

**Institutionen för fysik, kemi och biologi**

**Examenarbete**

**In-vitro studier av inflammatorisk svar från helblod och neutrofila granulocyter vid aktivering med nanopartiklar**

**Natalia Abrikossova**

**Examensarbetet utfört vid IFM och IMV**

**07-05-14**

**LITH-IFM-EX--07/1820—SE**



**TEKNISKA HÖGSKOLAN**  
LINKÖPINGS UNIVERSITET

**Linköpings universitet Institutionen för fysik, kemi och biologi**  
**581 83 Linköping**

**Institutionen för fysik, kemi och biologi**

**In-vitro studier av inflammatorisk svar från helblod och neutrofila granulocyter vid aktivering med nanopartiklar**

**Natalia Abrikossova**

**Examensarbetet utfört vid IFM och IMV**

**07-05-14**

**Handledare  
Torbjörn Bengtsson**

**Examinator  
Kajsa Uvdal**



**TEKNISKA HÖGSKOLAN**  
LINKÖPINGS UNIVERSITET





**Avdelning, institution**  
Division, Department

Chemistry  
Department of Physics, Chemistry and Biology  
Linköping University

**Datum**  
Date

07-05-14

**Språk**  
Language

Svenska/Swedish  
 Engelska/English

\_\_\_\_\_

**Rapporttyp**  
Report category

Licentiatavhandling  
 Examensarbete  
 C-uppsats  
 D-uppsats  
 Övrig rapport

\_\_\_\_\_

**ISBN**

**ISRN: LITH-IFM-EX--07/1820--SE**

**Serietitel och serienummer**  
Title of series, numbering

**ISSN**

\_\_\_\_\_

**URL för elektronisk version**

**Titel**  
Title

*In-vitro* studier av inflammatorisk svar från helblod och neutrofila granulocyter vid aktivering med nanopartiklar

*In vitro* studies of inflammatory reactions in whole blood and neutrophil granulocytes activated by nanoparticles.

**Författare** Natalia Abrikossova  
Author

**Sammanfattning**  
Abstract

Syftet med detta arbete var att studera inflammatoriska effekter i mänskligt helblod och neutrofila granulocyter exponerade och stimulerade av nanopartiklar av gadoliniumoxid. Projektet utreder den toxiska potentialen hos nanopartiklar med olika kemiska och morfologiska egenskaper.

I experimenten undersöktes cellresponser hos blodceller exponerade med ofunktionaliserade och funktionaliserade nanopartiklarna. Effekterna av funktionaliserade och ofunktionaliserade nanopartiklarna på aggregation och syreradikalproduktion i helblod och hos neutrofila granulocyter studerades med hjälp av lumi-aggregometri.

Studier har visat att varken ofunktionaliserade eller funktionaliserade nanopartiklarna ger aggregation i blodet. Syreradikalproduktionen ökar däremot. Resultaten av studier i helblod visar att stimulering med spädnings serier av funktionaliserade nanopartiklar ger mindre frisättning av syreradikaler än spädnings serier med ofunktionaliserade nanopartiklar. Detta bekräftas med studier av morfologiska skillnader i neutrofila granulocyter som var stimulerade med olika typer av nanopartiklar. Detta gjordes med hjälp av fluorescensmikroskopi. Resultaten från studierna tyder på att funktionaliserade nanopartiklar är mindre inflammatoriska än ofunktionaliserade nanopartiklar.

**Nyckelord**

Keyword blod; neutrofila granulocyter; nanopartiklar; syreradikalproduktion



## Introduktion

Utveckling av nanoteknologiska tillämpningar för observation, diagnostering och behandling av olika sjukdomar ger möjlighet att införa begreppet nanomedicin [1]. Nanomedicin är ett modernt och spännande område för forskning och nanoteknologi inom medicin kan ge nya möjligheter för att utveckla bättre metoder för diagnostik och behandling. I detta projektarbete studeras hur nanometerstora partiklar av gadoliniumoxid beter sig i olika biologiska system. Detta görs främst inom forskning och utveckling av nya kontrastmedel för magnetresonanstomografi och även andra medicinska tillämpningar.

Nanopartiklar har storlek på 5-10 nm ( $5-10 \times 10^{-9}$  m). De är betydligt mindre än celler, som varierar i storlek från 10 till 100  $\mu\text{m}$  [2] eller även virus som kan vara från 0,02 till 0,4  $\mu\text{m}$ . Nanopartiklar är närmare till globulära proteiner, vars storlek är på 2-10 nm. De är lite större än socker molekyler, aminosyror och nukleotider som har storleken 0,5-1 nm. [3]. Man kan säga att nanopartiklarna ligger på en egen storleks nivå mellan mikroskopiska strukturer och molekyler. På grund av det kan nanopartiklar komma i närmare kontakt med biologiska system även på molekylär nivå. Nanopartiklar av gadoliniumoxid är magnetiska, luminescenta och kan fånga upp neutroner. Deras luminescenta egenskaper kan användas vid studier av vävnader och celler i ett fluorescensmikroskop[4]. Nanometerstora partiklar av gadoliniumoxid kan även användas som kontrastmedel vid undersökningar med magnetkamera (MRT). De kan ge en signal som är 100 gånger starkare än de kommersiella produkter som redan finns [5,6].

Undersökningar med MRT görs främst på de större sjukhusen. Med MRT kan även mjukdelar av kroppens inre ses jämfört med röntgentomografi som visar bara skelettet.

Magnetisk resonanstomografi baseras på magnetkamerans egenskaper att få vätekärnors protoner i kroppen att ändra magnetisering och absorbera energi med hjälp av en kombination av magnetfält och radiovågor. Sedan sänder protoner tillbaka en svag signal som detekteras med hjälp av dator som omvandlar informationen till tredimensionella bilder. Eftersom nanopartiklar av gadoliniumoxid är magnetiska kan det ge bättre kontraster och tydligare bilder särskild för de små förändringar i kroppen som inte syns i en vanlig MRT undersökning. En liten tumör kan till exempel bli synlig och diagnosteras tidigare hos patienten. Ett viktigt mål är att nanopartiklar inte bryts ner i kroppen utan att de istället utsöndras oförändrade via njurarna. Till skillnad från flera av de kommersiella kontrastmedel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ , Gd DTPA) som metaboliseras i levern.

För att funktionalisera och göra nanopartiklar mer biokompatibla förses de med ett skikt av polymerer. Detta görs för att minska frisättningen av gadoliniumoxid joner som annars skulle kunna leda till toxiska effekter och för att reducera svaret från immunsystemet.

Dessa biofunktionaliserade partiklar ger en kontrastökning i MRI jämfört med kommersiallt tillgängliga kontrastmedel. I framtiden skulle nanopartiklarna också kunna göras målsökande genom att utrusta nanopartiklarna med olika signalsubstanser som hormoner, peptider, antigener. Dessa skulle då kunna binda till en viss celltyp eller receptor och ge en specifik effekt.

Framtida tillämpningar inom biomedicin är till exempel:

att spåra och diagnostera cancer, och sedan med neutronbestrålning slå ut celler som fångat upp partiklarna, diagnostera kärlplack i halspulsådern, diagnostera Alzheimers sjukdom, guida läkemedel till en viss plats etc.[7]

I detta projekt studerades effekterna av funktionaliserade och ofunktionaliserade nanopartiklarna med avseende på aggregation och syreradikalproduktion i helblod och hos neutrofila granulocyter med hjälp av lumi-aggregometri.

Neutrofila granulocyter och trombocyter är nödvändiga i inflammatoriska och hemostatiska processer. Neutrofila granulocyter utgör 60-70% av blodets leukocyter och är en viktig del i kroppens försvar mot främmande ämnen och partiklar.

Neutrofila granulocyter har kort överlevnads tid. Deras funktion är kemotaxis, fagocytos och sekretion. Fagocytos leder till ökad  $O_2$  förbrukning och bildning av syreradikaler  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  (väteperoxid) och hydroxylradikaler  $OH\bullet$ . Sannolikheten för fagocytos ökar om främmande partiklar har en ojämn yta.[8] Trombocyterna bildas i benmärgen från megakaryocyter genom avknoppning av små delar av deras cytoplasma omgivna av cellmembran. Antalet trombocyter i blodet är 40-50 gånger högre än det totala antalet leukocyter. Normalt har en vuxen person 150000-300000 trombocyter per  $\mu l$  blod. Trombocyterna har 9-10 dagars överlevnadstid i cirkulationen. Trombocyten har formen av en diskus med diameter  $2\mu m$ .

Trombocyternas funktioner är aggregering och sekretion [8,9].

I denna studie mättes syreradikalproduktion och aggregation i helblod och i en suspension av isolerade neutrofila granulocyter efter aktivering med olika typer av partiklar av gadoliniumoxid. På så sätt undersöktes möjligt inflammatorisk svar från helblod och neutrofila granulocyter och möjliga toxiska effekter från nanopartiklarna. Målet med detta projekt var att studera effekterna av funktionaliserade och



ofunktionaliserade nanopartiklar på aggregation och syreradikalproduktion i helblod och hos neutrofila granulocyter med hjälp av lumi-aggregometri.

Studien genomfördes med blod från frivilliga donatorer, nanopartiklar syntetiserades fram på kemilabb på Institutionen för Fysik, Kemi och Biologi.

Arbete var ett tvärvetenskapligt samarbete mellan Prof. T. Bengtssons forskargrupp Institutionen för Medicin och Vård, avdelningen för farmakologi och Prof .K. Uvdals forskargrupp Institutionen för fysik, kemi och biologi, Molekylär fysik vid Linköping universitet.

## **Material och metod**

### **Nanopartiklar**

På institutionen för fysik, kemi och biologi förbereddes olika spädning serier av ofunktionaliserade och funktionaliserade nanopartiklar av nanopartiklars suspension.

Den var syntetiserade på kemilaboratoriet på ifm vid Linköpings universitet.[10]

Syntes, dialys och biofunktionalisering gjordes av doktoranden M. Ahrén i forskargruppen molekylär ytfysik IFM .

Ofunktionaliserade nanopartiklar dialyserades först i milli-Q vatten för att ta bort överflödigt dietylenglykol (DEG) som finns i suspensionen och sedan späddes till olika koncentration. Vid biofunktionalisering av nanopartiklar förses de med polymerskikt.

15 mg av Mal-PEG-NHS löstes i 300µl Etanol. Sedan var 0.5 µl MPTES tillsatt och lösningen placerades i ultraljuds badet (Sanorex RX 100, Labasco). Efter 60 min tillsattes 1 ml av dialyserade nanopartiklar och allt sonikerades i 2 timmar för att sedan placeras på ett skakbord under ett dygn. Sedan överfördes lösningen till en

dialys membran (Spectrator, MWCO 10.000), vart suspensionen var dialyserad mot 10 liter Milli-Q vatten under 48 timmar.

Sedan späddes fuktionaliserade nanopartiklar till önskat koncentration och det förbereddes en spädning serie för mättningar.

Samtliga spädning serier av nanopartiklar beskrivs i tabell 1.

**Tabell 1: Beskrivning av spädnings serier av nanopartiklar använda i studier med helblod.**

Benämning av spädning serier	Beskrivning	Spädnings metod
G1-G4	Ofunktionaliserade nanopartiklar av gadoliniumoxid.	Serie förberedds 12.03.07 Späddas med milli-Q vatten. G1-ospädd G2-spädd 1+9 G3-spädd 1+19 G4-spädd 1+99
G5-G8	Ofunktionaliserade nanopartiklar av gadoliniumoxid.	Serie förberedds 19.03.07 Späddas med milli-Q vatten. G5-ospädd G6-spädd 1+9 G7-spädd 1+19 G8-spädd 1+99
G9-G12	Ofunktionaliserade nanopartiklar av gadoliniumoxid.	Serie förberedds.07 Späddas med milli-Q vatten. G9-ospädd G10-spädd 1+9

		G11-spädd 1+19 G12-spädd 1+99
F1-F4	Funktionaliserade partiklar Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -MPTES- MAL-PEG-NHS	Serie förbereds 12.03.07 Späddas med milli-Q vatten. F1-ospädd F2-spädd 1+4 F3-spädd 1+9 F4-spädd 1+99
F5-F6	Funktionaliserade partiklar Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -MPTES- MAL-PEG-NHS	Serie förbereds 19.03.07 Späddas med milli-Q vatten. F5-ospädd F6-spädd 1+4 F7-spädd 1+9 F8-spädd 1+99
F9-F12	Funktionaliserade partiklar Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -MPTES- MAL-PEG-NHS	Serie förbereds 22.03.07 Späddning av fryst prov med milli-Q vatten. F12-ospädd F11-spädd 1+4 F10-spädd 1+9 F9-spädd 1+99
F13-F16	Funktionaliserade partiklar Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -MPTES- MAL-PEG-NHS	Serie förbereds 22.03.07 Späddning av fryst prov med 0,1M NaCl F16-ospädd

		F15-spädd 1+4 F14-spädd 1+9 F13-spädd 1+99
F17-F20	Funktionaliserade partiklar Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -MPTES-MAL-PEG-NHS	Serie förbereds 2.04.07. Späddas med milli-Q vatten. F17-ospädd F18-spädd 1+4 F19-spädd 1+9 F20-spädd 1+99
F21-F24	Funktionaliserade partiklar Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -MPTES-MAL-PEG-NHS	Serie förbereds 2.04.07. Späddas med 0,1M NaCl F21-ospädd F22-spädd 1+4 F23-spädd 1+9 F24-spädd 1+99

För jämförelse gjordes också mätningar med Gd<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> och kommersiell kontrastmedel för magnetisk resonanstomografi Magnevist® i olika koncentration.

### **Helblod.**

Provmaterialet utgjordes av helblod i 5 ml vacutainerrör med grön propp innehållande heparin, som togs venöst från friska frivilliga donatorer.

## Mätning av aggregation och syreradikalproduktion i helblod.

Effekterna av nanopartiklarna på blodaggregation och syreradikalproduktion i helblod studerades med hjälp av lumi-aggregometri. Användes Lumi-aggregometer modell 560-Ca (Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA) (Bild 1).



Bild 1 Lumi-aggregometer modell 560-Ca (Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA)

Aggregation och syreradikalproduktion observerades parallellt för att kunna följa aktiveringen av blodceller efter stimulering med känt stimuli eller nanopartiklar. Möjlig helblodsaggregation studerades genom impedansmätning. En elektrod sänktes ner i en kyvett som innehöll provet. Elektroden bestående huvudsakligen av två ädelmetalls trådar blev nedsatt i ett prov vid mätning. Det fanns en växelström spänning i millivolts område över kretsen. Instrumentet mätte motstånd eller

impedans mellan de två trådarna. En dos av aggregations stimuli tillsattes till kyvetten detta stimulerade trombocyter till möjligt aggregation på de impederade trådarna. Denna ackumulering av trombocyter höjde den elektriska resistansen i kretsen. Höjningen av impedansen är direkt proportionell mot massan av aggregerade blodceller. [11]

Studier av syreradikalproduktion i helblod baserades på vita blodkropparnas egenskaper att aktiveras till eliminering av främmande ämnen och partiklar. De tog upp först stora mängder syre som omvandlades till fria syreradikaler som är aggressiva oxidanter. I samband med neutrofila granulocyter producerande av oxidativa syremetaboliter genererades även ljus, kemiluminescens, vilket mättes. För att förstärka kemiluminescensen användes luminol. Syreradikalerna reagerade med luminol och ett synligt ljus emitterades. Detta ljus mättes i en luminometer. Blodprov preparerades fram före analysen: Till ett analyskyvett tillsätts magnetomrörare, 500 µl hepariniserat blod, 500 µl fysiologisk NaCl-lösning och 20 µl luminol (som förbereddes genom att 400 µl 0,9% NaCl och 100 µl luminol stam blandades ihop). [9]

Före mättnings tempererades provet under omrörning i 5 min vid 37° C i aggregometer. Varefter instrument kalibrerades.

Aktivering av celler i blodprovet skedde genom tillsättning av nanopartiklar och joner från förberedda spädnings serier.

Som kontroll stimulerades provet med kollagen 5µg/ml (Chronolog Corp., Havertown, PA, USA).

Resultat av mättnings från aggregation och kemiluminiscens uttrycktes som procent av kontroll med kollagen. Kollagen inducerad aggregation är irreversibel, den börjar

efter 30 sekunder och får max amplitud efter 10-15 minuter. Kemiluminiscens respons ökar huvudsakligen under de 2 första minuterna [12].

## **Cellstudier**

Humana neutrofila granulocyter isolerades fram från hepariniserat helblod vid avdelningen för farmakologi med hjälp av doktorand Caroline Skoglund.

Effekterna av nanopartiklarna på cellaggregation och syreradikalproduktion studerades med hjälp av lumi-aggregometri. För dessa studier användes Lumi-aggregometer modell 560- Ca (Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA)

## **Mätning av aggregation och syreradikalproduktion i neutrofila granulocyter.**

För studier av syreradikalproduktion hos neutrofila granulocyter användes samma metod som i studier med helblod när man observerade luminol amplifierad kemiluminiscens. Effekterna av nanopartiklarna på cellaggregation mättes med optikal aggregation test, genom att mäta förändringen i ljustransmission.

Cellprov preparerades fram före analysen: till ett analyskyvett tillsätts magnetomrörare, 10 µl luminol, 10µl HRP och 1ml av neutrofiler. [9]

Före mätningarna tempererades provet under omrörning i 5 min vid 37° C i aggregometer. Varefter instrumentet kalibrerades.

Stimuleringar utfördes genom tillsatts av nanopartiklar och joner från förberedda spännings serier. Efter stimulering sparades 200µl av cellsuspension för färgning med bodipy-phalloidin efter fixering med PFA (paraformaldehyde). Som kontroll användes stimulering med fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalannine).

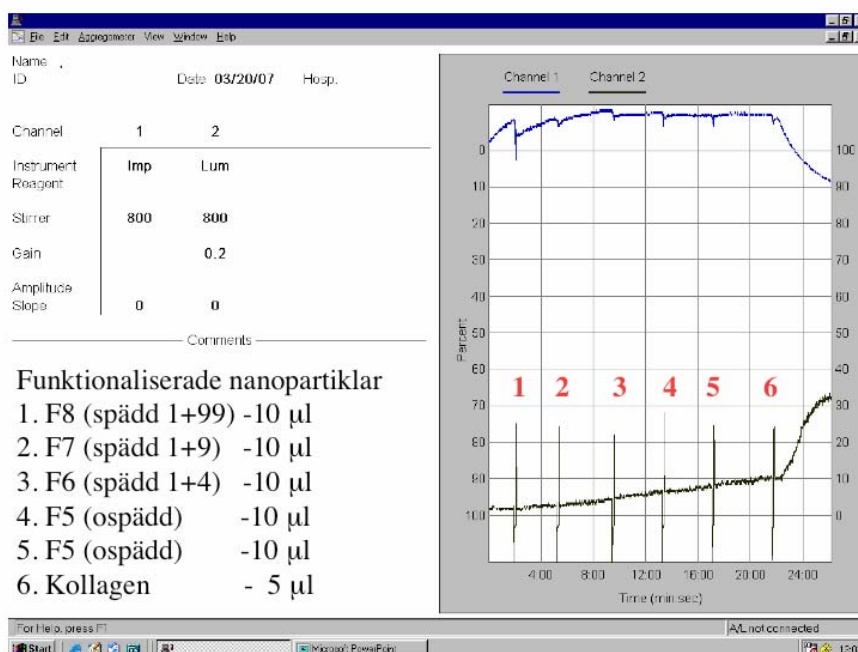
## Resultat

Det har utförts 33 olika mätningar i helblod med olika typer av stimulering.

Av dem vid 10 tillfällen stimulerades blodceller med ofunktionaliserade nanopartiklar, 13 av fallen var med funktionaliserade nanopartiklar, i 4 fall var stimuli rena Gd joner. För jämförelse gjordes mätningar med kommersiellt preparat Magnevist®. Dessutom gjordes kontroller med den kända stimuli kollagen.

De resultat som kunde beräknas, fick man ut i % av kontroll testet. Alla resultat finns i appendix. Aggregation och syreradikalproduktion mättes parallellt.

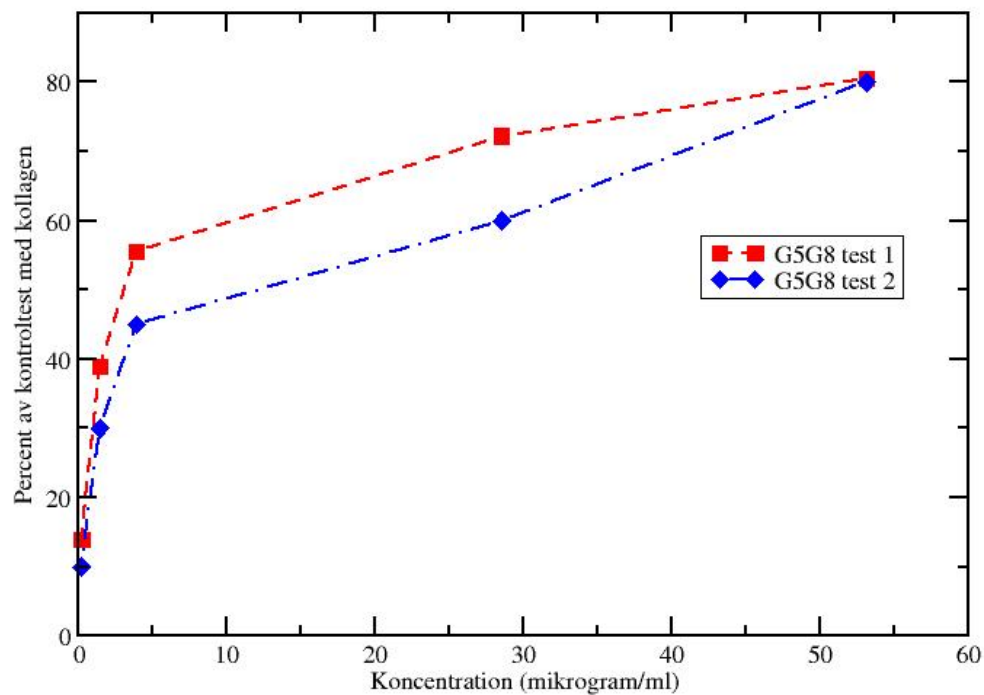
Det observerades ingen aggregation hos blodceller vid deras interaktion med nanopartiklarna varken funktionaliserade eller ofunktionaliserade. Däremot kunde en syreradikalproduktion detekteras. Ett exempel på hur aggregometern presenterade data finns i Figur 1.



Figur 1 Ett exempel på hur aggregometern presenterar data.



De resultat som kan tolkas med enkla förklaringar visas med hjälp av följande grafer. Resultat för syreradikal produktion i helblod vid tillsättning av ofunktionaliserade nanopartiklar som funktion av Gd koncentrationen presenteras i Figur 2. Eftersom det är blod från olika donatorer ser vi olika reaktion i syreradikalproduktion vid samma koncentration av Gd i provet.



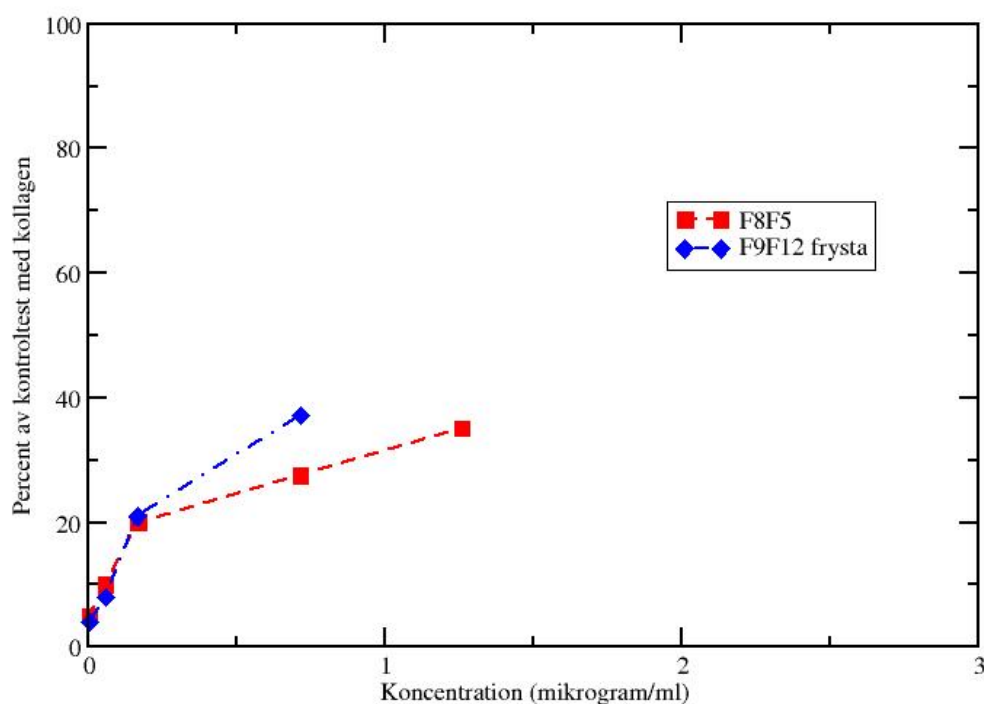
Figur 2. Syreradikal produktion i helblod efter tillsats av ofunktionaliserade partiklar. Hepariniserat helblod spätt 1:1 i 0,9 % NaCl preinkuberades i 37° C i 5 minuter under omrörning. Sedan observerades luminol amplifierad kemiluminiscens. Blod från olika donatorer. Resultat uttrycks i % av kontroll test med kollagen.

Syreradikal produktion i helblod efter tillsats av funktionaliserade partiklar som funktion av Gd koncentrationen presenteras i Figur 3.

Det kan också uppmärksammas att resultat av jämförelse i användning av vanlig spädningsserie och spädningsserie som var förberedd från fryst prov.

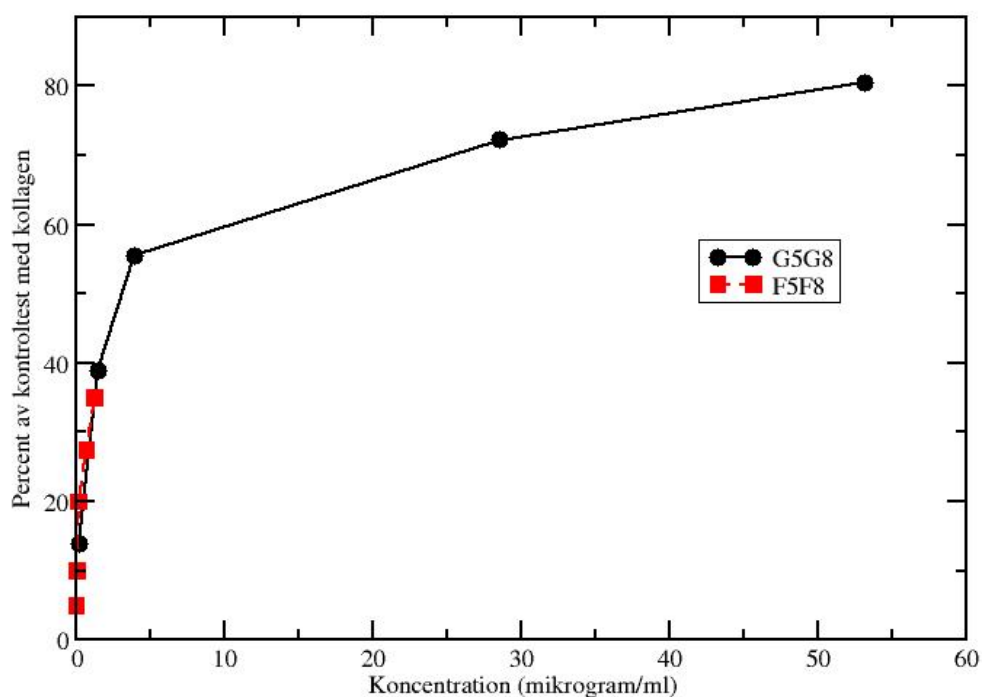
Samma suspension av nanopartiklar som används för förberedning av serie F5-F8 var först fryst. Detta prov tinades och användes sedan för förberedning av serie F9-F12.

Resultat visar god hållbarhet från fryst prov. Detta kan hjälpa att göra förberedning av spädningsserier av funktionaliserade nanopartiklar smidigare.



*Figure 3. Syreradikal produktion i helblod efter tillsats av funktionaliserade partiklar. Hepariniserat helblod spätt 1:1 i 0,9 % NaCl preinkuberades i 37° C i 5 minuter under omrörning. Sedan observerades luminol amplifierad kemiluminiscens. Blod från olika donatorer. Resultat uttrycks i % av kontroll test med kollagen.*

I Figur 4 visas resultat av mättningskurvor vid stimuleringar med ofunktionaliserade (G5-G8) och funktionaliserade (F5-F8) partiklar i ett och samma blod. Responsen för dessa två prover gav överensstämmande resultat. Vid samma koncentration av Gd blev det således så gott som samma respons i syreradikalproduktionen.



*Figur 4. Syreradikal produktion i helblod efter tillsats av ofunktionaliserade (G5-G8) och funktionaliserade (F5-F8) partiklar. Hepariniserat helblod spädd 1:1 i 0,9 % NaCl preinkuberades i 37° C i 5 minuter under omrörning. Sedan observerades luminol amplifierad kemiluminiscens. Blod från ett rör från en person. Resultat uttrycks i % av kontroll test med kollagen.*

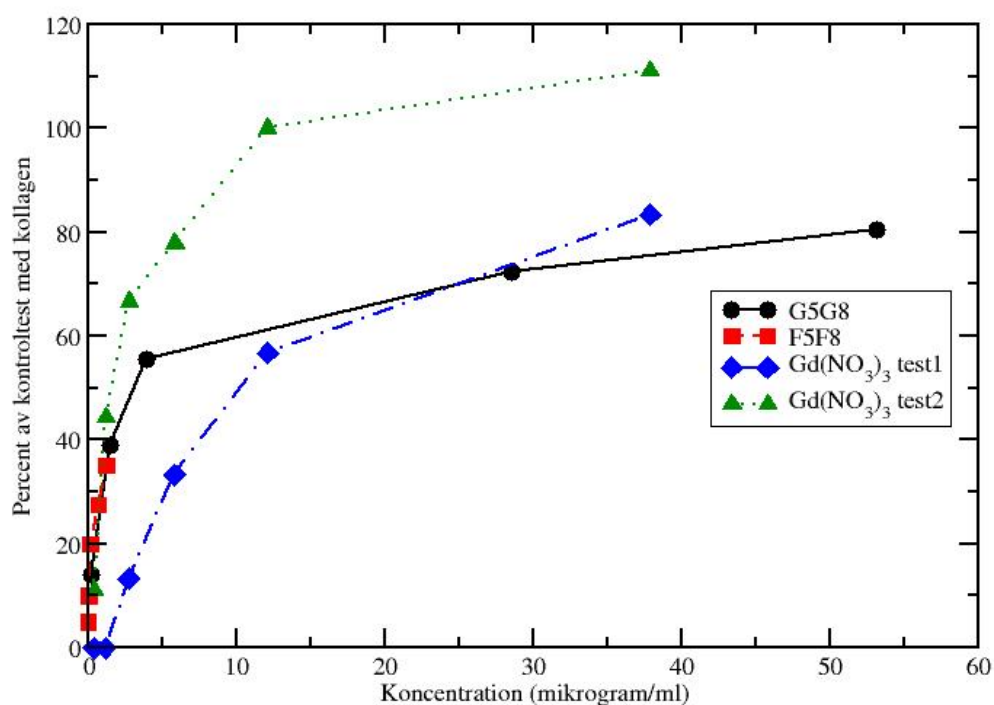
Resultat för stimulering med Magnevist® finns i appendix.

Vid mättningskurvor av aggregation och syreradikalproduktion med stimulering av

Gd(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> observerades inte bara syreradikalproduktion utan också aggregation.

Aggregation observerades vid stimulering av blodceller med 10 µl av Gd joner i 46

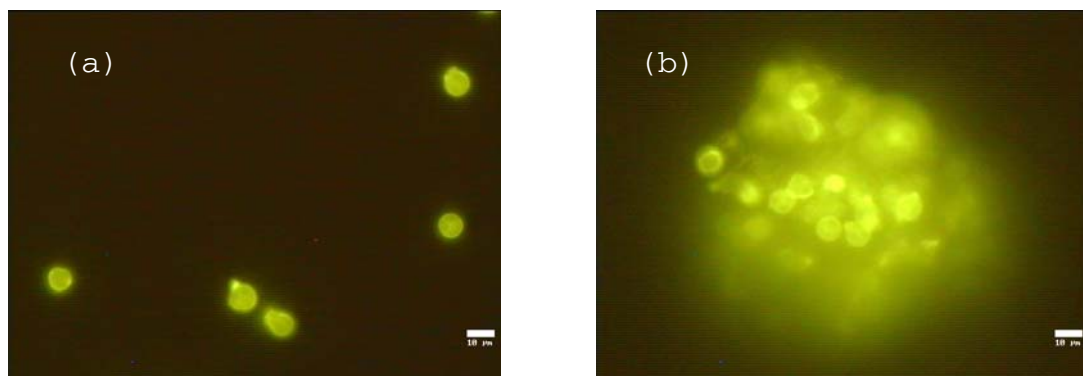
mM och högre. Resultat av mättningar med Gd joner i koncentration från 0,25 mM till 16,4mM för olika blodprov jämfördes med resultat för stimulering med både funktionaliserade och ofunktionaliserade nanopartiklar. Allt presenterades i Figur 5.



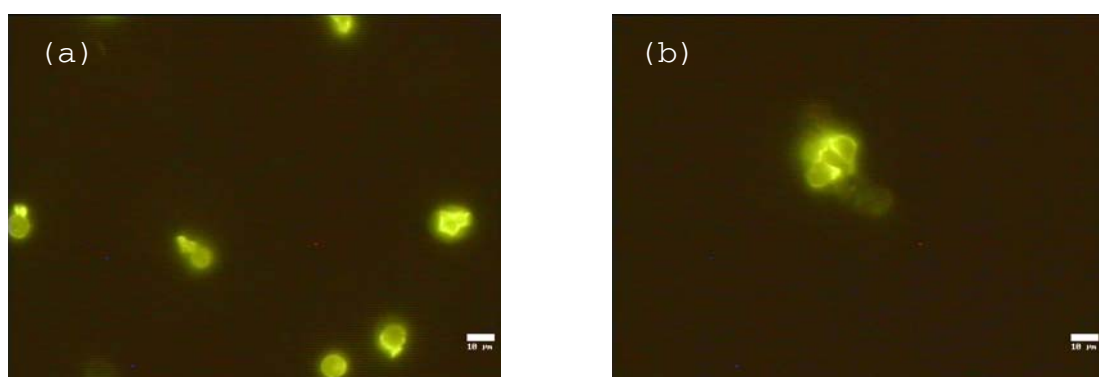
**Figur 5.** Syreradikal produktion i helblod efter tillsats av funktionaliserade (G5-G8) och funktionaliserade (F5-F8) partiklar jämfördes med GD joner interaktion med blodet. För varje experiment hepariniserat helblod spädd 1:1 i 0,9 % NaCl preinkuberades i 37° C i 5 minuter under omrörning. Efter det observerades luminol amplifierad kemiluminiscens. Blodet är från olika donatorer. Resultat uttrycks i % av kontroll test med kollagen.

Resultatet av cellstudier visade nästan ingen respons i syreradikalproduktion och aggregation hos neutrofila granulocyter vid deras interaktion med nanopartiklar. De morfologiska skillnaderna visar däremot olika typer av påverkan på neutrofila granulocyter vid stimulering med de olika ämnena.

Om man tittar på cellers morfologi som stimulerades med funktionaliserade nanopartiklar ser man celler som befinner sig i vila (Bild 2), till skillnad från de som stimulerades med ofunktionaliserade partiklar (Bild 3) och Gd joner (Bild4). Vid stimulering av celler med ofunktionaliserade partiklar observerar man att vissa celler uppvisar en morfologi som tyder på förändringar i cellskelettet. Vid stimulering med Gd joner ser man celler med typisk utseende för fullt aktiverade neutrofila granulocyter, med stor syreradikalproduktion, färdiga till fagocytos.



**Bild 2 Fluorescensmikroskop bilder av neutrofila granulocyter som stimulerades med funktionaliserade nanopartiklar av Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**



**Bild 3 Fluorescensmikroskop bilder av neutrofila granulocyter som stimulerades med ofunktionaliserade nanopartiklar av Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

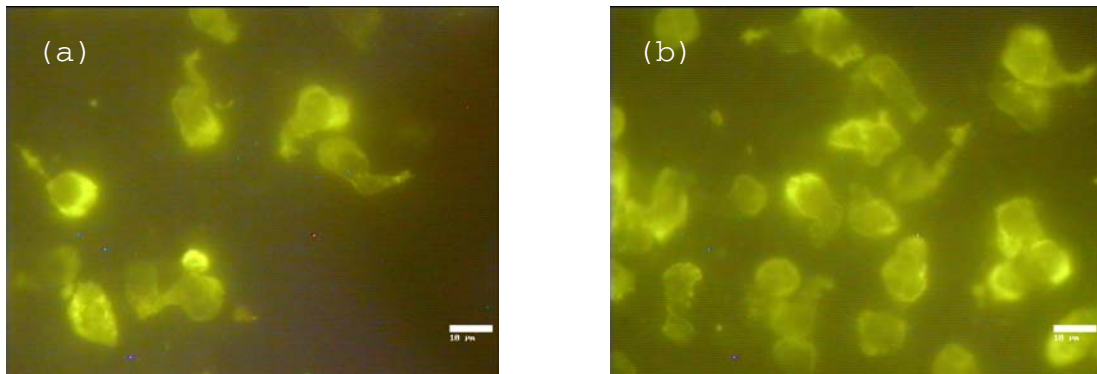


Bild 4 Fluorescensmikroskop bilder av neutrofila granulocyter som stimulerades med Gd joner.

## Diskussion

Den här studien har pilotkaraktär. Det är initiala undersökningar av inflammatoriskt svar från helblod och neutrofila granulocyter vid stimulering med olika typer av nanopartiklar. Detta har inneburit att en del komplikationer har dykt upp under arbetets gång. Det provades fram olika typer av nanopartiklar funktionaliserade och ofunktionaliserade som var spädda med milli-Q vatten eller med 0,1M NaCl lösning till olika koncentration. Koncentration av nanopartiklar bestämdes i efterhand på grund av relativ hög kostnad för analyser för koncentrationsbestämning. Detta ledde till en omöjlighet att bestämma koncentration för doser vid aktivering i förhand. Eftersom funktionalisering av nanopartiklar är tidskrävande process gjordes körningar

med en nyförberedd suspension av nanopartiklar som var sen var fryst. Detta prov tinades och användes sedan för förberedning av en annat spädnings serie . Detta gjordes för att undersöka hållbarhet hos funktionaliserade nanopartiklar och möjlighet att frysa suspension med funktionaliserade nanopartiklar för att kunna göra vidare studier smidigare.

Det visades en tendens till skillnad mellan respons vid stimulering med olika typer av partiklar. Stimulering av blodceller med spädnings serier av funktionaliserade nanopartiklar ger mindre frisättning av syreradikaler än stimulering med spädnings serier av ofunktionaliserade nanopartiklar. Det kan bero på att funktionaliserade nanopartiklar är mer biokompatibla. Fast Gd koncentration i provet vid stimulering med funktionaliserade nanopartiklar var mindre. Men det behövs vidare studier för att kunna anpassa koncentration av Gd i suspension med funktionaliserade och ofunktionaliserade partiklar som kräver vidare utvecklingar vid syntetisering av nanopartiklar.

Blod från olika blodgivare visade också variation i förmågan frisätta syreradikaler med samma typer av stimuli. Det kan också bero på att som funktion kan syreradikalproduktion påverkas av förkylning, kost, motion, stress. Detta leder till stor variation från dag till dag, till och med för samma individ. [13]

Studier i helblods system har fördelen att blodceller befinner sig i sin naturliga miljö. [12]

Studier har visat att det inte sker aggregation i blodet vid stimulering med nanopartiklar både funktionaliserade och ofunktionaliserade däremot har visat syreradikalproduktion.

Detta visar att blodet liksom fungerar som det ska men känner igen nanopartiklar.

Stor spridning i resultat tillsammans med ett litet antal körningar för en och samma typ av nanopartiklar gör det svårt att åstadkomma en statistisk redovisning. En del av resultaten som presenteras har förblivit okommenterade. Men alla resultat finns i appendix.

Studier med neutrofila granulocyter har haft observations karaktär. Resultat från körningar med hjälp av lumi-aggregometri visar nästan samma respons i syreradikalproduktion vid stimulering med ofunktionaliserade nanopartiklar jämfört med stimulering med funktionaliserade partiklar. Skillnaden i morfologi hos celler aktiverade på olika sätt ser man på bilder. Detta bekräftar resultat att celler som stimuleras med funktionaliserade nanopartiklar aktiveras mindre.

### **Acknowledgement**

Ett särskilt tack vill jag ge till mina handledare Prof. Kajsa Uvdal och Prof. Torbjörn Bengtsson för engagemang och för möjligheten till att arbeta med ett för mig väldigt intressant projekt. Jag vill tacka Maria Ahren för arbetet med nanopartiklar. Ett speciellt tack till Caroline Skoglund som har hjälpt mig med mitt laborerande.



## Litteratur

1. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. "Nanomedicine: current status and future prospects", *FASEB J.*, 2005, **19**, 311-330.
2. Eukaryoter, Wikipedia, <http://sv.wikipedia.org/wiki/Eukaryoter>
3. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J. D., "Molecular Biology of the cell" –3<sup>rd</sup> ed. 1994
4. Bridot J.L., Faure A.C., Laurent S., Riviere C., Billotey C., Hiba B., Janier M., Jossierand V., Coll J.L., Ellst L.V., Muller R., Roux S., Perriat P., Tillement O. "Hybrid Gadolinium Oxide Nanoparticles: Multimodal Contrast Agents for in Vivo Imaging", *J. Am. Chem. Soc.* 2007, **129**, 5076-5084.
5. Engström M., Klasson A., Pedersen H., Vahlberg C., Käll P. O., Uvdal K., "High proton relaxivity for gadolinium oxide nanoparticles", *Magnetic Resonance Materials in Physics Biology and Medicin* **19**, 180-186 (2006).
6. Uvdal K., Engström M., "Superparamagnetic gadolinium oxide nanoscale particles and compositions comprising such particles, Patent No WO2006031190, Published 2006-03-23.
7. Siv Engelmark Cederborg, "Partiklar med potential", *Forskning & Medicin*.htm
8. Haug E., Sand O., Sjaastad O. V., "Människans fysiologi", 2002.
9. Intra-och intercellulära signalvägar vid aktivering av neutrofiler och trombocyter. Laborationskompendium.
10. Söderlind F., Pedersen H., Petoral R. M., Käll P. O., Uvdal K., "Synthesis and characterization of Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocrystals functionalized by organic acids", *Journal of Colloids and Interface Science* **288**, 140-148 (2005).

11. Instruction manual för the whole blood lumi-ionized calcium aggregometers.  
Model 560-Ca Dual sample. Chrono-log corporation
12. Bengtsson T, Grenegård M. "Leucocyte activation by collagen-stimulated platelets in whole blood." Scand J Clin Lab Invest 2002; 62: 451-462.
13. Nilsson-Ehle P., "Laurells klinisk kemi I praktisk medicin", Studentlitteratur  
2003, 8.e upplaga.

## APPENDIX

### Resultat för syreradikalproduktion i helblod vid stimulering med ofunktionaliserade nanopartiklar av gadoliniumoxid

Id name	Serier	Koncentration av tillsatta partiklar I provet, µg/ml	Syreradikalproduktion I % av kontroll test med kollagen
070319B	G1-G4	0,084	8,3
		0,505	0
		1,34	12,5
		9,76	25
070320B	G5-G8	0,246	13,9
		1,48	38,9
		3,94	55,5
		28,5	72,2
		53,1	80,5
070323D	G5-G8	0,246	10
		1,48	30
		3,94	45

		28,5	60
		53,1	80
070404C	G7 som späddas	0,6	0
		1,2	2,6
		1,8	10,5
070404E	G5 som späddas	0,6	3,125
		1,2	25
		1,8	65,6
070404F	G6	2,46	10
	G5	27,1	20
	G5	51,7	30
	G5	76,3	40

**Resultat för syreradikalproduktion i helblod vid stimulering med  
funktionaliserade nanopartiklar av gadolimumoxid**

Id name	Serier	Koncentration av tillsatta partiklar I provet, µg/ml	Syreradikalproduktion I % av kontroll test med kollagen
070313c	F1-F4	0,003	0,86
		0,034	1,72
		0,096	3,45
		0,406	6,9
070319d	F1-F4	0,003	12,5
		0,034	6,25
		0,096	18,75
		0,406	25
070320c	F5-F8	0,005	5
		0,06	10
		0,169	20
		0,71	27,5
		1,26	35

070404B	F5	0,55	6
	F5	1,10	12
	F5	1,65	24
070411d	F9-F12	0,005	4,03
		0,06	8,06
		0,169	20,96
		0,71	37,1
070411c	F13-F16	0,005	2,17
		0,06	17,4
		0,169	23,9
		0,71	86,9
070403c	F17-F20	0,052	2,5
		0,573	5
		1,61	25
		6,82	40
070403d	F21-F24	0,052	12,5
		0,573	20,8
		1,61	41,7
		6,82	66,7

**Resultat för syreradikalproduktion i helblod vid stimulering med Gd joner.**

ID name	Koncentration av tillsatta Gd joner I provet, µg/ml	Syreradikalproduktion I % av kontroll test med kollagen
070323C	0,39	11
	1,17	44
	2,73	67
	5,85	78
	12,1	100
	37,9	111
070403A	0,39	0
	1,17	0
	2,73	13,3
	5,85	33,3
	12,1	56,7
	37,9	83,3
070412C	0,05mM	4,5
Magnevist®	0,55mM	9,1
	1,55mM	18,2
	5,55mM	22,7