

LOCALIZATION OF IRON NANOPARTICLES IN INTRACELLULAR ORGANELLES

Jan Solarř

Bachelor Degree Programme (3), FEEC BUT

E-mail: xsolar00@stud.feec.vutbr.cz

Supervised by: Vratislav řmiel

E-mail: cmiel@feec.vutbr.cz

Abstract: Nanoparticles are important tool of modern science, which interferes in many areas of application. The issues of the behavior of iron nanoparticles in human tissues have been already discussed. This work examines a behavior of two types of modern experimental iron nanoparticles in human cells. After a literary research it seems that retention and redistribution of these types of nanoparticles are not fully explored. We mainly need to solve a nescience in which cell structures nanoparticles penetrate and how they behave after embedding. Next questions deal with their kinetic of influx, redistribution over time and safety for their practical use. We will also focus on quantification of nanoparticles in important cell functional structures like mitochondria and nucleus in long time cultivation, which presumably leads to toxicity effects.

Keywords: Iron nanoparticles, confocal microscopy, fluorescence, colocalization, cell biology

1. řVOD

Využití řezitých nanořástic v medicině se nachází v léčbě nádorů pomocí generování tepla, k cílenému magnetickému transportu léčiv a výrobě kontrastních látek pro magnetickou rezonanci. U těchto aplikací je z hlediska bezpečnosti velice důležitě znát v jakých buněčných organelách se nanořástice akumulují, jak dlouho v buňce vydrží a jak rychlá je dynamika pohlcování nanořástic buňkou. Další důležité vlastnosti se týkají otázek v jaké míře a po jaké době jsou nanořástice pro buňku toxické nebo jakým způsobem se chovají, pokud je buňka vyloučí do extracelulárního prostoru a podobně. Odpovědi na všechny tyto otázky jsou hlavním cílem této práce.

2. METODIKA MĚŘENÍ

Jedním z nejefektivnějších nástrojů pro lokalizaci buněčných struktur je konfokální mikroskop. Výhodou konfokální mikroskopie je zejména vysoké prostorové rozlišení (více než 64 mil. bodů na prostor několika mm) a možnost fluorescenčního zobrazování ve velice úzkém řezu strukturou buňky a z toho plynoucí schopnost sestavení 3D obrazu sledované buněčné struktury. Konfokální mikroskopie také umožňuje přesně odlišit nebo naopak kolocalizovat jednotlivé struktury s využitím více fluorescenčních barviv. Každá fluorescenční barva pak udává polohu dané barvené struktury. Výhodou je právě možnost lokalizace umístění cizorodých nanořástic v buňce, které již mají samy schopnost fluorescence. K účelům této práce jsou využívány mezenchymální kmenové buňky, které jsou v současnosti světově užívaným modelem v experimentální buněčné a tkáňové medicině (biologii).

2.1. EXPERIMENTÁLNÍ MĚŘÍCÍ ZAŘÍZENÍ

Pro sledování aktivity nanořástic byl využit konfokální mikroskop značky Leica, s přesným označením: Leica TCS SP8 X. Tento mikroskop využívá jako zdroj excitace WLL (řirokopásmový laser s bílým světlem) až s 8 excitačními kanály, které zajišťují dostatečné podmínky pro kompletní excitaci více barviv. Možnost volby libovolných excitačních laserových řar v rozsahu 470 – 800 nm

je velice důležitá pro efektivní excitaci fluorescenčních barviv. Jako snímače jsou v mikroskopu použity fotonásobiče a hybridní detektory s optickými hranoly, zařazenými v optické cestě tak, že umožňují precizní výběr libovolných emisních vlnových délek s přesným rozložením dle emisních spekter jednotlivých barviv. Měřicí část přístroje funguje také jako inkubační komora použitých buněk, s řízenou atmosférou a teplotou. Inkubační komora nahrazuje přirozenou atmosféru buněk, což je výhoda v případě dlouhodobých experimentů s průběžným skenováním v nastavených časových intervalech. [1]

2.2. LOKALIZACE ORGANEL A NANOČÁSTIC S VYUŽITÍM KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Barviva pro pozorování a odlišování organel, využívají pro přesnou afinitu většinou jejich specifických vlastností, např. kyselé prostředí lysozomů nebo specifická mitochondriální membrána apod. Při fluorescenčním pozorování nanočástic je potřeba buď nanočástice obalit chemickou látkou, která fluorescenci vykazuje nebo použít speciálních nanoteček, které fluoreskují spontánně. Pro potřeby této práce je nejprve potřeba nalézt a zobrazit pod mikroskopem samotné organely a nanočástice, optimalizovat pro ně excitační a emisní spektra a až potom snímat nanočástice a organely současně a vyvodit ze společného pozorování závěry.

2.3. METABOLISMUS NANOČÁSTIC V BUŇCE

Vědecké články zabývající se touto problematikou se jednoznačně shodují, že nanočástice se primárně koncentrují v lysozomech. Pokud se nanočástice dostanou k funkčním strukturám, jako jsou mitochondrie, v horším případě buněčné jádro, nastává velký problém s toxicitou těchto částic. Toxicita je pravděpodobně způsobena vznikem kyslíkových a hydroxylových radikálů. Pro prevenci těchto jevů je důležité nepřekročit koncentraci nanočástic 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$. [1][1]

3. VÝSLEDKY

Při použití experimentálních, nekomerčně vyráběných železitých nanoteček nastal problém s neznalostí jejich emisně / excitačního spektra. Jejich spektrum se nám podařilo nalézt pomocí analýzy spekter, tzv. λ -scanem přímo v Leica softwaru (Obrázek 1). Spektrum těchto nanočástic je poměrně široké (excitační peak 510-520 nm a emisní peak 600 nm) a může zasahovat do fluorescenčního spektra použitého lysozomálního barviva Cell Navigator- Lysozome staining kit, které má excitační vrchol v 575 nm a emisi na 597 nm.

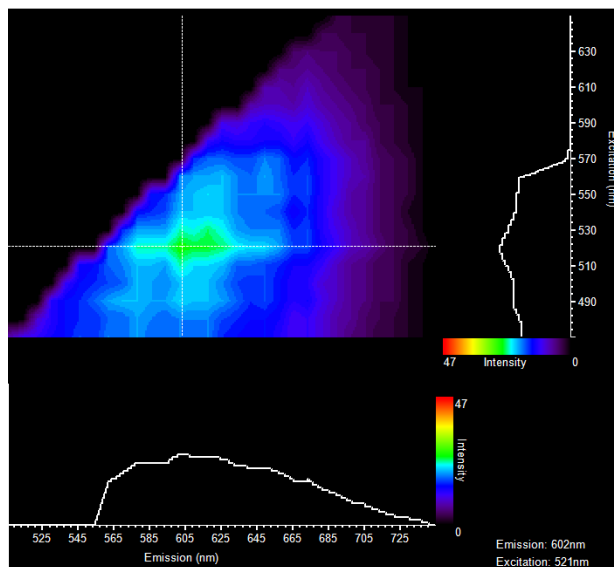
Výsledky lokalizace potvrzují teoretické předpoklady, kdy se poloha mitochondrií (na obrázku zeleně) a nanočástic (červeně) neshoduje. Fyziologický tvar buňky svědčí pravděpodobně o tom, že nanočástice neměly na buňku žádný toxický vliv a neovlivňovaly činnost mitochondrií (obrázek 2 vlevo). Na posledním obrázku vpravo je vidět ukázková detailní kolokalizace zeleně značených nanočástic ve středech červených lysozomů, což potvrzuje domněnku, že buňka nanočástice pohlcuje jako cizorodé tělíška a z důvodu bezpečnosti je kumuluje do lysozomů (obrázek 2 vpravo).

Tyto výsledky byly naměřeny pro jeden typ železitých nanočástic s koncentrací 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (reakční doba pro prostoupení nanočástic do buňky byla úspěšně optimalizována na 24 hodin) a nelze je generalizovat pro všechny železité nanočástice

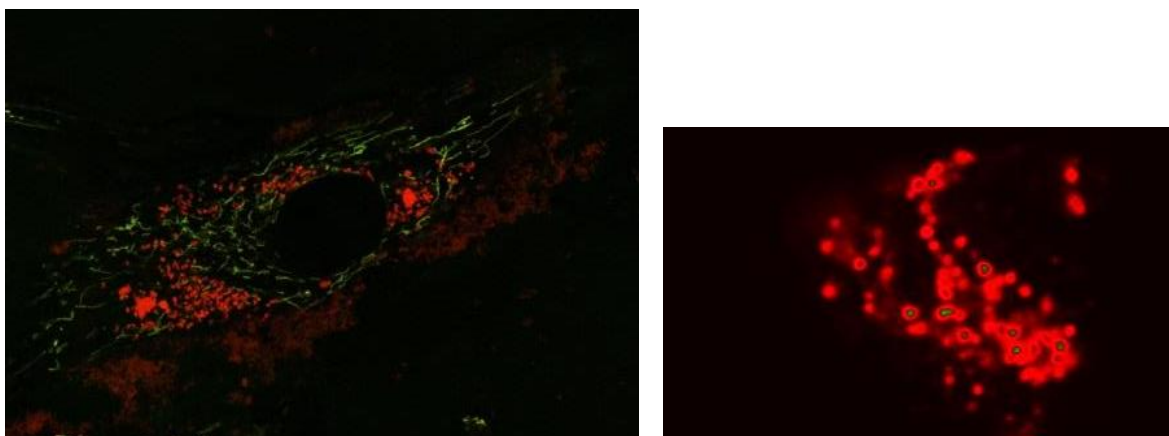
4. ZÁVĚR

Prozatímní výsledné snímky potvrzují teoretické předpoklady chování nanočástic v buňkách. Z důvodu překryvu fluorescenčních spekter nanočástic a lysozomů bude do příště nutné potvrdit tyto výsledky i pro lys. barvivo s jiným excitačně-emisním spektrem. Další část práce bude obsahovat vytvoření softwaru pro automatickou analýzu chování nanočástic – procentuální zastoupení nanočástic v jednotlivých organelách. Velice podstatná bude kvantifikace nanočástic podle koncentrace a době trvání kultivace buněk s nanočásticemi. Vytvoří se detailní a rozsáhlá statistika pro více vzorků buněk, aby nedošlo k předčasným a nepodloženým závěrům chování nanočástic v buňkách.

V další části práce se budeme zabývat dynamikou prostupu nanočástic do buněk. Tyto informace jsou důležité také pro určení dynamiky prostupování nanočástic in vitro, zejména upřesnění optimální doby jejich aplikace pacientům.



Obrázek 1: λ -scan železitých nanočástic. Vodorovná osa značí emisi a svislá excitaci v nm.



Obrázek 2: Vlevo: nanočástice (červeně) a mitochondrie (zeleně). Vpravo: kolokalizace nanočástic (zeleně) a lysozomů (červeně) v jiné buňce.

REFERENCE

- [1] LEICA-MICROSYSTEMS. TCS SP8-Brochure [online]. 2012 [cit. 2013-12-31]. Dostupné z: <http://www.leica-microsys.com/fileadmin/downloads/Leica%20TCS%20SP8%20X/Brochures/Leica%20TCS%20SP8-Brochure_EN.pdf>
- [2] ARBAB, Ali S., Lindsey B. WILSON, Parwana ASHARI, Elaine K. JORDAN, Bobbi K. LEWIS a Joseph A. FRANK. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomedicine*. 2005, vol. 18, issue 6, s. 383-389. DOI: 10.1002/nbm.970. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/nbm.970>>