopine tripanskog modrila (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) i inkubira 2 min. Potom se nanosi na hemocitometar i broji pod svjetlosnim mikroskopom (Axiovert, Zeiss).

2.4. Vizualizacija mrtvih i živih hondrocita testom *Live/Dead*

Live/Dead komplet kemikalija sastoji se od fluorescentne boje „*Live*“ koja stupa u interakciju s vijabilnim stanicama te fluorescentnog reagensa „*Dead*“ koji stupa u interakciju s mrtvim stanicama. Membrana živih stanica je propusna za „*Live*“ fluorescentnu boju te je u stanici cijepaju stanične esteraze. Svjetlost valnih duljina do 494 nm pobuđuje novonastali spoj koji potom emitira u zelenom spektru što se detektira kao zelena fluorescencija. Fluorescentni reagens „*Dead*“ se veže za DNA stanica čiji je integritet membrane narušen što pojačava fluorescenciju spoja. Pobuđuje se valnim duljinama do 528 nm te emitira u crvenom spektru (http://www.abcam.com/live-and-dead-cell-assay-ab115347.html).

Za razlikovanje mrtvih od živih stanica i vizualnu potvrdu testova vijabilnosti proveden je test *Live/Dead*. Stanice se nasade na tri pločice s 24 jažice, tako da svaka jažica sadrži 30 000 stanica u 400 µl osnovnog medija. Nakon 24 h inkubacije stanice se tretiraju PEG i manoznim nanočesticama u koncentracijama 2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1} resuspendiranim u osnovnom mediju DMEM-HG uz dodatak FGF-2. Pločice se inkubiraju 24 h, 48 h i 72 h. Prije same detekcije, stanice se ispiru PBS-om, inkubiraju 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku reagensom *Live/Dead* (Abcam, Cambridge, UK), razrijeđenim 1000 puta. Uzorci se pregledaju i

slikaju mikroskopom (Axiovert, Zeiss). Fluorescencija se detektira konvertiranjem slika u programu Image J (https://imagej.nih.gov/ij/).

2.5. Detekcija nanočestica berlinskim modrilom

Berlinsko modrilo - $K_4[Fe(CN)_6]$ – stupa u reakciju s ionima željeza u uzorku te daje plavi, netopivi talog. Pošto nanočestice sadrže željeznu jezgru, ukoliko stupe u interakciju sa stanicama te se tijekom bojanja ne isperu, detektirati će se kao plavo obojenje. Stoga je cilj ove metode detektirati plavo obojenje nanočestica svjetlosnim mikroskopom ukoliko su se zadržale u uzorku.

Hondrociti se nasade u Petrijeve posude promjera 35 mm, 250 000 stanica po posudi u 2 ml medija. Nakon 24 h inkubacije tretirani su PEG i manoznim nanočesticama (koncentracije 2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1}) te ponovno inkubirani 24 h, 48 h i 72 h. Nakon inkubacije, uzorci su nekoliko puta isprani PBS-om, inkubirani u 4%-tnom paraformaldehidu (PFA, Biognost, Hrvatska) 20 minuta na +4°C te nanovo ispirani PBS-om. Potom su inkubirani 5 minuta otopinom boje koja se sastojala od 10%-tne otopine kalijevog heksacijanoferata (II) trihidrata (Carl Roth GmbH, Njemačka) i 20%-tne otopine HCl-a (Carlo Erba Reagents, Italija) pomiješanim u omjeru 1:1, neposredno prije dodavanja na stanice. Reakcija se odvijala u mraku. Stanice su potom bojane kontrastom za jezgre, 0,1%-tnom bojom *Nuclear fast red* (NFR, Biognost Hrvatska), 10 minuta. Potom su ispirane dva puta po 3 minute destiliranom vodom, inkubirane u 96% i 100%-tnom etanolu po 1 minutu. Nakon bojanja, uzorci su pokrivani medijem Biomount (Biognost, Hrvatska) te analizirani i slikani svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51, Japan).

2.6. Uspostavljanje 3D kulture hondrocita

Hondrociti u adherentnoj kulturi prolaze kroz proces dediferencijacije te gube određene hondrogene markere. Radi vraćanja fenotipa karakterističnog za hondrocite u hrskavici, uspostavlja se 3D kultura hondrocita u talogu. U 3D kulturi hondrocita, dediferencirani hondrociti se nalaze u gustom talogu gdje stvaraju međustanične kontakte što omogućuje rediferencijaciju i povratak hondrogenog fenotipa (Caron i sur., 2012).

Hondrociti su nasađivani u bočice za staničnu kulturu zapremine 75 mm^2 i tretirani PEG i manoznim nanočesticama u koncentracijama 2 mgL^{-1} i 20 mgL^{-1} te inkubirani 24 h i 72 h na 37°C pri 5%-tnom CO_2. Nakon inkubacije nanočesticama, stanice su ispirane PBS-om, tripsinizirane 4 minute na 37°C pri 5%-tnom CO_2, centrifugirane 5 minuta na 300 g te

resuspendirane u osnovnom mediju. Potom je suspenzija dediferenciranih hondrocita raspodijeljena u mikrotubice od 1,5 ml u kojima su uspostavljene 3D kulture hondrocita, tako da bude 400 000 stanica po mikrotubici. Mikrotubice sa stanicama su ponovno centrifugirane, 5 minuta na jačini 300 g, supernatant je uklonjen te je dodano 600 µl hondrogenog medija po mikrotubici. Hondrogeni medij se sastojao od medija DMEM-HG s 5%-tnim FBS-om, 1%-tnim puferom HEPES, 1%-tnim natrijevim piruvatom i 1%-tnom mješavinom antibiotika penicilin-streptomicin-glutamin te 0,1 mM askorbinskom kiselinom (Santa Cruz Biotechnology, USA) i humanim inzulinom (Santa Cruz Biotechnology, USA) u koncentraciji 10 µg/ml. Talozi hondrocita su potom kultivirani u inkubatoru za staničnu kulturu na 37°C pri 5%-tnom CO_2 na tresilici snage 30 rpm, te su prikupljani nakon 1, 7 i 14 dana inkubacije. Hondrogeni medij je mijenjan svaka 2 do 3 dana. Dio prikupljenih hondrocita u 3D kulturi je stavljeno u reagens TRIzol® (Invitrogen, USA), po dvije 3D kulture hondrocita u 500 µl reagensa, te pohranjeno na -80°C za analizu RNA. Drugi dio je prikupljen u 4%-tnom PFA za histološke analize i pospremljen na +4°C.

2.7. Fiksacija i parafinizacija 3D kulture hondrocita

3D kulture hondrocita u talozima su fiksirani u 4%-tnom PFA, inkubirane 4 h ili ostavljene preko noći na +4°C. Potom su isprane PBS-om, dva puta po 5 minuta. Nakon toga su uzorci dehidrirani u slijedu etanola, dva puta po 5 minuta. Prvi je bio 50%-tni etanol, zatim 70%, 96% i 100%-tni etanol. Kako bi se isprao alkohol uzorci se inkubiraju u mješavini alkohola i ksilena, 15 minuta. Inkubacija sa čistim ksilenom traje također 15 minuta. Zatim se uzorci parafiniziraju četiri puta po 45 minuta u otopini parafina. Mikrotomom (Leitz, Kanada) se režu na prereze debljine 5 µm te postavljaju na predmetna stakalca te su tada spremni za daljnje histološke analize.

2.8. Histološka analiza prereza 3D kulture hondrocita

Bojanje hemalaun-eozinom standardna je metoda nespecifične vizualizacije histoloških preparata. Često se koristi u dijagnostici tumora i za vizualizaciju tkiva prije imunohistokemijskih bojanja. Hemalaun boji jezgru, točnije nukleinske kiseline, te je tamno plave ili ljubičaste boje, dok eozin nespecifično boji stanične i izvanstanične proteine i daje ružičaste nijanse (Fischer i sur., 2008). Prerezi 3D kulture hondrocita su prvo deparafinizirane tako da su isprane u ksilenu 2 puta po 10 minuta, u 100%-tnom etanolu dva puta po 5 minuta, 96% i 70%-tnom etanolu po

5 minuta te u destiliranoj vodi 5 minuta. Za bojanje hemalaun-eozinom preparati su ispirani u otopini hemalauna, 3 minute, te u otopini eozina, 1 minutu. Potom su preparati isprani u običnoj vodi te uronjeni u sljedeći redoslijed otopina: 96% etanol dva puta, 100% etanol, ksilen dva puta, u svakoj po 2 minute.

Za detekciju izvanstaničnog matriksa prerezi peleta hondrocita su bojani bojom safranin O. Safranin O je kationska boja koja veže kisele komplekse poput proteoglikana i glikozaminoglikana koji tvore izvanstanični matriks hondrocita te daje specifično crveno obojenje. Izvanstanični matrkis hondrociti luče tijekom procesa diferencijacije ka hrskavici stoga boja safranin O je izvrstan indikator hondrogeneze. Također, intenzitet obojenja safraninom O je proporcionalan količini proteoglikana u uzorku (Camplejohn i sur., 1987). Nakon deparafinizacije, uslijedilo je bojanje hemalaunom 5 minuta, ispiranje vodom, uranjanje u kiseli alkohol (500 µl 37%-tnog HCl-a u 200 ml 96%-tnog etanola), inkubacija 0,001%-tnom *Fast Green* bojom 15 minuta, uranjanje u 1%-tnu octenu kiselinu te inkubacija s 0,1%-tnom bojom safranin O. Uslijedili su koraci dehidracije uzorka u 96% i 100% etanolu te ksilenu.

Detekcija nanočestica berlinskim modrilom za prereze 3D kulture hondrocita radi se jednako kao i stanica, osim što su preparati prije bojanja deparafinizirani po opisanom postupku te nakon bojenja dehidrirani i uronjeni u ksilen kako je opisano u prvom ulomku ovog poglavlja.

2.9. Izolacija RNA iz hondrocita u 3D kulturi

Hondrociti u reagensu TRIzol®, uzeti 7. i 14. dan 3D kulture, bili su homogenizirani uz pomoć wolframovih kuglica i uređaja za homogenizaciju (Retsch, Njemačka) pri 30 Hz, 7 minuta. Uzorci izolirani 1. dan su bili resuspendirani u reagensu TRIzol®. Na uzorke je dodano 100 µl kloroforma, te su potom vorteksirani, inkubirani 3 minute na sobnoj temperaturi te centrifugirani pri 12 000 rpm-a, 15 minuta na +4°C. Na vodenu fazu, prebačenu u novu mikrotubicu, je dodano 250 µl izopropanola i 0,3 µl glikogena te intenzivno vorteksirano. Uzorci su potom inkubirani na sobnoj temperaturi 10 minuta te centrifugirani 10 minuta pri 12 000 rpm-a na +4°C. Supernatant je odliven, a talog ispran 75%-tnim etanolom, 500 µl, i centrifugiran 5 minuta pri 15 000 rpm na +4°C. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je sušen 10 minuta na zraku kako bi ostatak etanola ispario. Dodana je voda koja sadrži dietilpirokarbonat (engl. *diethyl pyrocarbonate*, DEPC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) na talog uzoraka te su svi zajedno inkubirani na termobloku pri 55°C, dva puta po 5 minuta uz miješanje. Koncentracija izolirane RNA je mjerena

na uređaju *Nanodrop* (Thermo Fischer Scientific, USA). Uzorci su pohranjeni na -80°C do upotrebe.

2.10. Tretman DNazom i reverzna transkripcija RNA

Izolirana RNA je tretirana DNazom kako bi se pocijepala kontaminirajuća DNA. U mješavinu za tretman DNazom prema tablici 2 su dodani volumeni vode DEPC, DNaze I, 10x pufera (Thermo Scientific, USA) te hondrocitne RNA. Reakcijska smjesa je vorteksirana i lagano centrifugirana kako komponente ne bi zaostale na stijenci mikrotubice. Inkubirana je 60 minuta na 37°C, nakon čega je u uzorke dodan 1 µl otopine EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid,* Thermo Scientific, USA) te sve zajedno inkubirano još 10 minuta na 65°C.

Tablica 2. Volumen reakcijske smjese za tretman DNazom. Koncentracije RNA utvrđene nakon procesa izolacije.

Sastojak reakcijske smjese	Volumen (µl)
Voda DEPC	Ovisno o dodanom volumenu RNA
10x pufer	2
DNaza I	1
RNA	Određen prema formuli $\frac{V(RNA) = 1\ \mu g}{c\ (RNA)}$

*DEPC: dietilpirokarbonat, engl. *dyethil pyrocarbonate*

Za reverznu transkripciju se napravi reakcijska smjesa (Applied Biosystems, USA) prema tablici 3. Na 10 µl reakcijske smjese je dodano 10 µl RNA tretirane DNazom. Reverzna transkripcija se provodi pri slijedećim uvjetima: inkubacija uzoraka na 25°C, 10 minuta, na 37°C, 120 minuta te na 85°C, 5 minuta. Uzorci su razrijeđeni s 5 µl vode koja ne sadrži nukleaze (miliQ) te pohranjeni na -20°C.

Tablica 3. Volumen jedne reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

Sastojak reakcijske smjese	Volumen (µl)
Voda bez nukleaza (miliQ)	3,2
10x RT pufer	2
10x RT nasumične početnice	2
25x dNTP mješavina (100 mM)	0,8
Inhibitor Rnaze	1
Reverzna transkriptaza MultiScribe™, 50 U/µl	1

2.11. Analiza ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu

Kvantitavnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) istražena je ekspresija gena kolagena I, kolagena II i agrekana. Kolagen II i agrekan su markeri hondrogeneze te glavne komponente izvanstaničnog matriksa hrskavice, a kolagen I većinski eksprimiraju nediferencirani hondrociti. Kao endogena kontrola korišten je enzim gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH). Korišteni uzorci su stanice inkubirane manoznim nanočesticama 24 h i 72 h te uzete nakon 1., 7. i 14. dana u 3D kulturi. Slijed korištenih početnica se nalazi u tablici 4. F (engl. *forward*) i R (engl. *reverse*) početnice za komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) gena GAPDH (Macrogen, LIGO, Južna Koreja) su preuzete od Garza-Veloz i sur., 2013, a F i R početnice za ostale cDNA (Macrogen, LIGO, Južna Koreja) su dizajnirane uz pomoću internetskog servera Primer Quest Tool te validirane Amplify v1.5.4 programom. Reakcijska smjesa je pripremljena prema tablici 5. Na pločice od 96 jažica nanosi se 19 µl reakcijske smjese i 1 µl uzorka cDNA te se svaki uzorak radi u duplikatu. Ciklusi umnažanja u uređaju za PCR (7500 Fast Real-Time PCR System) su podešeni prema tablici 6. Dobiveni podaci su analizirani komparativnom C_T ($\Delta\Delta C_T$) metodom i spremljeni u programskom paketu 7500 Software v2.0.6.

Tablica 4. Sljedovi R i F početnica korištenih za umnažanje metodom qPCR i pripadajuće temperature taljenja.

Naziv početnice	Slijed F (5'→3') i R (5'→3')	Tm (°C)
Kolagen I	F: 5' GGT GAC AGG AAG TCC CAG AA 3'	60,5
	R: 5' CCA TCG TAG GTG ACG CTG TA 3'	60,5
GAPDH	F: 5' GAT TGT CAG CAA TGC CTC CT 3'	58,4
	R: 5' AAG CAG GGA TGA TGT TTT GG 3'	56,4
Kolagen II	F: 5' GAC AAA GGA GAA ACT GGA GAG 3'	59,4
	R: GGA TTC CGT TAG CAC CAT CTT 3'	59,4
Agrekan	F: 5' CCC AAC TGA TGC TTC TAT CC 3'	58,4
	R: CAC AGC TTC TGG TCA ATC TC 3'	58,4

Tablica 5. Reakcijska smjesa za jednu qPCR reakciju.

Sastojak reakcijske smjese	Volumen (µl)
miliQ voda	8,2
Power SYBR® Green PCR Master Mix	10
F početnica	0,4
R početnica	0,4
komplementarna DNA	1

Tablica 6. Uvjeti qPCR reakcije.

Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
50	20 s	1
95	10 min	
95	15 s	40
58	1 min	
95	15 s	1
60	1 min	
95	30 s	
60	15 s	

3. REZULTATI

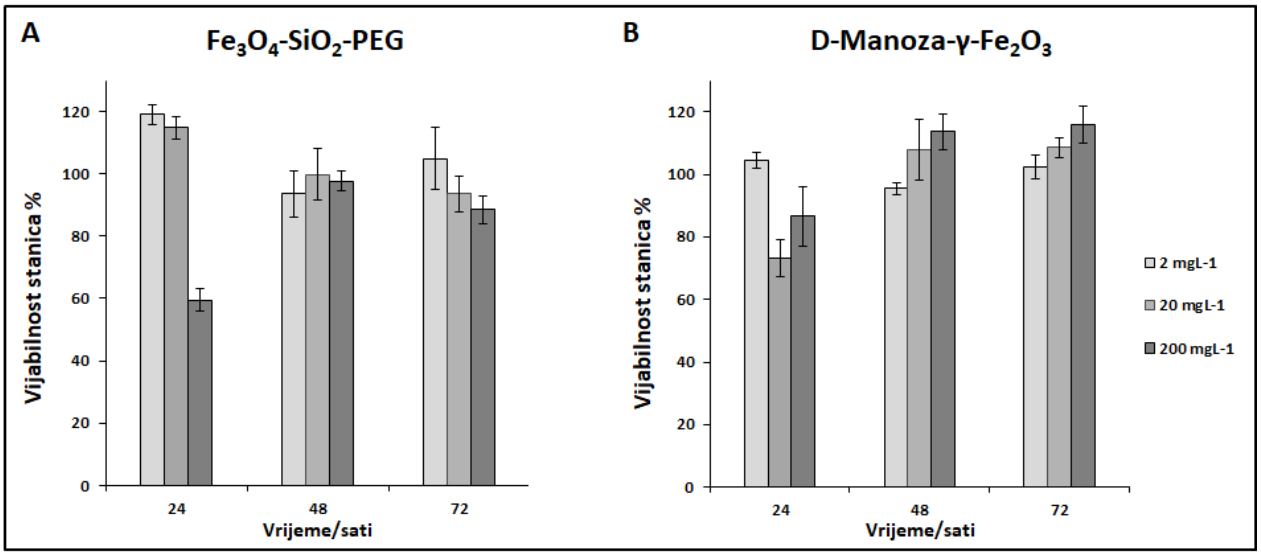
3.1. Preživljenje hondrocita u adherentnoj kulturi nakon tretmana nanočesticama

Pomoću testova preživljenja provjerila se citotoksičnost nanočestica Fe_3O_4-SiO_2-PEG (nanočestice PEG-a) i D-manoza-γ-Fe_2O_3 (nanočestice manoze) na hondrocite u adherentnoj kulturi kako bi se utvrdilo jesu li nanočestice sigurne za daljnje eksperimente na ovom tipu stanica. Hondrociti u adherentnoj kulturi su umnoženi, nasađeni na pločice i inkubirani 24 h, 48 h i 72 h nanočesticama PEG-a i manoze. Obje vrste nanočestica su razrijeđene na koncentracije 2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1} kako bi se utvrdila toksičnost u širem rasponu koncentracija. Provedena su dva testa preživljenja, bojanje kristal-violet i test isključenja tripanskog modrila. Bojanjem kristal-violet ispitana je citotoksičnost na prinicpu mjerenja apsorbancije obojenih stanica koje su ostale adherentne, odnosno žive. Testom isključenja tripanskog modrila izravno se odredio broj živih stanica u pojedinom tretmanu na temelju čega je određeno preživljenje te proliferacija, odnosno mogućnost diobe stanica u prisutnosti nanočestica kroz 72 h. Testom *Live/Dead* vizualizirane su žive, odnosno mrtve stanice, ovisno o fluorescentnom signalu koji su emitirale – zeleni signal živih ili crveni signal mrtvih hondrocita.

3.1.1. Preživljenje hondrocita određeno bojanjem kristal-violet

Preživljenje tj. vijabilnost stanica određena je u odnosu na kontrolne, netretirane, stanice te je praznim kontrolama napravljena korekcija apsorbancija zbog moguće interferencije nanočestica i testa. Nakon 24h inkubacije hondrocita nanočesticama PEG-a i manoze u različitim koncentracijama, hondrociti pokazuju visok udio vijabilnih stanica u odnosu na kontrolu. Niže vijabilnosti su detektirane kod uzoraka tretiranih s 200 mgL^{-1} nanočestica PEG-a te 20 mgL^{-1} nanočestica manoze. Poslije 48 h inkubacije nanočesticama PEG-a, vijabilnost stanica tretiranih dvjema nižim koncentracijama opada, no još uvijek se kreće oko visokih vrijednosti (119,1% → 93,6% kod 2 mgL^{-1}; 114,9% → 99,8% kod 20 mgL^{-1}). Stanice tretirane koncentracijom 200 mgL^{-1} pokazuju pozitivan trend vijabilnosti (59,5% → 97,7%). Postotak vijabilnosti stanica tretiranih nanočesticama PEG-a u koncentracijama 2 mgL^{-1} i 20 mgL^{-1} opada nakon 72 h inkubacije, dok stanice tretirane najvišom koncentracijom pokazuju povećanje vijabilnost (Slika 2A).

Kod nanočestica manoze zamjećuje se porast postotka vijabilnosti kroz 72 h za koncentracije 20 mgL^{-1} (73,1% → 107,8% → 108,5%) i 200 mgL^{-1} (86,5% → 113,6% → 115,9%). Visok postotak vijabilnosti pokazuju i stanice tretirane koncentracijom 2 mgL^{-1}. Nakon 48 h inkubacije vijabilnost im opada, dok se nakon 72 h kreće prema početnoj vrijednosti (104,5% → 95,4% → 102,3%) (Slika 2B). Prema tome tretmani određenim koncentracijama nanočestica, poput 2 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1} nanočestica PEG-a te 2 mgL^{-1} nanočestica manoze, ne prate niti pozitivan niti negativan trend te su postotci vijabilnosti za sve tretmane visoki.

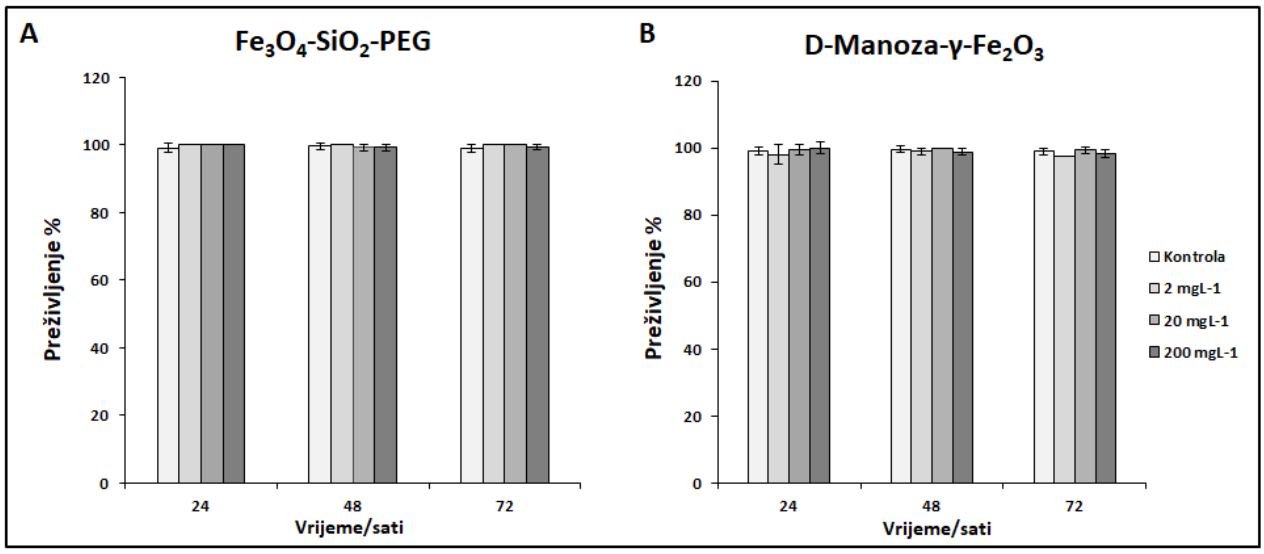


Slika 2. Vijabilnost hondrocita određena bojanjem kristal-violet nakon tretmana **A)** nanočesticama PEG-a i **B)** nanočesticama manoze. Stanice su inkubirane nanočesticama 24 h, 48 h i 72 h razrijeđenim u osnovnom mediju DMEM-HG uz dodatak faktora rasta FGF-2 u koncentracijama 2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1}. Vijabilnost je izražena kao postotak preživjelih stanica nakon tretmana nanočesticama u odnosu na vijabilnost kontrolnih, netretiranih stanica. Na svakom stupcu su prikazane okomite linije standardne devijacije koje ukazuju na odstupanja od srednje vrijednosti vijabilnosti.

3.1.2. Preživljenje i proliferacija hondrocita određeni testom isključenja tripanskog modrila

Testom isključena tripanskog modrila je određen ukupan broj stanica u uzorku te su izračunati postoci živih stanica pojedinog tretmana i proliferacija. Postotci preživljenja za stanice tretirane PEG-nanočesticama kreću se između 99% i 100% za sve tri korištene koncentracije (2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1}). Također, tijekom tri različita vremena inkubacije – 24 h, 48 h i 72 h, postotak preživljenja ne opada te se kreće između 99 i 100% (Slika 3A). Stanice tretirane istim koncentracijama nanočesticama manoze također pokazuju visoke postotke preživljenja, od

97,6% do 100% koji se zadržavaju kroz tri vremenska intervala (Slika 3B). Preživljenje hondrocita nakon tretmana PEG i manoznim nanočesticama je približno jednako kao kod kontrole.

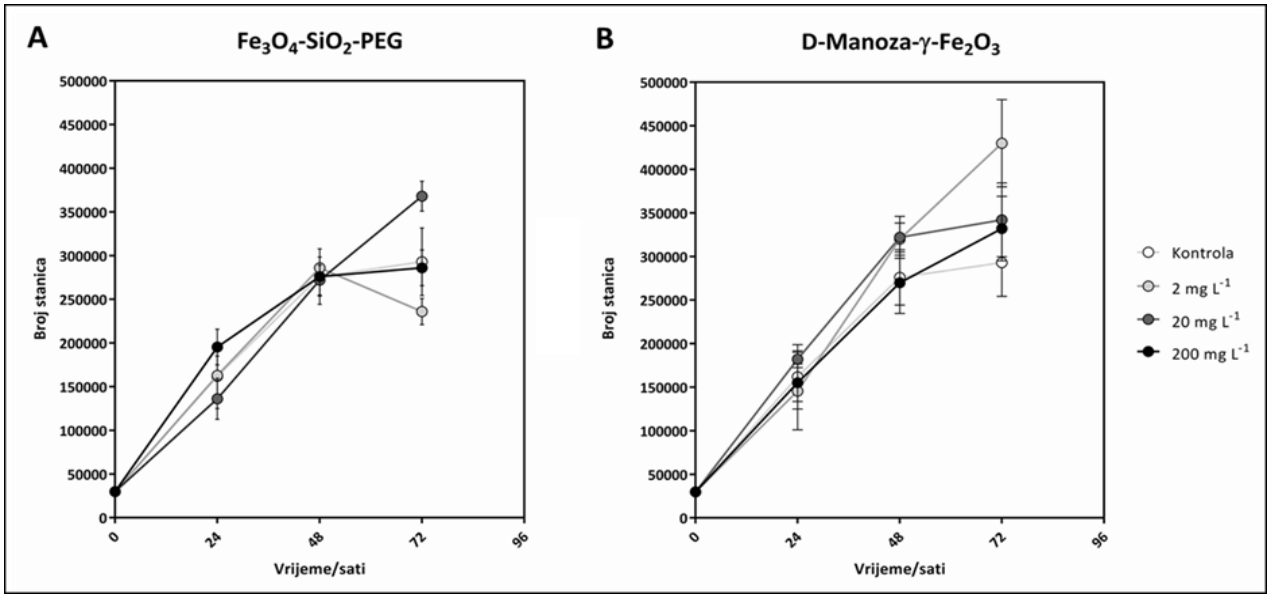


Slika 3. Postotak preživljenja hondrocita u adherentnoj kulturi određen testom isključenja tripanskog modrila. Stanice su tretirane **A)** nanočesticama PEG-a i **B)** nanočesticama manoze u koncentracijama 2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1}, resuspendiranim u osnovnom mediju DMEM-HG uz dodatak faktora rasta FGF-2, te inkubirane 24 h, 48 h i 72 h. Kontrola su netretirani hondrociti. Na stupcima su prikazane okomite linije standardne devijacije koje ukazuju na odstupanja od srednje vrijednosti preživljenja.

Proliferacija, točnije stopa diobe stanica, provjerena je pomoću vrijednosti korištenih za određivanje preživljenja pomoću tripanskog modrila. Praćeni su hondrociti kroz 72 sata inkubacije nanočesticama PEG-a i manoze u koncentracijama 2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1}. Broj hondrocita prilikom nasađivanja je bio 30 000 stanica po jažici. Kontrola su bile netretirane stanice. Kod hondrocita tretiranih nanočesticama i PEG-a i manoze vidi se značajan porast broja stanica kroz 24 h. Kod stanica tretiranih nanočesticama PEG-a je broj u rasponu od 135 000 – 200 000, dok kod stanica tretiranih nanočesticama manoze je raspon sličniji, od 145 000 – 180 000. Nakon 48 h inkubacije nanočesticama PEG-a, kontrolne stanice i stanice tretirane različitim koncentracijama nanočestica su ujednačeno proliferirale te se našle između vrijednosti 272 000 – 286 000 stanica/jažica. Nakon 72 h tretmana, kontrolne stanice i stanice tretirane nanočesticama PEG-a u koncentraciji 200 mgL^{-1} pokazuju usporen rast, a stanice

tretirane koncentracijom 2 mgL^{-1} pokazuju negativan trend proliferacije. Stanice tretirane srednjom koncentracijom nanočestica nastavljaju pozitivan proliferacijski trend (Slika 4A).

Stanice tretirane nanočesticama manoze svih koncentracija i kontrolne stanice nakon 48 h inkubacije pokazuju intenzivan proliferacijski kapacitet. Nakon 72 h tretmana, najizraženija proliferacija je kod stanica tretiranih koncentracijom 2 mgL^{-1}, dok stanice tretirane dvama većim koncentracijama, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1}, ostaju u pozitivnom usporenom trendu. Netretirana kontrola, također pokazuje pozitivan porast broja stanica, no sporiji od tretiranih stanica (Slika 4B). Nadalje, kontrolne stanice za obje vrste nanočestica pokazuju jednak prosječan broj, 293 000 stanica/jažica, nakon 72 h inkubacije. Također, uočava se kako stanice tretirane nanočesticama manoze proliferiraju intenzivnije no stanice tretirane nanočesticama PEG-a u odnosu na netretiranu kontrolu.



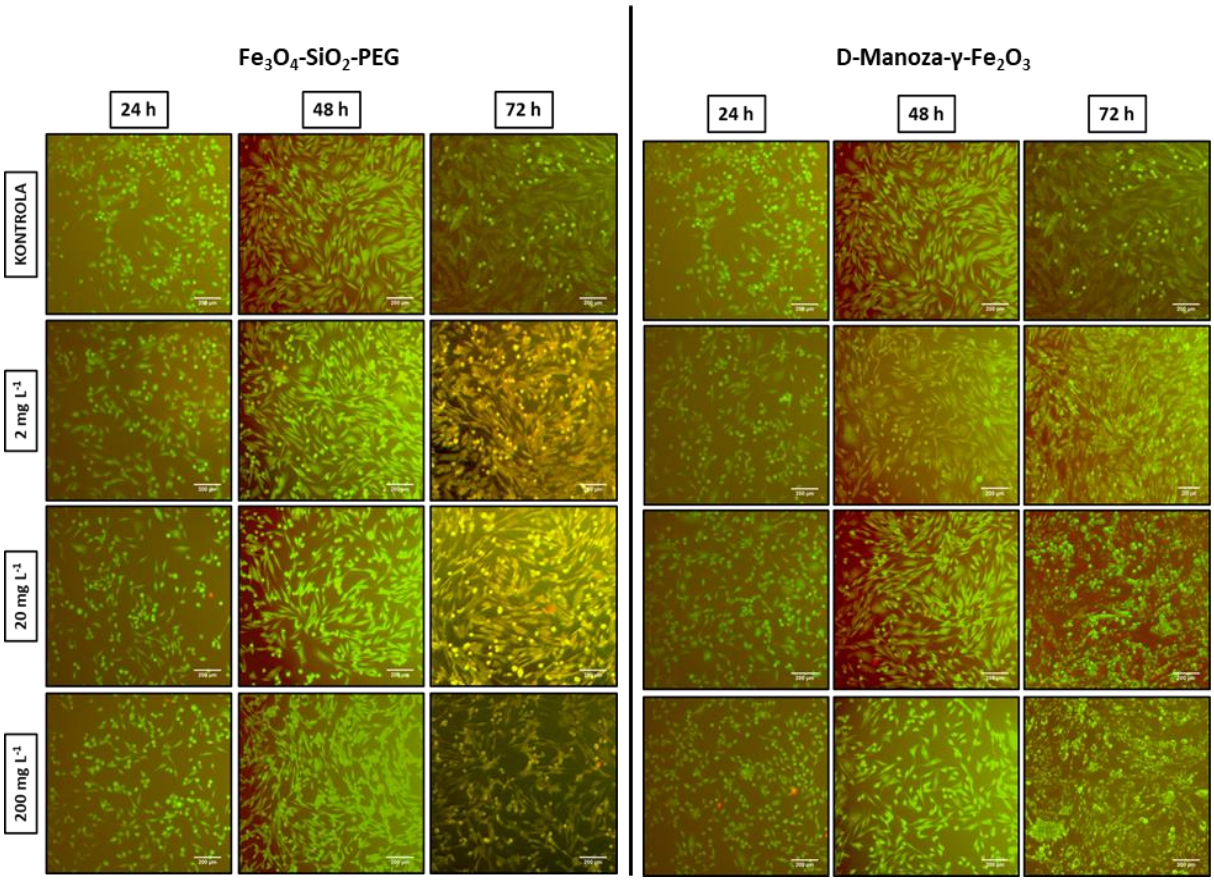
Slika 4. Praćenje proliferacije hondrocita tijekom 72 h tretmana nanočesticama testom isključenja tripanskog modrila. Početni broj stanica je bio 30 000 (crna točka na osi Y), kontrola su netretirane stanice. **A)** Krivulja rasta stanica nakon 24 h, 48 h i 72 h inkubacije nanočesticama PEG-a u koncentraciji 2 mgL^{-1}, 20 mgL^{-1} i 200 mgL^{-1}. **B)** Krivulja rasta stanica za stanice tretirane nanočesticama manoze.

3.1.3. Vizualizacija živih i mrtvih stanica testom *Live/Dead*

Hondrociti nakon tretmana nanočesticama PEG-a i manoze su analizirani testom vijabilnosti *Live/Dead* koji omogućuje zeleno fluorescentno bojanje živih i crveno mrtvih stanica

što se detektira fluorescentnim mikroskopom. Koncentracije obje vrste nanočestica su bile 2, 20 i 200 mgL^{-1} te su stanice inkubirane nanočesticama 24, 48 i 72 h.

Detekcija fluorescencije, nakon provođenja testa *Live/Dead*, prikazana je na slici 5 za uzorke tretirane nanočesticama PEG-a i manoze. Netretirane stanice su kontrola. Kod tretmana nanočesticama PEG-a, mrtve stanice koje fluoresciraju crveno se mogu naći u nekoliko uzoraka (20 mgL^{-1} i 24 h inkubacije i 2 mgL^{-1} nakon 48 h inkubacije). Uzorci tretirani nanočesticama PEG-a, nakon 72 h tretmana, pokazuju slabiju zelenu fluorescenciju te veću koncentraciju crvene fluorescencije. Hondrociti tretirani nanočesticama manoze pokazuju tragove crvene fluorescencije kod uzoraka tretiranih koncentracijom 200 mgL^{-1} nakon 24 h te tretiranih koncentracijom 20 mgL^{-1} nakon 48 h inkubacije. Osim pojedinih mrtvih stanica i slabije zelene fluorescencije uzoraka tretiranih nanočesticama PEG-a 72 h, većina uzoraka emitira u zelenom spektru što znači da su stanice u trenutku detekcije stupile u interakciju s „*Live*“ spojem.

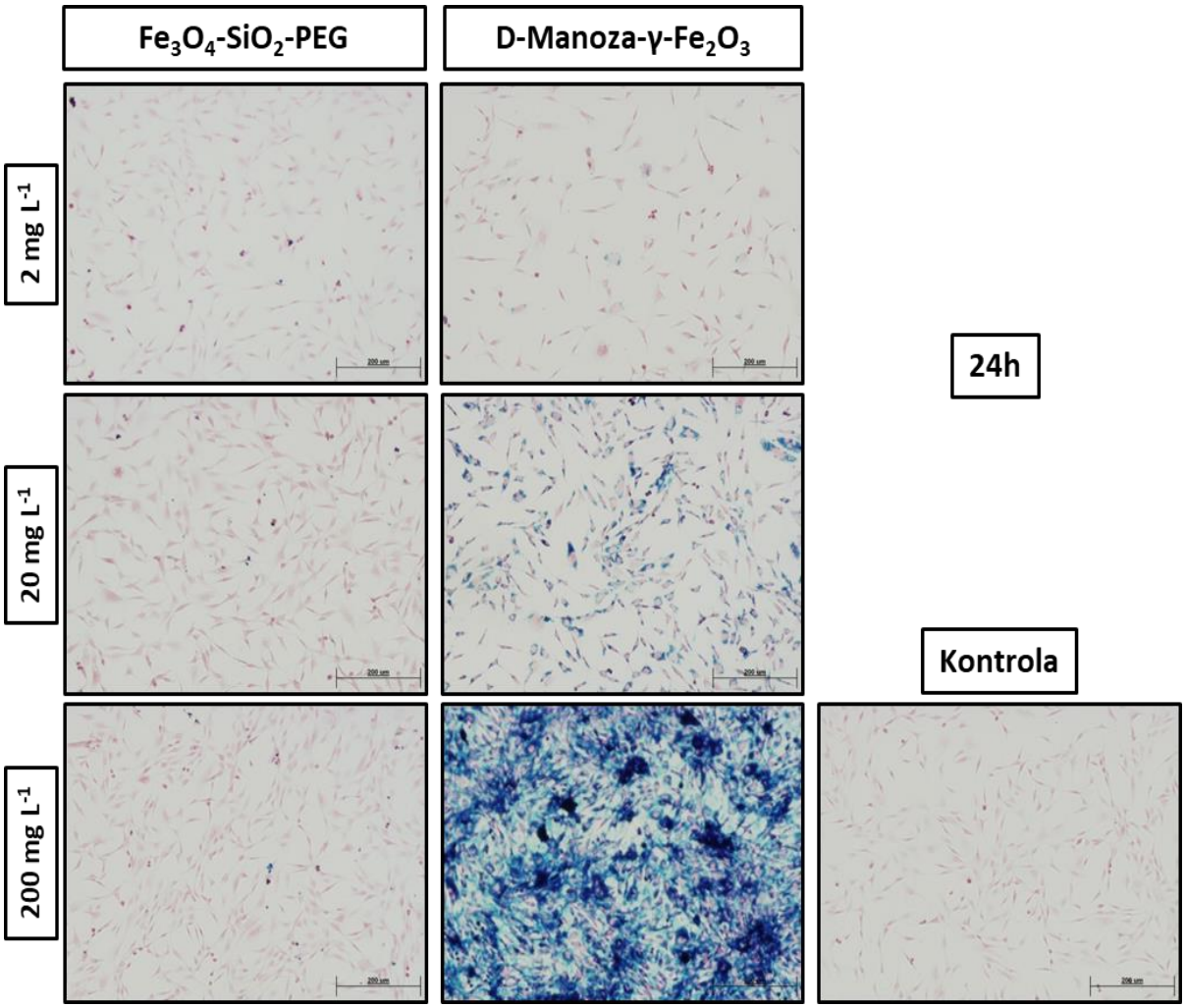


Slika 5. Hondrociti nakon detekcije zelene fluorescencije živih i crvene fluorescencije mrtvih stanica testom *Live/Dead*. Stanice su inkubirane 24 h, 48 h i 72 h nanočesticama PEG-a i manoze u koncentracijama 2, 20, 200 mgL^{-1}. Kontrola su netretirane stanice. Slike su konvertirane pomoću programa Image J. Skala pokazuje 200 μm.

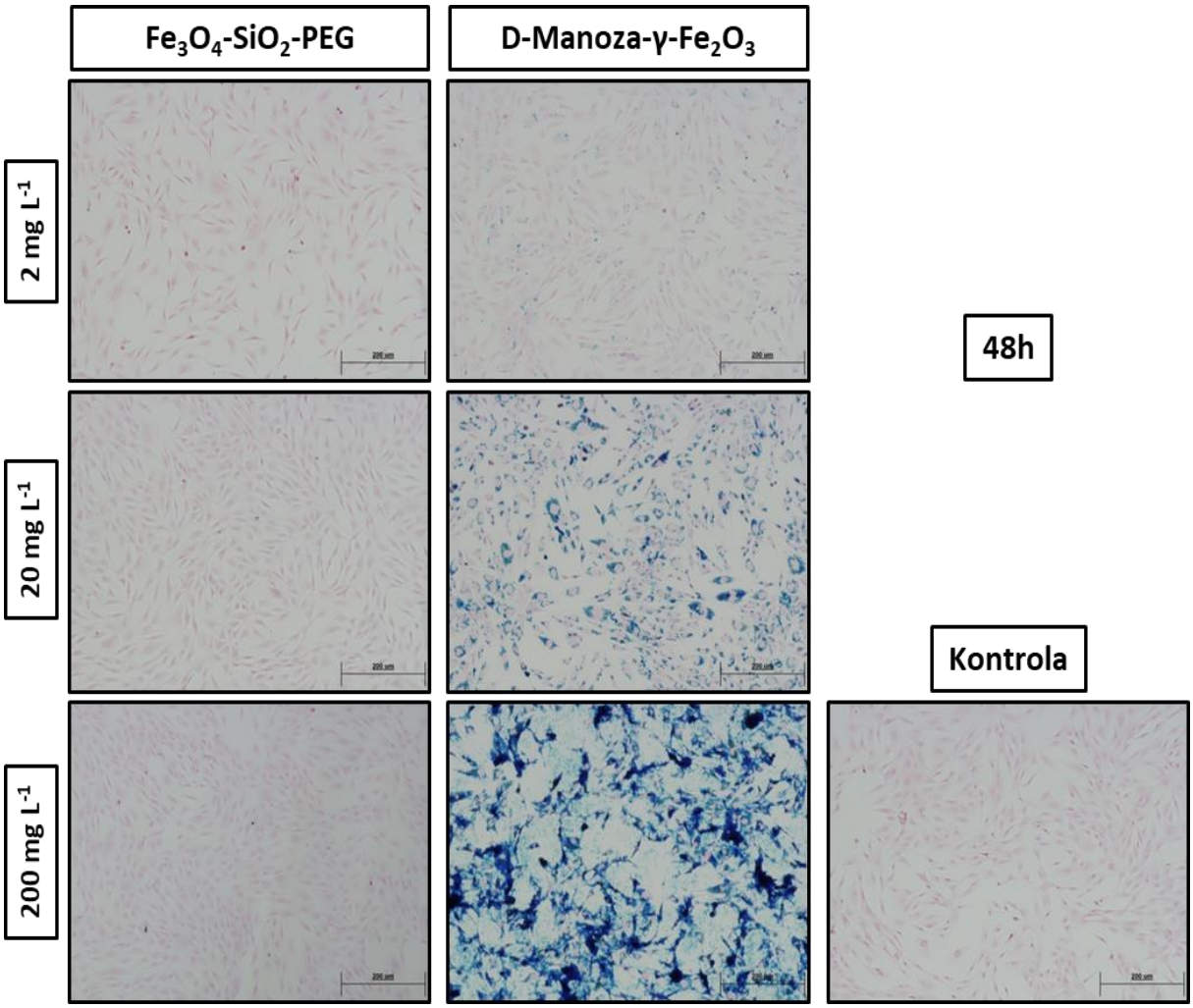
3.2. Detekcija nanočestica berlinskim modrilom u fiksiranim uzorcima hondrocita

Hondrociti su tretirani nanočesticama PEG-a i manoze istim koncentracijama kao u prethodnim eksperimentima (2, 20 i 200 mgL^{-1}) te inkubirani kroz jednaki vremenski period (24 h, 48 h i 72 h). Nakon što su uzorci fiksirani, bojanjem berlinskim modrilom detektirane su željezne jezgre nanočestica. Kod fiksiranih hondrocita tretiranih nanočesticama PEG-a plavo obojenje nije detektirano niti u jednoj koncentraciji (Slika 7, 8 i 9). Kroz 72 h inkubacije stanice nisu stupile u interakciju s nanočesticama PEG-a te su tijekom postupka bojanja najvjerojatnije isprane. Kod većih koncentracija primijećeni su plave točkice što mogu biti artefakti ili zaostale nanočestice.

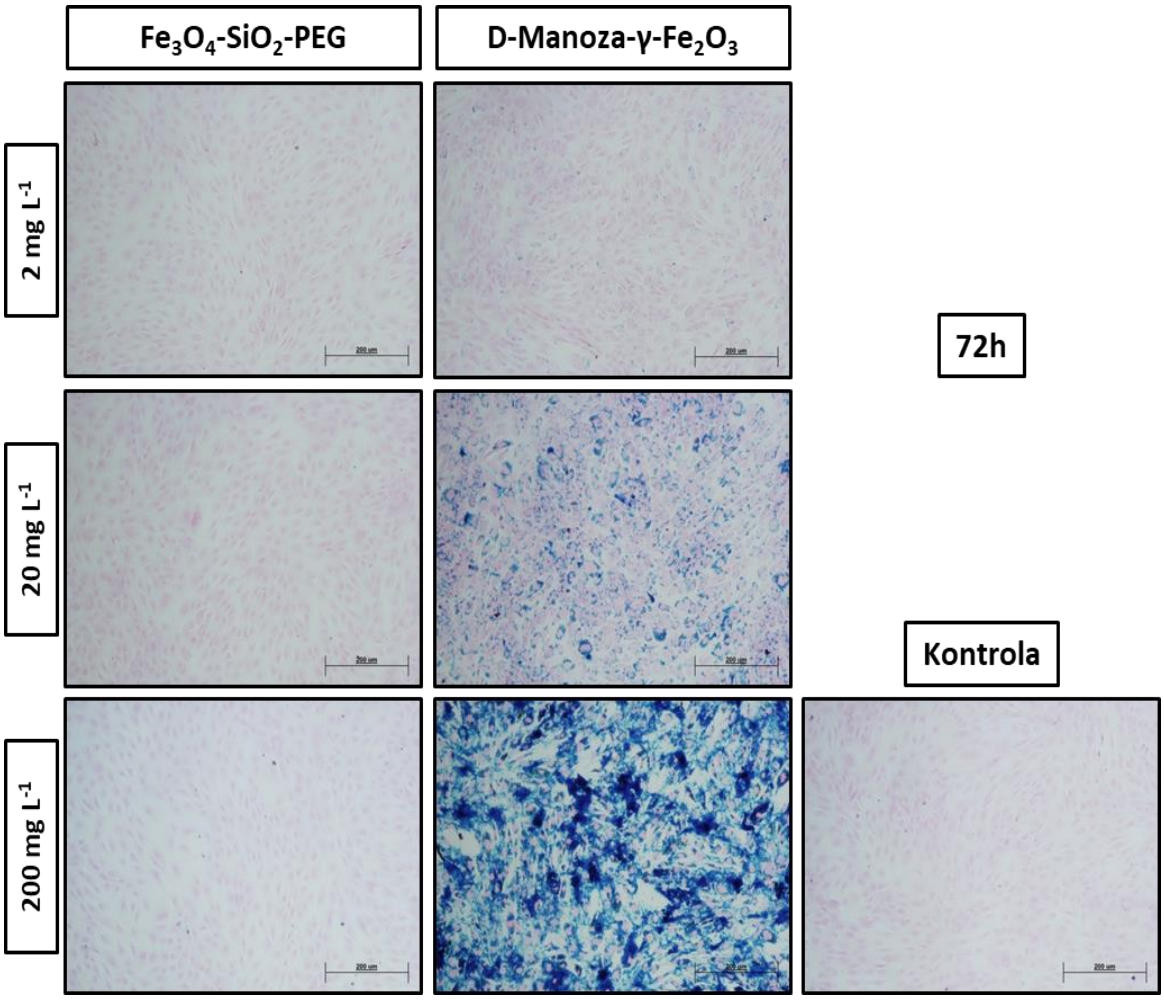
Hondrociti tretirani nanočesticama manoze pokazuju plavo obojenje u svim tretmanima. Obojenje biva intenzivnije povećanjem koncentracije nanočestica. Nakon inkubacije s najmanjom koncentracijom, nisu u svim stanicama detektirane nanočestice, dok su kod tretmana srednjom i najvećom koncentracijom sve stanice u vidnom polju bile označene nanočesticama manoze. Također, boja ne jenjava kroz inkubacijski period od 72 h (Slika 6, 7 i 8). Uočeno je zadržavanje nanočestica manoze unutar stanica te je povećanjem koncentracije plavo obojenje unutar stanice intenzivnije. Također, stanice s jačim intenzitetom plavog obojenja su okruglasta oblika. Kod tretmana najvećom koncentracijom obojenje se nalazi i izvan stanica što upućuje da se nanočestice zadržavaju na stjenci posude u kojoj je eksperiment obavljen (Slika 9).



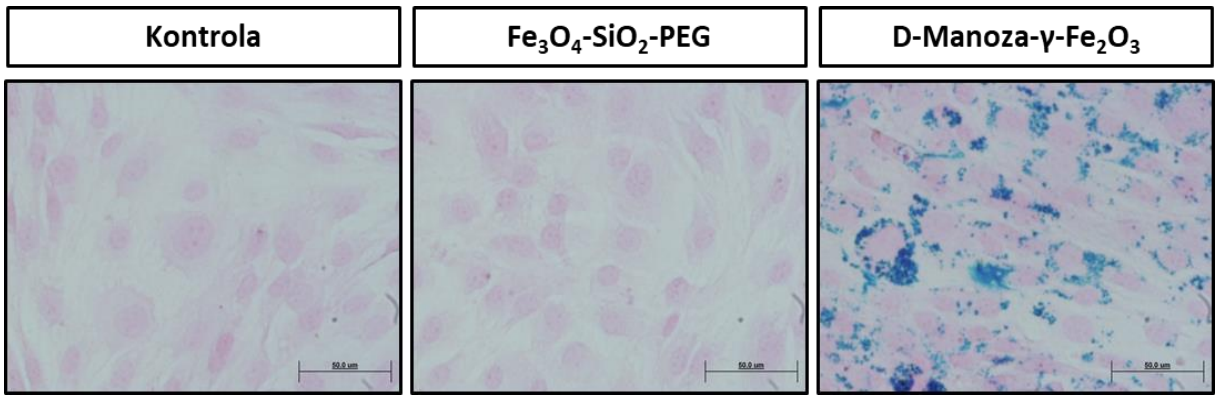
Slika 6. Detekcija željezne jezgre nanočestica berlinskim modrilom nakon 24 h inkubacije hondrocita nanočesticama PEG-a i manoze u koncentracijama 2, 20 i 200 mgL^{-1}. Stanične jezgre su obojane 0,1%-tnom bojom *Nuclear fast red*. Kontrola su netretirane stanice. Skala pokazuje 200 μm.



Slika 7. Detekcija željezne jezgre nanočestica berlinskim modrilom nakon 48 h inkubacije hondrocita nanočesticama PEG-a i manoze u koncentracijama 2, 20 i 200 mgL^{-1}. Stanične jezgre su obojane 0,1%-tnom bojom *Nuclear fast red*. Kontrola su netretirane stanice. Skala pokazuje 200 μm.



Slika 8. Detekcija željezne jezgre nanočestica berlinskim modrilom nakon 72 h inkubacije hondrocita nanočesticama PEG-a i manoze u koncentracijama 2, 20 i 200 mgL^{-1}. Stanične jezgre su obojane 0,1%-tnom bojom *Nuclear fast red*. Kontrola su netretirane stanice. Skala pokazuje 200 μm.

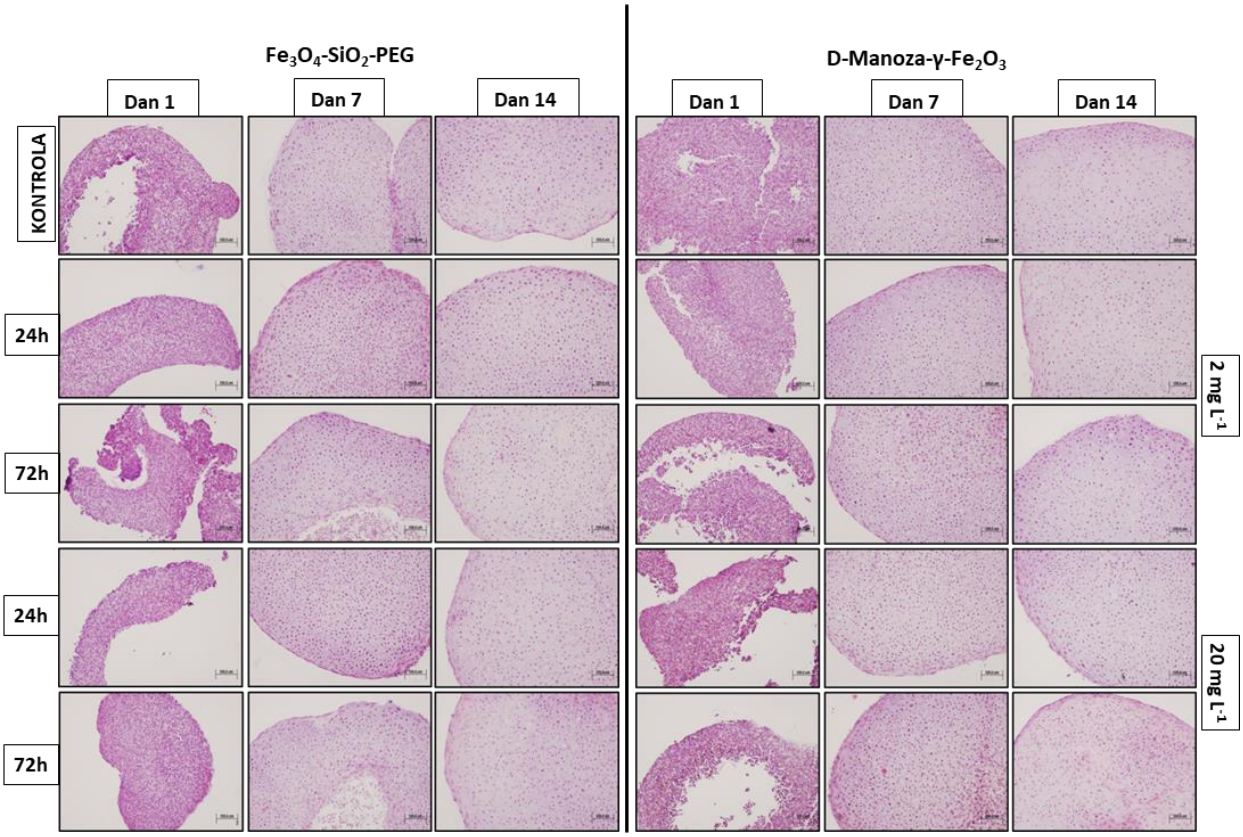


Slika 9. Prikaz internalizacije nanočestica i morfologije stanica nakon 72 h inkubacije nanočesticama PEG-a i manoze u koncentraciji 20 mgL^{-1} berlinskim modrilom. Kontrola su netretirane stanice. Stanične jezgre su detektirane 0,1%-tnom bojom *Nuclear fast red*. Skala pokazuje 50 μm.

3.3. Histološka analiza 3D kulture hondrocita

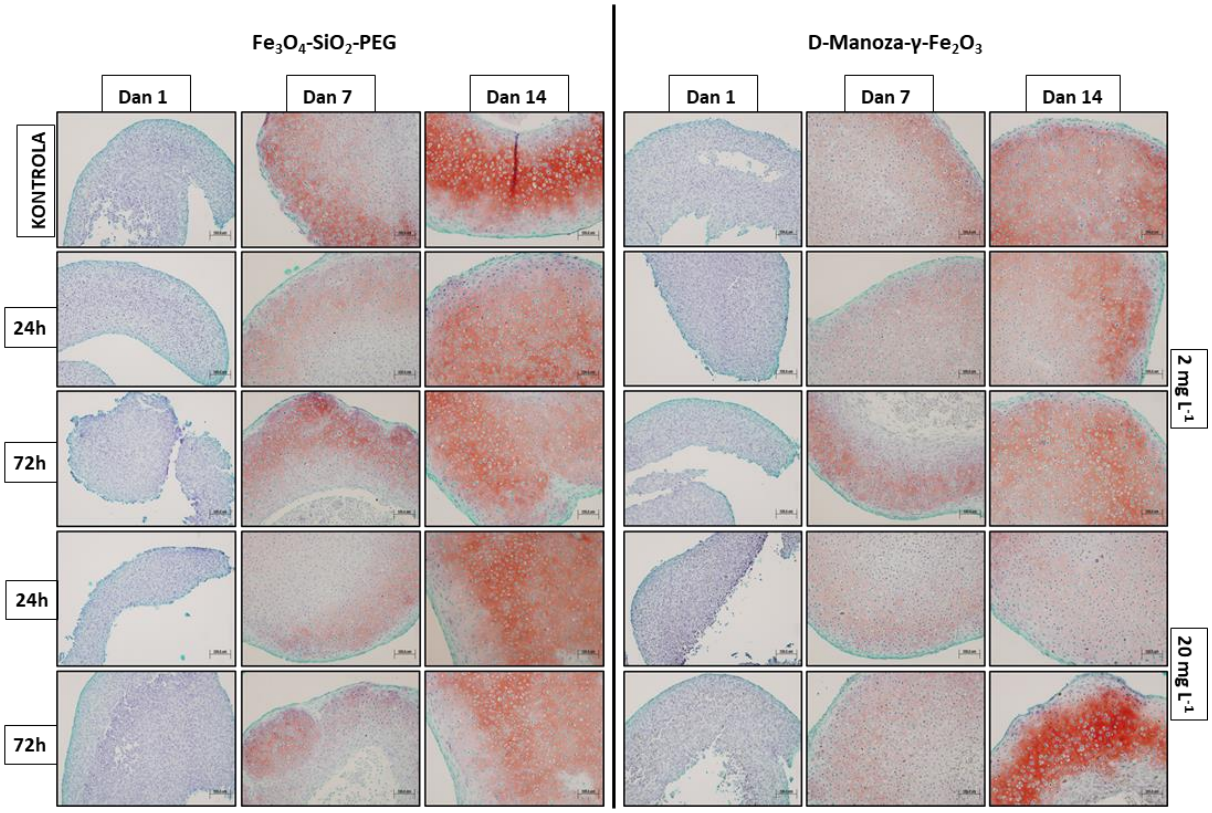
Prije uspostave 3D kulture, hondrociti su bili tretirani nanočesticama PEG-a i manoze u dvije koncentracije – 2 i 20 mgL^{-1}, te inkubirani 24 h i 72 h. Potom su centrifugirani, ostavljeni u talogu i inkubirani u hondrogenom mediju 1, 7 i 14 dana uz promjene medija svaka 2 do 3 dana. Na uzorcima su provedene slijedeće histološke analize kako bi se utvrdilo jesu li se hondrociti rediferencirali: bojanje hemalaun-eozinom, bojanje safraninom O i bojanje berlinskim modrilom. Bojanjem hemalaun-eozinom utvrdila se morfologija 3D kulture hondrocita, bojanjem safraninom O se provjerio diferencijacijski potencijal hondrocita u 3D kulturi, a berlinskim modrilom se ispitalo zadržavanje nanočestica u 3D kulturi hondrocita u periodu od 14 dana.

Ishodi bojanja 3D kulture hondrocita tretiranih nanočesticama bojom hemalaun-eozin prikazani su na slici 10. Hondrociti nakon 1. dana 3D kulture pokazuju intenzivnije ljubičasto obojenje što znači veću koncentraciju staničnih jezgara. Nakon 7 dana u 3D kulturi, prerezi hondrocita su više ružičasti i povećani, morfologija stanica je slična kod kontrole i tretmana. Stanice su zaobljenje te se oko njih nalazi mnogo međustaničnog prostora. Zadnji, 14. dan 3D kulture, hondrociti su ekspandirali, međustanični prostor je ružičasto obojen te je struktura kontrolnih i tretiranih 3D kultura hondrocita veoma slična. Stoga tretirane i netretirane 3D kulture hondrocita u talogu nakon bojenja hemalaun-eozinom pokazuju slične karakteristike.



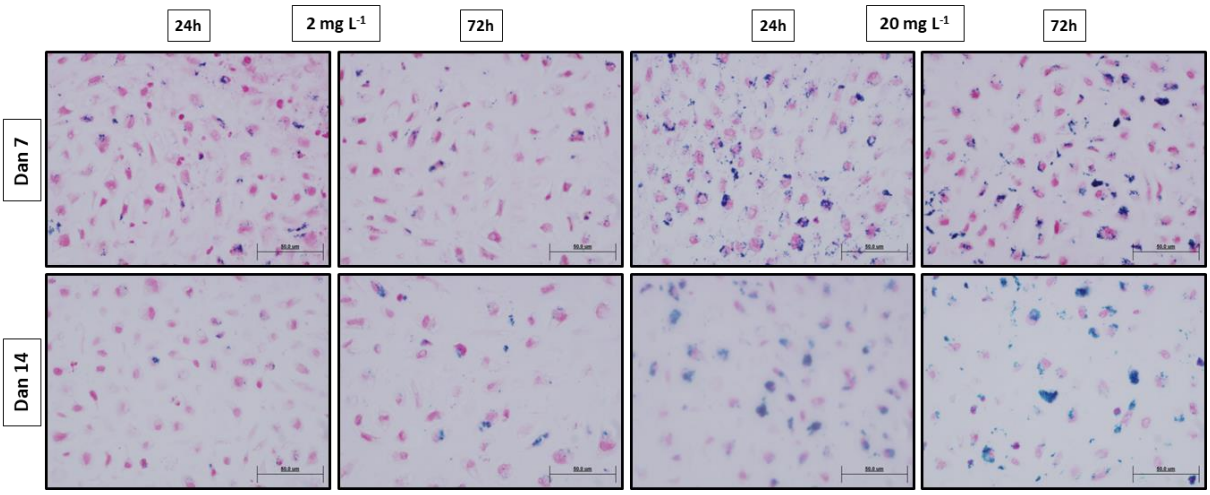
Slika 10. Preparati 3D kulture hondrocita nakon histološkog bojanja hemalaun-eozinom. Hondrociti su tretirani nanočesticama PEG-a i manoze 24 h i 72 h u koncentracijama 2 i 20 mgL^{-1} te kultivirani u hondrogenom mediju 1, 7 i 14 dana. Kontrola su netretirani hondrociti uzgajani u hondrogenom mediju 1, 7 i 14 dana. Preparati su uklopljeni u parafin te izrezani mikrotomom na prereze debljine 5 µm. Skala pokazuje 100 µm.

Druga histološka tehnika kojom su detektirani proteoglikani i glikozaminoglikani izvanstaničnog matriksa hondrocita u 3D kulturi je bojanje safraninom O. Hondrociti su tretirani nanočesticama PEG-a i manoze 24 h ili 72 h u koncentracijama 2 i 20 mgL^{-1} te kultivirani u uvjetima u kojima mogu diferencirati. Prerezi hondrocita u 3D kulturi nakon bojenja safraninom O su prikazani na slici 11. Nakon prvog dana 3D kulture, uzorak ne daje specifično crveno obojenje koje ukazuje na prisutnost izvanstaničnog matriksa što je i očekivano, s obzirom na kratko vrijeme inkubacije. Sedmi dan, se nazire crveno obojenje kako u kontrolnim 3D kulturama tako i u 3D kulturama tretiranim PEG- i manoza-nanočesticama. Krajnji, 14, dan kulture crvenilo je vidljivo intenzivnije no 7. dan. Prema tome, hondrociti tretirani nanočesticama pokazuju diferencijacijski potencijal sličan netretiranima.



Slika 11. Prerezi 3D kulture hondrocita nakon histološkog bojanja safranin O bojom. Hondrociti su tretirani nanočesticama PEG-a i manoze 24 h i 72 h u koncentracijama 2 i 20 mgL^{-1} te kultivirani u hondrogenom mediju 1, 7 i 14 dana. Kontrola su netretirani hondrociti uzgajani u hondrogenom mediju 1, 7 i 14 dana. Hondrocita u 3D kulturi su uklopljeni u parafin te izrezani mikrotomom na prereze debljine 5 μm. Skala pokazuje 100 μm.

Prerezi hondrocita u 3D kulturi nakon uklapanja i rezanja su bojani berlinskim modrilom kako bi se utvrdilo prisustvo nanočestica PEG-a i manoze u uzorku tijekom diferencijacijske kulture. Tretirani su kako je opisano u prvom odlomku poglavlja 3.3. Nanočestice PEG-a nisu detektirane niti u jednom tretmanu. S druge strane, uzorci tretirani nanočesticama manoze daju plavo obojenje (Slika 12). Obojenje je slična intenziteta kod 3D kultura čiji su hondrociti prethodno inkubiranih 24 h i 72 h nanočesticama manoze. Nešto jači intenzitet obojenja je vidljiv kod uzoraka tretiranih koncentracijom 20 mgL^{-1}, no kod uzoraka tretiranih 2 mgL^{-1}.



Slika 12. Prerezi hondrocita u 3D kulturi nakon histološkog bojanja berlinskim modrilom. Prikazani hondrociti su tretirani nanočesticama manoze 24 h i 72 h u koncentracijama 2 i 20 mgL^{-1} te kultivirani u hondrogenom mediju 7 i 14 dana. Uzorci su uklopljeni u parafin te izrezani mikrotomom na prereze debljine 5 μm. Skala pokazuje 50 μm.

3.4. Razina ekspresije markera hondrogeneze određena metodom qPCR u stvarnom vremenu

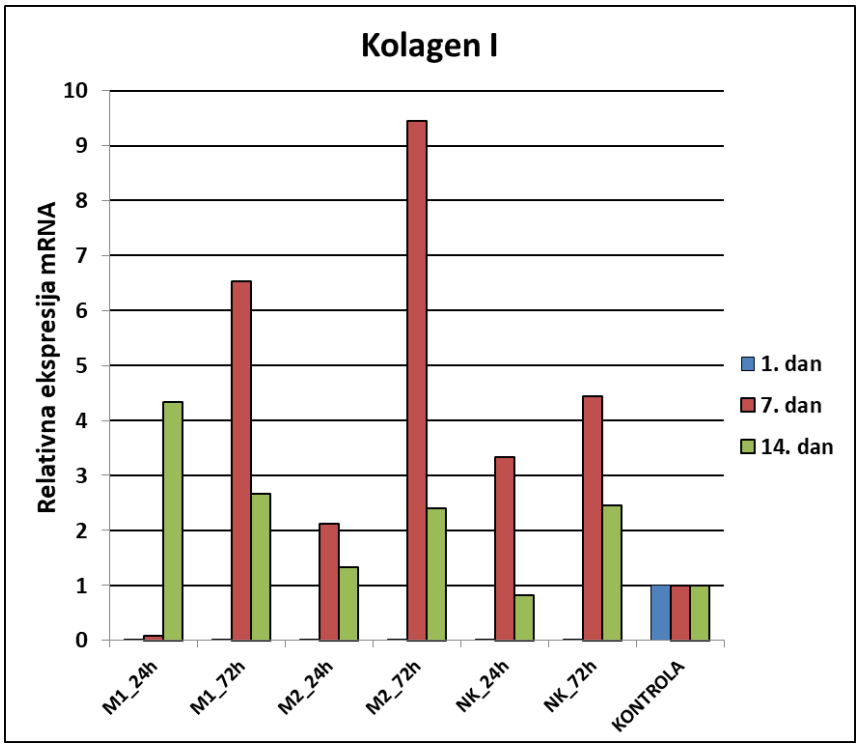
Metodom qPCR se prati umnažanje DNA ili cDNA u stvarnom vremenu te se relativno kvantificira umnoženi produkt. Izolirana mRNA iz hondrocita u 3D kulturi je provjerena i kvantificirana na markere hondrogeneze. Hondrociti su tretirani nanočesticama manoze u koncentraciji 2 i 20 mgL^{-1} te su postavljeni u uvjete 3D kulture. Budući da se nanočestice manoze zadržavaju u uzorku i nakon četrnaest dana kulture, od interesa je vidjeti utječu li na ekspresiju markera hondrogeneze. Reverznom transkripcijom izolirana RNA iz hondrocita je prevedena u cDNA koja se dalje koristila za provođenje metode qPCR u stvarnom vremenu.

Korištena je cDNA gena GAPDH kao endogena kontrola radi normalizacije uzoraka te netretirani i nediferencirani hondrociti ovce kao vanjska kontrola za kalibraciju uzoraka. Geni od interesa su bili kolagen II i agrekan, glavne makromolekularne sastavnice izvanstaničnog matriksa hrskavice te kolagen I čija ekspresija jenjava u procesu hondrogeneze (Caron i sur., 2012). Dobiveni rezultati za kolagen I, kolagen II i agrekan su analizirani komparativnom C_T metodom koja u relativnu razinu ekspresije gena uključuje endogenu i vanjsku kontrolu. Oznake objašnjene u tablici 7 će biti korištene u nastavku poglavlja.

Tablica 7. Skraćenice korištene za pelete hondrocita prema duljini i koncentraciji tretmana.

Skraćenica	Koncentracija nanočestica manoze/mgL^{1-}	Duljina tretmana/sati $^{-}$
M1_24h	2	24
M2_24h	20	24
M1_72h	2	72
M2_72h	20	72
NK_24h	0	Izmjena medija kao kod uzoraka tretiranih 24h
NK_72h	0	Izmjena medija kao kod uzoraka tretiranih 72h

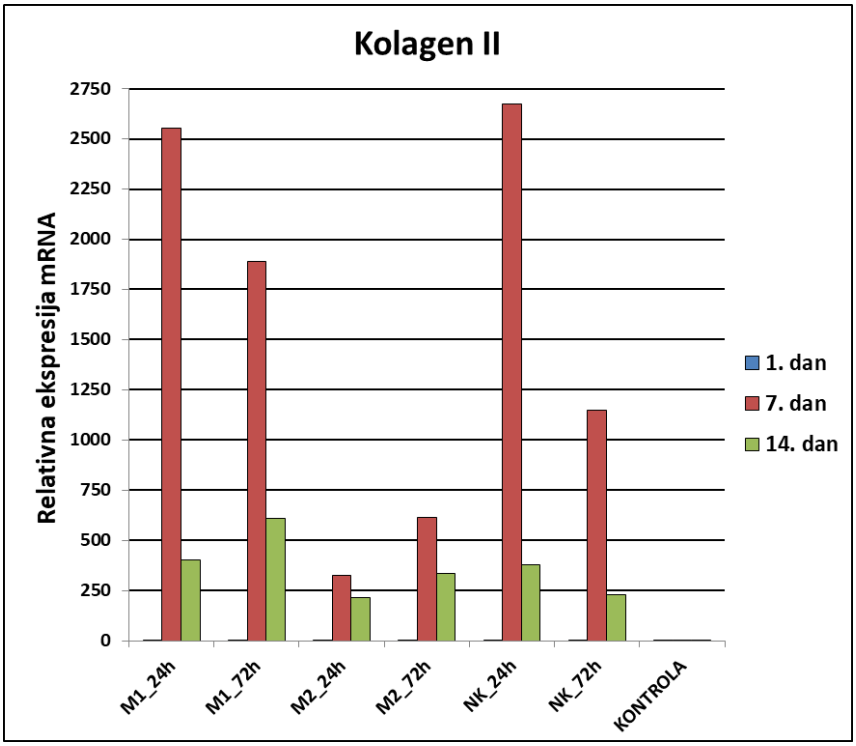
Relativna ekspresija kolagena I tijekom diferencijacije hondrocita je prikazana na slici 13. Ekspresija u vanjskoj kontroli (netretirani hondrociti) je normalizirana na vrijednost 1. Hondrociti izolirani nakon 1. dana u 3D kulturi pokazuju izuzetno nisku razinu ekspresije, točnije ekspresija je negativno regulirana. Vrijednosti relativne kvantifikacije su ispod 1, te se kreću oko vrijednosti 0,01 za sve uzorke. Nakon 7. dana, ekspresija se povećava u odnosu na vanjsku kontrolu. Najveće vrijednosti dosežu uzorci M2_72h i M1_72h te NK_72h. Kod uzorka M1_24h ekspresija ostaje ispod vrijednosti 1. Kod uzoraka izoliranih 14. dan relativna ekspresija kolagena I se smanjuje za sve uzorke, osim kod uzorka M1_24h. Stoga, relativna razina ekspresije kolagena I je najintenzivnija tijekom 7.dana 3D kulture hondrocita, dok je tijekom 1. dana skoro zanemariva, a tijekom 14. dana najbliža vrijednosti vanjske kontrole.



Slika 13. Relativna ekspresija mRNA kolagena I kod hondrocita u 3D kulturi. Hondrociti su tretirani nanočesticama manoze u koncentraciji 2 i 20 mgL^{-1} te kultivirani u hondrogenom mediju 1, 7 i 14 dana. Izolirana RNA te cDNA dobivena njenom reverznom transkripcijom, analizirana je metodom qPCR. Rezultati su dobiveni komparativnom C_T metodom. Endogena kontrola je GAPDH, a vanjska kontrola netretirani hondrociti (oznaka KONTROLA). Skraćenice uzoraka znače slijedeće: M1_24h – hondrociti tretirani 24 h nanočesticama manoze u koncentraciji 2 mgL^{-1}, M1_72h - hondrociti tretirani 72 h nanočesticama manoze u koncentraciji 2 mgL^{-1}, M2_24h - hondrociti tretirani 24 h nanočesticama manoze u koncentraciji 20 mgL^{-1}, M2_72h - hondrociti tretirani 72 h nanočesticama manoze u koncentraciji 20 mgL^{-1}, NK_24h – netretirani hondrociti uz promjene medija kao kod hondrocita tretiranih 24 h te NK_72h - netretirani hondrociti uz promjene medija kao kod hondrocita tretiranih 72 h.

Praćena ekspresija kolagena II, markera diferencijacije, je prikazana na slici 14. Relativna ekspresija vanjske kontrole normalizirana je na vrijednost 1. Izolirana RNA iz hondrocita nakon prvog dana u diferencijacijskoj kulturi pokazuje izuzetno niske razine relativne ekspresije mRNA kolagena II, a vrijednosti se kreću do 0,07. Nakon sedam dana hondrogeneze, stanice pokazuju intenzivnu relativnu ekspresiju kolagena II, koja je povećana kod svih uzoraka. Najveći skokovi su zabilježeni kod uzoraka NK_24h, M1_24h te M1_72h. Relativna ekspresija se smanjila kod uzoraka uzetih 14. dan u odnosu na uzorke uzete 7. dan. Najveća vrijednost ostaje kod uzorka M1_72h. Prema tome, relativna ekspresija mRNA kolagena II je veoma slaba prvi dan 3D kulture

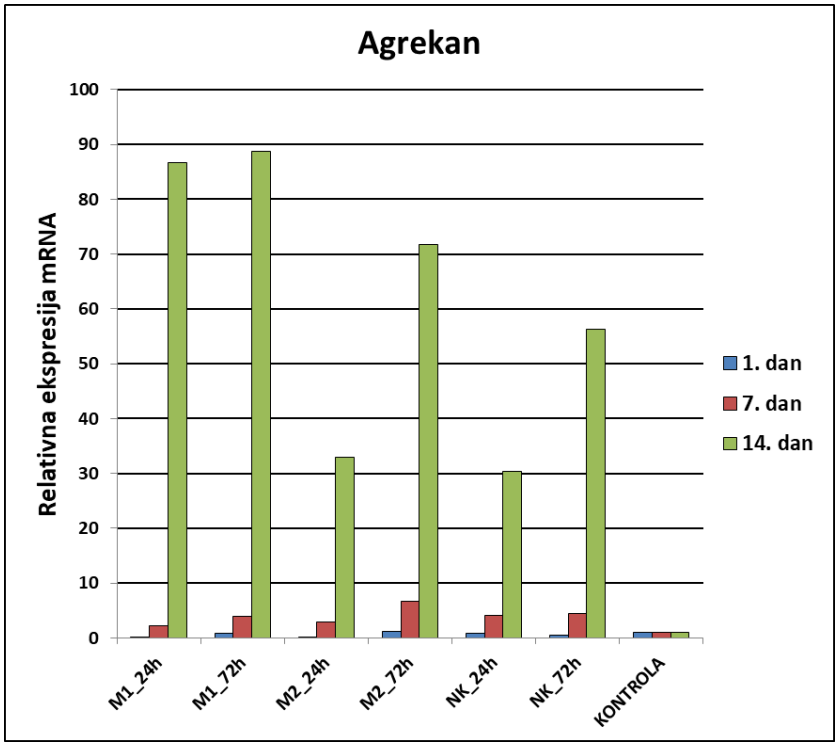
hondrocita, nakon sedmog dana prolazi kroz ogroman skok te se četrnaesti dan 3D kulture smanjuje.



Slika 14. Relativna ekspresija mRNA kolagena II u hondrocitima tijekom diferencijacijske kulture. Hondrociti su tretirani manoza-nanočesticama u koncentraciji 2 i 20 mgL^{-1} te kultivirani u hondrogenom mediju 1, 7 i 14 dana. Izolirana RNA te cDNA dobivena njenom reverznom transkripcijom, analizirana je metodom qPCR. Rezultati su dobiveni komparativnom C_T metodom. Endogena kontrola je GAPDH, a vanjska kontrola netretirani hondrociti. Skraćenice uzoraka znače slijedeće: M1_24h – hondrociti tretirani 24 h nanočesticama manoze u koncentraciji 2 mgL^{-1}, M1_72h - hondrociti tretirani 72 h nanočesticama manoze u koncentraciji 2 mgL^{-1}, M2_24h - hondrociti tretirani 24 h nanočesticama manoze u koncentraciji 20 mgL^{-1}, M2_72h - hondrociti tretirani 72 h nanočesticama manoze u koncentraciji 20 mgL^{-1}, NK_24h – netretirani hondrociti uz promjene medija kao kod hondrocita tretiranih 24 h te NK_72h - netretirani hondrociti uz promjene medija kao kod hondrocita tretiranih 72 h.

Posljednje je praćena ekspresija agrekana, drugog pozitivnog markera hondrogeneze. Nakon prvog dana diferencijacijske kulture, vrijednosti relativne ekspresije u niske, no nešto veće nego za kolagen I i kolagen II. Relativna ekspresija uzorka M2_72h prelazi vrijednost kontrole – 1 (Slika 15). Nakon sedam dana diferencijacijske kulture, relativna ekspresija agrekana se povećava i najveća je za M2_72h. Poslije četrnaest dana u diferencijacijskoj kulturi, ekspresija ponovno raste za sve uzorke. Najveće vrijednosti doseže za uzorak M1_72h, M1_24h i M2_72h

(Slika 15). Vrijednosti relativne ekspresije agrekana rastu s brojem dana diferencijacijske kulture te su najizraženije nakon 14. dana.



Slika 15. Relativna ekspresija mRNA agrekana u hondrocitima tijekom diferencijacijske kulture. Hondrociti su tretirani nanočesticama manoze u koncentraciji i 20 mgL^{-1} te kultivirani u hondrogenom mediju 1, 7 i 14 dana. Pomoću trizola je izolirana mRNA, tretirana DNazom te reverzno prepisana. Provedena je qPCR analiza. Rezultati su dobiveni komparativnom C_T metodom. Endogena kontrola je GAPDH, a vanjska kontrola netretirani hondrociti. Skraćenice uzoraka znače slijedeće: M1_24h – hondrociti tretirani 24 h nanočesticama manoze u koncentraciji 2 mgL^{-1}, M1_72h - hondrociti tretirani 72 h nanočesticama manoze u koncentraciji 2 mgL^{-1}, M2_24h - hondrociti tretirani 24 h nanočesticama manoze u koncentraciji 20 mgL^{-1}, M2_72h - hondrociti tretirani 72 h nanočesticama manoze u koncentraciji 20 mgL^{-1}, NK_24h – netretirani hondrociti uz promjene medija kao kod hondrocita tretiranih 24 h te NK_72h - netretirani hondrociti uz promjene medija kao kod hondrocita tretiranih 72 h.

4. RASPRAVA

Zbog slabog regeneracijskog potencijala, ozljedama hrskavice se sve više pristupa metodama tkivnog inženjerstva (Hoshi i sur., 2012). Nakon vraćanja tkivnih presadaka, u organizam korisno bi bilo pratiti što se događa sa presađenim stanicama, zadržavaju li se u presatku te ostaje li sam presadak na mjestu ozljede. Ideja je stoga obilježiti hondrocite tijekom razvoja u kulturi pomoću nanočestica željezovih oksida te ih pratiti magnetskom rezonancom (Ramaswamy i sur., 2009). Prije toga, potrebno je temeljito ispitati utjecaj nanočestica na hondrocite *in vitro* – ispitati biološku podudarnost, uspješnost obilježavanja nanočesticama te diferencijacijski potencijal u kulturi. Također, potrebno je odabrati odgovarajuću vrstu nanočestica s pogodnim površinskim modifikacijama (Kong i sur., 2011). U ovom radu se istražuju interakcije hondrocita izoliranih iz nosnog septuma ovce i dvije specifične vrste SPION-a, Fe_3O_4-SiO_2-PEG, jer produžuju vrijeme nanočestica u cirkulaciji te D-manoza-γ-Fe_2O_3 koje stanica može endocitirati.

Prvi cilj rada je bio utvrditi citotoksičnost nanočestica PEG-a i manoze na hondrocite u adherentnoj kulturi te pokazati kako ova dva tipa nanočestica ne reduciraju preživljenje hondrocita što je ujedno i polazišna točka za ostatak eksperimenata. Preživljenje je praćeno pomoću bojanja kristal-violet i testa isključenja tripanskog modrila. Oba testa su pokazala visoka preživljenja hondrocita nakon tretmana nanočesticama PEG-a (Slika 2A, Slika 3A) i manoze (Slika 2B, Slika 3B) usporedno sa netretiranom kontrolom što se slaže s rezultatima prethodnih istraživanja (Kostiv i sur., 2017; Horak i sur., 2009)

Testovima preživljenja nije pokazan citotoksičan efekt nanočestica PEG-a u odnosu na netretiranu kontrolu te su preživljenja većinom visoka. Ipak, uočen je trend padajuće vijabilnosti hondrocita, dobiven bojanjem kristal-violet, povećanjem koncentracije i duljine tretmana. Jedino kod najveće koncentracije nanočestica PEG-a preživljenje opada do 59% te raste nakon duljeg izlaganja tretmanu. Moguće je kako se stanice nakon 24 h nisu uspjele adherirati te su se nakon 48 h u kulturi oporavile. Usprkos porastu preživljenja kod najveće koncentracije, ono ipak ostaje niže od preživljenja hondrocita tretiranih manjim koncentracijama. Nadalje, test isključenja tripanskog modrila kojim se izravno broje stanice pokazuje preživljenja za sve tretmane oko 100%. Visoka preživljenja hondrocita tretiranih nanočesticama PEG-a potvrđuje i vizualna inspekcija stanica nakon testa *Live/Dead*. Rezultati preživljenja nakon tretmana nanočesticama PEG-a dobiveni u ovom radu se slažu s prethodnim istraživanjima. Kostiv i sur., 2017, su također

koristili dva testa preživljenja, jedan kolorimetrijski, a drugi za izravnu detekciju stanica. Pokazali su kolorimetrijskim testom kako vijabilnost neuralnih matičnih stanica opada što je veća koncentracije nanočestica PEG-a, dok izravnom detekcijom živih, odnosno mrtvih stanica postotak preživljenja se kreće oko 100%. Ono što nisu pratili je preživljenje kroz duži period tretmana.

Bojanje kristal-violetom i test isključenja tripanskim modrilom nisu pokazali reducirano preživljenje hondrocita tretiranih nanočesticama manoze. Bojanje kristal-violetom pokazalo je kako hondrociti tretirani nanočesticama manoze prate povećanje vijabilnosti kroz 72 h te najveći postotak preživljenja kod tretmana najvećom koncentracijom. Kao i za stanice tretirane nanočesticama PEG-a, test isključenja tripanskog modrila je ukazao na preživljenja oko 100% za sve tretmane. Testom *Live/Dead* je i vizualno potvrđena većinska populacija živih stanica. Za preživljenje dobiveno kolorimetrijskim testom rezultati su očekivani s obzirom na mali broj početno nasađenih stanica i slabu citotoksičnost (Riss i sur., 2016). Problem je što SPION-i mogu interferirati s kolorimetrijskim testom poput bojenja kristal-violetom, te za rastuće koncentracije mogu se dobiti veća preživljenja nego što uistinu jesu. Stoga je potrebno dobro optimizirati kolorimetrijski test, uključiti prazne kontrole koji sadrže samo razrjeđenja nanočestica te pomno ispirati jažice tijekom vršenja testa. Također, korištenjem dodatnog testa preživljenja, koji neće ovisiti o apsorbanciji tretiranih uzorka, poput brojanja stanica testom isključenja tripanskog modrila dobit će se potpunija slika preživljenja (Vinković-Vraček i sur., 2015). U ovom radu, najniže preživljenje pada do 73% i to nakon 24 h provedenih u kulturi za tretman srednjom koncentracijom manoza-nanočestica. Slične rezultate preživljenja, nakon tretmana različitih pasaža mezenhimskih matičnih stanica štakora nanočesticama manoze, dobili su Horak i sur., 2009, te im preživljenje ne opada ispod 75% niti za jednu koncentraciju.

Proliferacija hondrocita određena testom isključenja tripanskog modrila gdje je praćena sposobnost diobe stanica nakon tretmana nanočesticama kroz 72 h. Stanice tretirane nanočesticama i PEG-a i manoze su pokazale pozitivan proliferacijski trend, nakon 24 h i 48 h je broj stanica rastao skoro linearno, dok nakon 72 h stanice nešto usporavaju diobu. Takav obrazac se i inače uočava tijekom kultivacije stanica te nije uzrokovan nanočesticama. Stanice jednostavno potroše hranjive tvari i zauzmu podlogu na kojoj rastu te je prostor za daljnju diobu ograničen (https://www.qiagen.com/us/resources/molecular-biology-methods/animal-cell-culture/). Nadalje, proliferacijska krivulja za tretman nanočesticama manoze kazuje je kako su

stanice prošle kroz više dioba no netretirana kontrola i stanice tretirane nanočesticama PEG-a. Razlog tomu može biti i D-manoza kao površinska modifikacija. Kennedy i sur., 2014, su pokazali kako nanočestice obložene monosaharidima poput manoze ili galaktoze uistinu jesu slabije citotoksične na stanice. Iako su u pitanju bile nanočestice srebra, uočili su zavisnost preživljenja stanica o površinskoj modifikaciji. Zbog površinske modifikacije D-manozom hondrociti su manje izloženi staničnom stresu te mogu intenzivnije proliferirati.

Detekcija željeza berlinskim modrilom potvrdila je uspješnost obilježavanja hondrocita nanočesticama manoze, dok nanočestice PEG-a nisu detektirane niti u jednoj koncentraciji te su tijekom postupka bojanja isprane. Hondrociti su internalizirali nanočestice manoze te što je veća koncentracija to su nanočestice više okupirale citoplazmu stanica. Stanice koje su endocitirale mnoštvo nanočestica su nabubrile za razliku od izdužene morfologije stanica koje nisu. Kod tretmana koncentracijom 200 mgL^{-1} hondrociti se teško raspoznaju zbog zadržavanja nanočestica oko stanica i uz stijenku posude. Stoga se najveća koncentracija se nije koristila u daljnjim eksperimentima. Zbog zadržavanja nanočestica manoze na stjenkama posude, bojanjem kristal-violetom vjerojatno jesu precijenjena preživljenja za tretman najvećom koncentracijom. Ovi rezultati su ispali očekivano i u skladu s prijašnjim istraživanjima (Horak i sur., 2007; Kostiv i sur., 2017).

Histološka analiza hondrocita u 3D kulturi je potvrdila rediferencijaciju dediferenciranih hondrocita ka zrelim hondrocitima. Rediferencijacija je potvrđena kod stanica prethodno tretiranih nanočesticama i PEG-a i manoze. Bojanjem hemalaun-eozinom utvrđen je napredak morfologije hondrocita od staničnog prema tkivnom. Prvi dan kulture su stanice veoma zgusnute, sedmi dan ekspandiraju, dok četrnaesti dan izvanstanični proteini obojani eozinom su obilniji no ljubičaste stanične jezgre (Slika 10). Stanice su okrugle te se velik dio stanica nalazi u izoliranim lakunama - hondronima, što je karakteristika hondrocita u hrskavičnom tkivu. Ovakva morfologija peleta rediferenciracnih hondrocita se poklapa s morfologijom tkiva hrskavice (Di Bella i sur., 2015). Bojanjem safraninom O detektirani su proteoglikani i glikozaminoglikani koji tvore izvanstanični matriks kod kontrolnih stanica te uzoraka tretiranih nanočesticama PEG-a i manoze. Intenzitet crvenog obojenja je najizraženiji 14 dan što sugerira najveću koncentraciju proteoglikana i glikozaminoglikana. Berlinskim modrilom nisu detektirane nanočestice PEG-a kod hondrocita u 3D kulturi, kao niti u adherentnoj kulturi. S druge strane, nanočestice manoze, u koncentraciji 2 i 20 mgL^{-1} su detektirane nakon 7 i 14 dana rediferencijacijske kulture. Duljine

tretmana, 24 h ili 72 h, nisu histološki pokazale značajnije razlike u intenzitetu obilježavanja, već se blaga razlika u intenzitetu uočila između hondrocita obilježenih manjom i većom koncentracijom (Slika 11). Može se zaključiti kako je 24 h tretmana najmanjom koncentracijom, 2 mgL^{-1}, dovoljan za obilježavanje stanica na period od 14 dana. Rezultati sugeriraju kako je mala koncentracija dovoljna za detekciju nanočestica berlinskim modrilom te kako niti jedna koncentracija ne narušava rediferencijacijski potencijal, a ne optimalnu koncentraciju i duljinu tretmana. Istraživanja diferencijacije u hondrocite u prisustvu druge vrste nanočestica - veoma malih SPION-a, rađena na humanim mezenhimskim matičnim stanicama te su pokazala kako niti veoma mali SPION-i ne narušavaju diferencijacijski potencijal (Heymer i sur., 2008). Stoga je rezultat potvrđen za rediferencijaciju hondrocita uz obilježavanje nanočesticama PEG-a i manoze.

Rezultati metode qPCR potvrdili su kako predtretman nanočesticama manoze ne narušava rediferencijacijski potencijal stanica te skok u relativnoj ekspresiji kolagena II i agrekana tijekom 14 dana diferencijacijske kulture. Ekspresija markera hondrogeneze, kolagena II i agrekana te kolagena I kojeg hrskavični hondrociti ne eksprimiraju praćena je za hondrocite u 3D kulturi tretirane samo nanočesticama manoze. Nanočestice PEG-a uklone se ispiranjem prije uspostave 3D kulture te ne mogu utjecati na ekspresiju gena tijekom rediferencijacije. Relativna ekspresija je uspoređena s netretiranim hondrocitima u adherentnoj kulturi kao vanjskom kontrolom. Iako bi za ovaj eksperiment bolje bilo koristiti mRNA hondrocita izoliranih iz hrskavičnog tkiva, zbog problema sa homogenizacijom i lošom kvalitetom izolirane RNA korištene su dediferencirane stanice.

Relativna ekspresija kolagena I, kolagena II i agrekana u uzorcima hondrocita u 3D kulturi izoliranih prvi dan mnogo je niža od ekspresije u kontroli. Stanice nakon prvog dana kulture nisu započele rediferencijaciju, što se podudara s rezultatima bojenja safraninom O. Također, izrazito slaba regulacija promatranih gena može biti zbog adaptacije stanica na novonastale uvjete u 3D kulturi hondrocita te su trebale proći period prilagodbe. Relativna ekspresija kolagena II je na vrhuncu 7. dan 3D kulture, a agrekana 14. dan. Kolagen I je najsnažnije eksprimiran 7. dan, a 14. opada kod većine uzoraka. Kolagen II je najobilnija komponenta izvanstaničnog matriksa (Fox i sur., 2009) te vjerojatno zbog toga ima najveću relativnu ekspresiju sedmi dan 3D kulture. Također, proliferacija stanica nakon više tjedana u 3D kulturi opada (Kilian i sur., 2016), pa moguće da zbog toga opada i ekspresija kolagena II 14. dan, iako još uvijek ostaje intenzivna naspram ekspresije agrekana i kolagena I. Prominentnija

relativna ekspresija agrekana nakon 14 dana 3D kulture je potvrđena prijašnjim istraživanjima na modelu humanih mezenhimskih matičnih stanica. Povezan je povećani broj stanica koje morfološki naliče diferenciranim hondrocitima tijekom hondrogeneze sa pojačanom ekspresijom agrekana (Takagi i sur., 2008). Intenzitet obojenja safraninom O sugerira količinu proteoglikana i glikozaminoglikana u stanici te intenzivnije obojenje 14. dan kulture se slaže s rezultatima najveće relativne ekspresije agrekana. Nadalje, hondrociti u rediferencijaciji eksprimiraju prvotno kolagen II, a nakon toga agrekan, vjerojatno je kolagen II potreban za slaganje ostatka strukture izvanstaničnog matriksa. Još valja primijetiti da netretirani hondrociti u rediferencijacijskoj kulturi i uzorci tretirani najmanjom 2 mgL^{-1} manoza nanočestica, imaju izraženiju ekspresiju kolagena II i agrekana, no uzorci tretirani koncentracijom 20 mgL^{-1}. Prijašnja istraživanja su pokazala da u prisustvu nekih vrsta SPION-a nema hondrogeneze (Kasten i sur., 2014) stoga je moguće da rediferencijacijski potencijal slabi zbog veće koncentracije nanočestica manoze.

Ovim radom učinjeni su preliminarni testovi djelovanja nanočestica PEG-a i manoze na hondrocite i njihovu diferencijaciju. Rezultati mogu služiti kao podloga za nastavak istraživanja vizualizacije i praćenja hrskavičnih oštećenja nanočesticama PEG-a i manoze. U budućim eksperimentima potrebno je optimizirati koncentracije i duljine tretmana radi efikasnijeg obilježavanja te istražiti ponašanje nanočestica manoze. Nanočesticama PEG-a bi se moglo ispitati obilježavanje gotovog hrskavičnog presatka, a ne samih stanica te uvidjeti mogu li se tada akumulirati u presatku.

5. ZAKLJUČAK

Ispitan je utjecaj dviju vrsta nanočestica željezovih oksida, Fe_3O_4-SiO_2-PEG i D-manoza-γ-Fe_2O_3, na hondrocite izolirane iz nosnog septuma ovce. Nanočestice ne reduciraju preživljenje u odnosu na kontrolne netretirane stanice. Nadalje, tretman nanočesticama PEG-a i manoze ne narušava proliferacijski kapacitet stanica te se one neometano dijele. Hondrociti internaliziraju nanočestice manoze, dok se nanočestice PEG-a ispiru te niti u jednoj koncentraciji ne obilježavaju stanice. Obilježavanjem stanica nanočesticama te postavljanjem hondrocita u uvjete 3D kulture ne narušava se njihov rediferencijacijski potencijal. Morfologija hondrocita slična je zrelom hrskavičnom tkivu, te sadrži proteoglikane i glikozaminoglikane u izvanstaničnom matriksu. Nanočestice PEG-a nisu detektirane u 3D kulturi hondrocita, dok nanočestice manoze jesu. Rezultati relativne ekspresije gena potvrđuju znatno veću ekspresiju kolagena II i agrekana kod hondrocita u 3D kulturi tretiranih nanočesticama manoze no kod kontrolnih dediferenciranih stanica što znači da nanočestice manoze ne narušavaju hondrogeni potencijal. Stoga, nanočestice manoze bi se mogle potencijalno koristiti kao kontrastni reagens za vizualizaciju i praćenje hrskavičnih presadaka. Specifično obilježavaju hondrocite u adherentnoj kulturi, zadržavaju se kroz period od 14 dana te ne reduciraju preživljenje stanica niti reduciraju rediferencijacijski potencijal hondrocita.

6. LITERATURA

Alexiou C., Jurgons R., Seliger C., Brunke O., Iro H., Odenbach S. (2007): Delivery of superparamagnetic nanoparticles for local chemotherapy after intraarterial infusion and magnetic drug targeting. Anticancer Research **27**: 2019-2022.

Ali A., Zafar H., Zia M., ul Haq I., Phull A. R., Ali J. S., Hussain A. (2016): Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. Nanotechnology, Science and Applications **9**: 49-67.

Bhardwaj N., Devi D., Mandal B. B. (2014): Tissue-engineered cartilage: the crossroads of biomaterials, cells and simulating factors. Macromolecular Bioscience **15**: 153-182.

Bhatia S. (2016): Natural polymer drug delivery systems: nanoparticles, plants, and algae. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. Springer International Publishing, str. 33-93.

Camplejohn K. L., Allard S. A. (1987): Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. Histochemistry **89**: 185-188.

Caron M. M. J., Emans P. J., Coolsen M. M. E., Voss L., Surtel D. A. M., Cermers A., van Rhijn L. W., Welting T. M. J. (2012): Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes:comparison of 2D and 3D cultures. Osteoarthritis and Cartilage **20**: 1170-1178.

Chagin A. S., Medvedeva E. V. (2017): Cartilage stem cells identified but can they heal? Nature Reviews Rheumatology **13**: 522-524.

Christian P., Von Der Kammer F., Baalousha M., Hofmann T. (2008): Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. Ecotoxicology **17**: 326-343.

Cook J. L., Hung C. T., Kuroki K., Stroker A. M., Cook C. R., Pfeiffer F. M., Sherman S. L., Stannard J. P. (2014): Animal models of cartilage reapair. Bone & Joint Research **3**: 89-94.

Di Bella C., Fosang A., Donati D. M., Wallace G. G., Choong P. F. M. (2015): 3D bioprinting of cartilage for orthopedic surgeons:reading between the lines. Frontiers in Surgery **2**: 39.

Esterlich J., Sanchez-Martin M. J., Busquets M. A. (2015): Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. International Journal of Nanomedicine **10**: 1727-1741.

Fischer A. H., Jacobson K. A., Rose J., Zeller R. (2008): Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. Cold Spring Harbor Protocols **3**.

Foektistova M., Geserick P., Leverkus M. (2016): Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. Cold Spring Harbor Protocols **4**.

Fox A. J. S. , Bedi A., Rodeo S. A. (2009): The basic science of articular cartilage. Sports Health **1**: 461-468.

Garza-Veloz I., Romero-Diaz V. J., Martinez-Fierro M. L., Marino-Martinez I. A., Gonzalez-Rodriguez M., Martinez-Rodriguez H. G.; Espionza-Juarez M. A., Bernal-Garza D. A., Ortiz-Lopez R., Rojas-Martinez A. (2013): Analyses of chondrogenic induction of adipose mesenchymal stem cells by combined co-stimulation mediated by adenoviral gene transfer Arthritis Research & Therapy **15**: R80.

Han L., Grodzinsky A. J., Ortiz C. (2011): Nanomechanics of the cartilage extracellular matrix. Annual Review Master Research **41**: 133-168.

Heymer A., Haddad D., Weber M., Gbureck U., Jakob P. M., Eluert J., Noth U. (2008): Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair. Biomaterials **29**: 1473-1483.

Horak D., Babič M., Jendelova P., Herynek V., Trchova M., Petka Z., Pollert E., Hajek M., Sykova E. (2007): D-Mannose-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. Bioconjugate Chemistry **18**: 635-644.

Horak D., Babič M., Jendelova P., Herynek V., Trchova M., Likavčanova K., Kapcalova M., Hajek M., Sykova E. (2009): Effect of different magnetic nanoparticle coating on the efficiency of stem cell labeling. Journal of Magnetism and Magentic Materials **321**: 1539-1547.

Hoshi K., Fujihara Y., Asawa Y., Nishizawa S., Kanazawa S., Sakamoto T., Watanabe M., Ogasawara T., Saijo H., Mori Y., Takato T. (2012): Recent trends in cartilage regenerative medicine and its application to oral and maxillofacial surgery. Oral Science International **10**:15-19.

Huber D. L. (2005): Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. Small **1**: 482-501.

Ittrich H., Peldschus K., Raabe N., Kaul M., Adam G. (2013): Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: applications and developments in diagnostics and therapy. Fortschritte Auf Dem Gebiete Der Rotgenstrahlen **185**: 1149-1166.

Johannsen M., Gneveckow U., Eckelt L., Feussner A., Waldofner N., Scholz R., Deger S., Wust P., Loening S. A., Jordan A. (2005): Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. International Journal of Hyperhermia **21**: 637-647.

Jokerst J. V., Lobovkina T., Zare R. N., Gambhir S. S. (2011): Nanoparticle PEGylation for imagining and therapy. Nanomedicine (London) **6**: 715-728.

Kasten A., Gruttner C., Kuhn J. P., Bader R., Pasold J., Frerich B. (2014): Comparative *in vitro* study on magnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking of adopose tissue-derived progenitor cells. Plos One **9**: e108055.

Kennedy D. C., Orts-Gil G., Lai C. H., Muller L., Haase A., Luch A., Seeberger P. H. (2014): Carbodydrate functionalization of silver nanoparticles modulates cytotoxicity and cellular uptake. Journal of Nanobiotechnology **12**: 59.

Khan I., Saeed K., Khan I. (2017): Nanoparticles: properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry.

Killian T., Fidler F., Kasten A., Nietzer S., Landgraf V., Weiss K., Walles H., Westphal F., Hackenberg S., Gruntter C., Steinke M. (2016): Stem cell labeling with iron oxide nanoparticles: impact of 3D culture on cell labeling maintenance. Nanomedicine **11**: 1957-1970.

Kong B., Seog J. H., Graham L. M., Lee S. B. (2011): Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. Nanomedicine (London) **6**: 929-941.

Kostiv U., Patsula V., Šlouf M., Pongrac I. M., Škokić S., Dobrojević Radmilović M., Pavičić I., Vinković Vrček I., Gajović S., Horak D. (2017): Physico-chemical characteristics, biocompatibility, and MRI applicability of novel monodisperse PEG-modified magnetic Fe_3O_4&SiO_2 core-shell nanoparticles. Royal Society of Chemistry Advances **7**: 8786-8797.

Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., Sen T. (2010): Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. Advenced Drug Delivery Reviews **63**: 24-46.

Makris E. A., Gomoll A. H., Malizos K. N.; Hu J. C., Athanasiou K. A. (2015): Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. Nature Reviews Rheumatology **11**: 21-34.

Mortimer C. J., Wright C. J. (2017): The fabrication of iron oxide nanoparticle-nanofiber composites by electrospinning and their application in tissue engineering. Biotechnology Journal **12**: 1600693.

Muir H. (1995): The chondrocyte, architect of cartilage. BioEssays **17**: 1039-1048.

Owens D. E., Peppas N. A. (2006): Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics **307**: 93-102.

Parsa H., Shamsasenjan K., Movassaghpour A., Akbarzadeh P., Amoghli Tabrizi B., Dehdilani N., Lotfinegad P., Soleimanloo F. (2015): Effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles-labeling on mouse embryonic stem cells. Cell Journal **17**: 221-230.

Polyak B., Friedman G. (2009): Magnetic targeting for site-specific drug delivery: applications and clinical potential. Expert Opinion on Drug Delivery **6**: 53-70.

Pongrac I. M., Dobrivojević M., Brkić Ahmed L., Babič M., Šlouf M., Horak D., Gajović S. (2016): Improved biocompatibility and efficient labeling of neural stem cells with poly(L-lysine)-coated maghemite nanoparticles. Beilstein Journal of Nanotechnology **7**: 926-936.

Pongrac I. M., Pavičić I., Milić M., Ahmed Brkić L., Babič M., Horak D., Vinković Vrček I., Gajović S. (2016): Oxidative stress response in neural stem cells exposed to different superparamagnetic iron oxide nanoparticles. International Journal of Nanomedicine **11**: 1701-1715.

Ramaswamy S., Greco J. B., Uluer M. C., Zhang Z., Zhang Z., Fishbein K. W., Spencer R. G. (2009): Magnetic resonance imagining of chondrocytes labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles in tissue-engineered cartilage. Tissue Engineering Part A **15**: 3899-3910.

Riss T. L. ,Moravec R. A., Niels A. L., Duellamn S., Benink H. A., Worzella T., Minor L. (2013): Cell viability assays. U: Sittampalam G. S., Coussens N. P., Brimacombe K. (ur.) Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Schulze-Tanzil G. (2009): Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. Annals of Anatomy **191**: 325-338.

Sharma V., Ichikawa M., Freeze H. H. (2014): Mannose metabolism: more than meets the eye. Biochemical and Biophysical Research Communications **453**: 220-228.

Takagi M., Kitabayashi T., Koizumi S., Hirose H., Kondo S., Fujiwara M., Ueno K., Hiaroki M., Hosokawa Y., Masuhara H., Wakitani S. (2008): Corelation between cell morphology and aggrecan gene expression level during differentiation from mesenchymal stem cells to chondrocytes. Biotechnology Letters **30**:1189-1195.

Vinković Vrček I., Pavičić I., Crnković T., Jurašin D., Babič M., Horak D., Lovrić M., Ferhatović L., Ćurlin M., Gajović S. (2015): Does surface coating of metallic nanoparticles modulate their interference with *in vitro* assays? Royal Society of Chemistry Advances **5**: 70787-70807.

Wahajuddin S. A. (2012): Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic platforms as drug carrier. International Journal of Nanomedicine **7**: 3445-3471.

Wei H., Burns O. T., Kaul M. G., Hansen E. C., Barch M., Wisniowska A., Chen O., Chen Y., Li N., Okada S., Cordero J. M., Heine M., Farrar C. T., Montana D. M., Adam G., Ittrich H., Jasanoff A., Nielsen P., Bawendi M. G. (2016): Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive MRI contrast agents. Proceedings of the National Academy of Sciences **114**: 2325-2330.

Zhang W. (2014): Nanoparticle aggregation: principles and modeling. Advances in Experimental Medicine and Biology **811**: 19-43.

Ziv-Polat O., Margel S., Shahar A. (2015): Application of iron oxide nanoparticles in neuronal tissue engineering. Neural Regeneration Research **10**: 189-191.

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Tihana Marić
Kninski trg 15, 10000 Zagreb
+385 98 995 5743, tihana.maric0@gmail.com

Radno iskustvo:

2016-danas	studentski posao u Poliklinici BetaPlus
2015-danas	studentski posao u Parku prirode Medvednica

Obrazovanje i osposobljavanje:

2015-danas	Diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu
2012-2015	Preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu
2008-2012	Prirodoslovno-matematička gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog, Našice

Iskustvo:

ožujak 2015 – lipanj 2015	Laboratorijska stručna praksa, Laboratorij za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju, PMF Zagreb

Konferencije:

"10th ISABS conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine", Dubrovnik, 2017

"8th RECOOP Annual Project Review Meeting", Zagreb 2017

Osobne vještine:

Jezici – hrvatski (materinski), engleski (C1), korejski (A2)

Računalna pismenost – Windows i Linux

Vozačka dozvola – B kategorija