

TOKSYKOLOGIA WSPÓŁCZESNA NANOMATERIAŁÓW MAGNETYCZNYCH

MODERN TOXICOLOGY OF MAGNETIC NANOMATERIALS

Monika A. Cywińska, Ireneusz P. Grudziński

Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Słowa kluczowe: *nanomateriały magnetyczne, nanotoksykologia, badania przedkliniczne*

Key words: *magnetic nanomaterials, nanotoxicology, preclinical studies*

STRESZCZENIE

Aktualny postęp w zakresie nanobiotechnologii doprowadził do rozwoju nowego obszaru nanomedycyny, związanego z aplikacją nano(bio)materiałów zarówno w celach diagnostycznych jak i terapeutycznych (teranostyki). Główne oczekiwania i wyzwania w powyższym zakresie dotyczą nanoproduktów magnetycznych, otrzymywanych metodami bioinżynierii, o potencjalnym zastosowaniu w transporcie leków, przede wszystkim leków przeciwnowotworowych, stosowanych w terapiach wykorzystujących określone molekularne punkty uchwytu. Wyjątkowe właściwości fizykochemiczne nanocząstek magnetycznych roszą nadzieję na rozwój współczesnej nanomedycyny nowotworów, stanowiąc między innymi technologiczny przełom w zakresie celowanego transportu leków i genów, terapii nowotworów z wykorzystaniem magnetycznej hipertermii, inżynierii tkankowej, znakowania komórek nowotworowych czy molekularnego obrazowania rezonansem magnetycznym. Wraz z szerokim zainteresowaniem magnetycznymi nanoproduktami bioinżynierii, w sferze szczególnej uwagi pozostaje ich potencjał toksyczny. Pokażna ilość dotychczasowych dowodów naukowych sugeruje, że pewne właściwości nanocząstek magnetycznych (np. podwyższona aktywność powierzchniowa, zdolność do penetracji przez błony komórkowe, oporność na procesy biodegradacji) może zwiększać ich potencjał cytotoksyczny w porównaniu z odpowiadającymi im materiałami nieposiadającymi rozmiarów w nanoskali. Innymi słowy, ocena bezpieczeństwa przeprowadzona w odniesieniu do standardowych materiałów magnetycznych, może mieć ograniczone zastosowanie w ocenie ryzyka narażenia zdrowotnego i środowiskowego w przypadku nowych nanoproduktów magnetycznych otrzymanych metodami bioinżynierii. W niniejszym artykule dyskutujemy główne kierunki badawcze prowadzone w doświadczalnych modelach *in vitro* oraz *in vivo* w celu oceny toksyczności magnetycznych nanozwiązków, zwracając szczególną uwagę na problematykę analizy toksykologicznej nanomagnetyków. W pracy zaprezentowano ponadto nowe kierunki badawcze prowadzone na polu nanotoksykologii, podkreślając znaczenie rozwoju alternatywnych metod testowania magnetycznych nano(bio)produktów.

ABSTRACT

Current advances in nanobiotechnology have led to the development of new field of nanomedicine, which includes many applications of nano(bio)materials for both diagnostic and therapeutic purposes (theranostics). Major expectations and challenges are on bioengineered magnetic nanoparticles when they come to delivering drug compounds, especially to targeting anticancer drugs to specific molecular endpoints in cancer therapy. The unique physicochemical properties of these nanoparticles offer great promise in modern cancer nanomedicine to provide new technological breakthroughs, such as guided drug and gene delivery, magnetic hyperthermia cancer therapy, tissue engineering, cancer cell tracking and molecular magnetic resonance imaging. Along with the expanding interest in bio-engineered magnetic nanoproducs their potential toxicity has become one of the major concerns. To date, a number of recent scientific evidences suggest that certain properties of magnetic nanoparticles (e.g., enhanced reactive area, ability to cross cell membranes, resistance to biodegradation) may amplify their cytotoxic potential relative to bulk non-nanoscale counterparts. In other words, safety assessment developed for ordinary magnetic materials may be of limited use in determining the health and environmental risks of the novel bio-engineered magnetic nanoproducs. In the present paper we discuss the main directions of research conducted to assess the toxicity of magnetic nanocompounds in experimental *in vitro* and *in vivo* models, pointing to the key issues concerning the toxicological analysis of magnetic nanomaterials. In addition new research directions of nanotoxicological studies elucidating the importance of developing alternative methods for testing magnetic nano(bio)products are also presented.

Adres do korespondencji: Ireneusz P. Grudziński, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1, tel/fax: +48 22 572-0760, e-mail: ireneusz.grudzinski@wum.edu.pl

WSTĘP

W dobie globalnego wzrostu znaczenia nanotechnologii oraz podjęcia w wiodących gospodarkach światowych inicjatyw ukierunkowanych na promowanie rozwoju i wdrażanie w życie nowych osiągnięć nanotechnologicznych, znamieną staje się kwestia oceny potencjału toksycznego konstruowanych nanostruktur, w szczególności zaś, innowacyjnych nanobioformulacji, znajdujących potencjalne zastosowanie w sektorze współczesnej nanomedycyny. Biorąc pod uwagę szeroki potencjał aplikacyjny nanoproductów medycznych, jedną z ważniejszych grup pośród opracowywanego w powyższej idei novum są bez wątpienia nanomateriały magnetyczne, już dziś wykorzystywane z powodzeniem w hipertermii guzów litych [19, 73], sortowaniu komórek nowotworowych [14] czy obrazowaniu magnetyczno-rezonansowym [15, 46, 64]. Rangi powyższej klasie dodaje ponadto fakt spodziewanej w niedalekiej przyszłości aplikacji nanomagnetyków w transporcie docelowym genów i środków terapeutycznych [36] czy spersonalizowanej terapii nowotworów [58]. Ogromny potencjał aplikacyjny oraz szereg korzyści wynikających z unikalnych właściwości fizykochemicznych, czyni konstruowane nanoformulacje magnetyczne obiektami bez wątpienia atrakcyjnymi dla rozwoju współczesnej nanomedycyny.

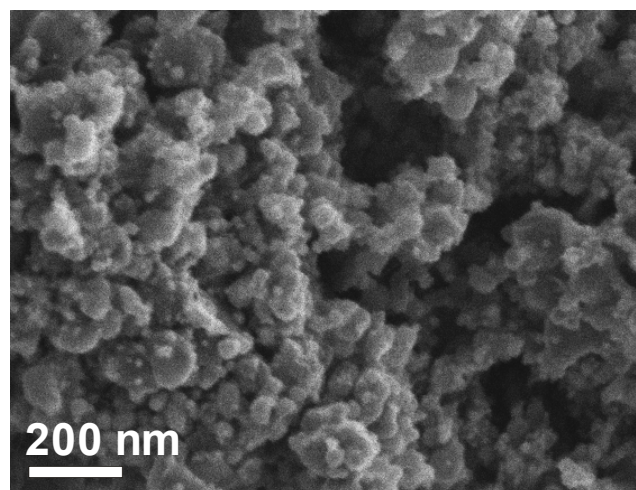
Najnowsze badania dowodzą, że redukcja rozmiarów krystalitów typowych materiałów magnetycznych do wielkości „nano” wpływa znacząco na ich podstawowe charakterystyki fizykochemiczne, prowadząc między innymi do wzrostu reaktywności konstruowanych nanostruktur. Efektem miniaturyzacji w skali „nano” jest podwyższona zdolność nanomagnetyków do internalizacji komórkowej oraz oddziaływania na poziomie molekularnym [28]. Powyższe skutkuje potencjalizacją działania toksycznego w szeregu układach biologicznych. Nie dziwi fakt, iż unikalne właściwości fizykochemiczne, które przyczyniły się do wykorzystania nanomaterialów magnetycznych w licznych produktach pozamedycznych, rodzą obecnie niebezpieczne obawy środowisk opiniotwórczych, związane z bezpieczeństwem ich stosowania w produktach współczesnej nanomedycyny [16, 21]. W obliczu spodziewanej aplikacji nanomaterialów magnetycznych w sektorze biomedycznym, niezbędnym staje się zgromadzenie odpowiednich pokładów wiedzy toksykologicznej, która pozwoli w niedalekiej przyszłości na konstruowanie układów nanomagnetycznych, w tym bionanomagnetycznych, w pełni bezpiecznych dla ludzi i środowiska naturalnego [25, 65].

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE NANOMAGNETYKÓW

Szczegółowa analiza właściwości fizykochemicznych nanomaterialów magnetycznych odgrywa istotną rolę w identyfikacji zagrożenia na pierwszym etapie procesu szacowania narażenia. Z punktu widzenia oceny potencjału toksycznego konstruowanych nanostruktur, właściwej charakterystyki wymagają nie tylko cechy indywidualnych nanocząstek magnetycznych, tj. rozmiar, kształt, pole powierzchni, elementarny skład chemiczny, obecność zanieczyszczeń czy rozkład wielkości, ale również ich potencjalnych aglomeratów formowanych w układach biologicznych, zależnie od właściwości elektromagnetycznych i struktury chemicznej rdzenia [22, 35, 47, 55]. Zważywszy na budowę rdzeni typowych nanomagnetyków, których głównymi komponentami pozostają żelazo, nikiel i kobalt (wykorzystywane w formie czystych metali, tlenków lub zróżnicowanych pod względem składu chemicznego stopów), modelowanie pożądanых charakterystyk rozpoczyna się bez wątpienia już na etapie produkcji nanomaterialów poprzez właściwy dobór odpowiednich technik chemicznych lub fizycznych [22, 31, 59, 66]. Istotne znaczenie ma zwłaszcza kontrola zakresu magnetyczności zdeterminowana wielkością, składem i kształtem cząstek magnetycznych, defektami sieci krystalicznej czy oddziaływaniami z otaczającą macierzą i sąsiednimi strukturami [22]. Nie ulega wątpliwości, iż jednym z ważniejszych czynników decydujących o klasyfikacji nanomagnetyków oraz ich konkretnej aplikacji jest podatność magnetyczna badanych układów. Z wyłączeniem diamagnetyków, magnesujących się przeciwnie do zewnętrznego pola magnetycznego, wielkość ta wykazuje wyraźną zależność temperaturową. W układach ferromagnetycznych, własności płynące z uporządkowania domen zgodnie z kierunkiem działającego pola zostają zachowane poniżej, tzw. punktu *Curie* [3]. Struktury te charakteryzuje silna anizotropia oraz tzw. pozostałość magnetyczna, decydujące o szerokim profilu aplikacyjnym uzyskanych krystalitów. Wraz ze wzrostem temperatury układów ferromagnetycznych dochodzi do nasilenia termicznych oscylacji atomów w namagnesowanym materiale, co po przekroczeniu krytycznej granicy temperatury (punktu) *Curie* skutkuje przejściem fazowym drugiego rzędu i pojawieniem się własności paramagnetycznych. Analogiczne zjawisko obserwujemy w efekcie naruszenia stanu antyrównoległego uporządkowania domen magnetycznych w materiałach ferromagnetycznych (np. tlenkach żelaza). Odpowiednikiem temperatury krytycznej dla ferromagnetyków jest graniczna temperatura *Néel'a*, której przekroczenie prowadzi do

pojawienia się w materiałach własności paramagnetycznych, zanikających po usunięciu zewnętrznego pola magnetycznego. Układy takie wykazują silny wpływ na czasy relaksacji jąder atomowych, co umożliwia ich aplikację w obrazowaniu technikami rezonansu magnetycznego [54]. Nie ulega jednak wątpliwości, iż najistotniejsze zmiany w zakresie właściwości fizykochemicznych i magnetycznych uzyskiwane są na drodze miniaturyzacji materiałów objętościowych. Redukcja rozmiarów krystalitów typowych ferromagnetyków poniżej 100 nm prowadzi do uzyskania struktur o wysokich polach koercji. W układach takich obniżenie do zera indukcji magnetycznej pozostałej po usunięciu zewnętrznego pola magnetycznego (tzw. pozostałości magnetycznej), wymaga zastosowania pola magnetycznego o przeciwnym kierunku i odpowiednio wysokim natężeniu „powściąągającym” zwanym natężeniem pola koercji. W wyniku dalszego rozdrobnienia, poniżej krytycznej granicy, odpowiadającej w przybliżeniu wielkości domen magnetycznych (zwykle 2-30 nm), notuje się pojawienie nowych, nietypowych własności materiałowych, w tym magnetycznych, związanych ze znaczną anizotropią oraz niezwykle wysokimi temperaturami *Curie* i *Néel'a* [22]. Monokryształy takie, określane mianem superparamagnetycznych, wykazują dalece wyższe reaktywności chemiczne oraz niższe wartości nasycenia magnetyzacji od odpowiadających im materiałów objętościowych, co umożliwia im niezwykle silne oddziaływanie już w niewielkich polach magnetycznych [66]. Nieznaczna magnetyzacja szczątkowa gwarantuje dodatkowo ograniczenie oddziaływań magnetycznych i tworzenia aglomeratów po usunięciu zewnętrznego pola magnetycznego, niezwykle korzystne z punktu widzenia aplikacji biomedycznej uzyskanych struktur. Z drugiej strony należy jednak pamiętać, że obserwowany wzrost stosunku pola powierzchni przypadającego na jednostkę objętości wpływa istotnie na reaktywność konstruowanych nanoukładów magnetycznych. Zaistniałe zjawisko sprzyja m.in. agregacji, występowaniu wyraźnych efektów powierzchniowych i fluktuacji termicznych momentów magnetycznych, przekładając się na właściwości magnetyczne konstruowanych struktur (Rycina 1).

Duża powierzchnia właściwa nanocząstek metalicznych wiąże się ponadto ze wzrostem procentowego udziału liczby ich atomów zlokalizowanych na powierzchni lub w obszarach międzyfazowych, co bez wątpienia potęguje własności katalityczne i aktywność względem molekuł biologicznych oraz sprzyja korozji metalicznego rdzenia. Powyższe mogą zatem wpływać istotnie na podwyższenie toksyczności badanych układów. W tym względzie dużego znaczenia nabiera procedura tzw. kapsułkowania nanostruktur magnetycznych prowadząca do uzyskania, zróżnicowanych pod względem stabilności, heterogennych formacji typu



Ryc. 1. Zdjęcie SEM nanomagnetycznych kapsulek węglowych typu Fe-C.

Sferyczne nanokapsułki węglowe zawierają nanokrystality żelaza szczelnie otoczone cienkim płaszczem węglowym, zbudowanym z zakrzywionych płaszczyzn grafenowych. Średnice nanokapsulek mieszczą się w przedziale kilkunastu - kilkudziesięciu nanometrów. W fazie stałej nanokapsułki występują w postaci fraktalnych aglomeratów, które można dezintegrować przy użyciu ultradźwięków (*Grudziński i wsp.*, badania własne).

Fig. 1. The SEM photo of the carbon encapsulated magnetic nanoparticles Fe-C type.

Spherical carbon nanocapsules containing iron nanocrystalites tightly surrounded by a thin carbon shell, constructed of the curved graphene surfaces. Nanocapsules diameters within the range of several to tens of nanometers. In the solid phase nanocapsules are in the form of the fractal agglomerates, which can disintegrate with ultrasound (*Grudziński et al.*, personal research).

„core-shell” [35]. Warto jednak zauważyć, iż struktura chemiczna zastosowanej warstwy powierzchniowej (krzemionka, polimery syntetyczne, surfaktanty, polimery naturalne czy powłoki grafenowe) może wpływać nie tylko na biokompatybilność nanomagnetyków [58], ale również rodzaj mechanizmu i wydajność procesów internalizacji nanocząstek magnetycznych oraz ich biodystrybucję narządową, przez co rzutuje bezpośrednio na potencjał toksyczny konstruowanych struktur [11, 24, 26, 51, 58].

CYTOTOKSYCZNOŚĆ NANOMAGNETYKÓW W BADANIACH KOMÓRKOWYCH

Wnikliwa analiza aspektów strukturalnych pozwala wnioskować, m.in. o zależności obserwowanego efektu cytotoksycznego od zróżnicowania nanostruktur magnetycznych w zakresie ich podstawowych charakte-

rystyk morfometrycznych i fizykochemicznych [8, 29, 43, 58, 63, 71]. Nie ulega wątpliwości, że czynnikami istotnie wpływającymi na stopień toksyczności komórkowej są typ powłoki powierzchniowej i produkty jej rozpadu, ładunek powierzchniowy, długość łańcuchów polimerowych powłoki, stopień utlenienia metalu przejściowego czy zdolność nanomagnetyków do oddziaływania z makromolekułami komórek [27]. Na szczególną uwagę zasługuje m.in. wysoka reaktywność nanomagnetyków, która może prowadzić zarówno do indukcji i/lub potęgowania obserwowanych efektów cytotoksycznych wskutek np. denaturacji białek obecnych w medium [42]. Jak donoszą ostatnie badania, nie można wykluczyć błędów analitycznych w ocenie cytotoksyczności komórkowej nanomagnetyków, na skutek tworzenia w procesie analitycznym tzw. „wieńca białkowego”, ograniczającego oddziaływanie nanomagnetyków z komponentami biologicznymi [56]. Przeprowadzając analizę cytotoksyczności w modelach komórkowych należy być świadomym faktu, iż złożona charakterystyka nanomateriałów magnetycznych może niejednokrotnie stanowić źródło rozbieżności w zakresie analizy ich potencjału cytotoksycznego, a przez to znacznie utrudniać właściwe zdefiniowanie problemu toksyczności konstruowanych struktur. Abstrahując od powyższego, istotnym problemem jest brak standaryzacji w zakresie podstawowych strategii oceny potencjału toksycznego w alternatywnych modelach cytotoksyczności *in vitro* (3R). Dokonując przeglądu danych literaturowych, trudno nie zauważyć zależności obserwowanego efektu toksycznego nanomagnetyków od typu [13, 17, 33, 60, 69] i/lub stopnia dojrzałości wykorzystywanych w badaniu linii komórkowych [4] czy czasu ekspozycji w określonym medium [70]. Znakomita większość przeprowadzonych badań potwierdza również zależność indukowanego efektu, w tym śmierci apoptotycznej komórek, od zastosowanej w badaniach dawki nanocząstek [1, 7, 33] oraz stopnia internalizacji dkomórkowej [8]. Ten ostatni w większości wypadków jest zdeterminowany procesami endocytozy, przejściowym wiązaniem nanocząstek magnetycznych z białkami czy oddziaływaniem powstałych kompleksów z makromolekułami błon komórkowych. Nie ulega wątpliwości, iż jedną z prawdopodobnych przyczyn cytotoksyczności testowanych formułacji może być tzw. „przeladowanie” komórek nanocząstkami magnetycznymi [23, 58], a zwłaszcza ich gromadzenie w dwóch głównych kompartmentach wewnątrzkomórkowych – jądrze komórkowym i mitochondriach, prowadzące do wystąpienia zaburzeń procesów proliferacyjnych i energetycznych [30, 32].

Ponieważ testowanie nanoformulacji magnetycznych w modelach alternatywnych zostało w dużej mierze ograniczone do kilkunastu powszechnie uznanych parametrów cytotoksyczności komórkowej,

w tym aktywności metabolicznej, stopnia labializacji błon komórkowych czy śmierci komórkowej, wśród najczęściej rozważanych mechanizmów molekularnego oddziaływania nanomagnetyków pojawiają się zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów wapniowych oraz stres oksydacyjny, związany z występowaniem podwyższonych poziomów reaktywnych form tlenu i azotu [29, 41, 43, 44, 59, 60]. W odczuciu wielu badaczy istotne znaczenie w ocenie toksyczności nanomateriałów magnetycznych mogą mieć także zaburzenia ekspresji wybranych genów procesu apoptozy, w tym obniżenie poziomu ekspresji białek anty-apoptycznych (bcl-2) czy podwyższenie poziomu ekspresji białek p53, bax, kaspazy-3 i kaspazy-9 (wykazane dla nanoformulacji żelazowo-niklowych) [1].

TOKSYCZNOŚĆ I TOKSYKOKINETYKA NANOMAGNETYKÓW

O ile testowanie nanoformulacji magnetycznych z wykorzystaniem alternatywnych modeli komórkowych może okazać się pomocne w zrozumieniu mechanizmów działania toksycznego na poziomie molekularnym, o tyle właściwa ocena ich potencjału toksycznego, uwzględniająca analizę szeregu złożonych procesów, związanych m.in. z biodystrybucją i biotransformacją testowanych nanostruktur, wymaga podjęcia szeroko zakrojonych badań w doświadczalnych modelach zwierzęcych *in vivo*, powszechnie zresztą rekomendowanych w literaturze toksykologicznej. Niezwykle istotnym elementem testowania innowacyjnych nanoformulacji w modelach zwierzęcych jest bez wątpienia powiązanie oceny fizykochemicznej nanostruktur magnetycznych z ich biodystrybucją narządową. Warto podkreślić, że w odniesieniu do nanomagnetyków, w tym obszernie testowanych nanoformulacji żelazowych, wykazano istotną zależność pomiędzy procesami dystrybucji tkankowej oraz wielkością nanocząstek, ich morfologią i ładunkiem powierzchniowym, wpływającym m.in. na tempo opsonizacji i wychwyty przez komórki układu fagocytarnego [40, 57]. Istotne w ocenie potencjału toksycznego okazują się modyfikacje powierzchni testowanych nanoformulacji determinujące profil ich oddziaływania z komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej, błonami komórek plazmatycznych i endotelialnych czy nabłonkiem wyściełającym przewód pokarmowy i drogi oddechowe [58]. W świetle cytowanych doniesień wynika jednoznacznie, że krytycznymi narządami w procesach dystrybucji ustrojowej nanomagnetyków są wątroba, śledziona, szpik kostny, a w dalszej kolejności także mózg, nerki, płuca czy serce [7, 9, 38, 57, 68, 72]. Szczególnie istotna z punktu widzenia oceny potencjału toksycznego wydaje się zwłaszcza depozycja wątrobowa i płucna niektórych formułacji nanomagnetyków, a także

produktów ich rozpadu, często o dłuższym czasie depozycji niż pierwotne nanocząstki [9]. Badania wskazują, że większość takich produktów może inicjować procesy zapalne w narządach już po podaniu jednokrotnym [12, 50] czy indukować zaburzenia produkcji leukocytów i trombocytów w szpiku kostnym, przyczyniając się ostatecznie do inicjacji pozaszpikowej hematopoezy w wątrobie [38]. Nie bez znaczenia w powyższych procesach ma fakt udziału nanocząstek magnetycznych w indukcji stresu oksydacyjnego, upatrywanego, jako jeden z istotniejszych mechanizmów toksyczności nanomateriałów magnetycznych. Fakt depozycji nanostruktur w obszarach dalece różnych od wynikających z drogi ekspozycji każe ponadto domniemywać, że profile dystrybucji tkankowej nanomateriałów magnetycznych mogą być determinowane także przez czynniki inne niż układ fagocytarny, które na dzień dzisiejszy nie zostały jeszcze w pełni zdefiniowane [34, 37].

Z przeglądu danych literaturowych wynika bezspornie, że w badaniach toksykokinetycznych istotną rolę obok podstawowych charakterystyk fizykochemicznych testowanych nanoformulacji odgrywa również reżim podawania oraz profil uwalniania nanocząstek magnetycznych i ich biodostępność ustrojowa [57]. W tym względzie dużego znaczenia nabiera ocena toksyczności prowadzona z wykorzystaniem odpowiednio opracowanych modeli kinetycznych, które umożliwią szczegółową analizę zachowania nanomagnetyków w tkankach i ocenę dawko-zależnego efektu lub dawko-zależnej odpowiedzi w warunkach narażenia. Powyższe może okazać się pomocne dla zrozumienia korelacji między podstawowymi charakterystykami nanomagnetyków a mechanizmami ich toksycznego oddziaływania, przyczyniając się tym samym do projektowania bezpiecznych nanoformulacji magnetycznych.

NANOMAGNETOTERMOABLACJA – INDUKOWANA TOKSYCZNOŚĆ NANOMAGNETYKÓW

Unikalne własności nanomateriałów magnetycznych związane ze zdolnością przetwarzania energii magnetycznej w energię cieplną, zostały ostatnio wykorzystane w celowanej terapii guzów litych określanej mianem nanotermoablacji [49]. Lokalny wzrost temperatury nanomagnetyków (najczęściej 43,5°C) wzbudzonych zmiennym polem magnetycznym o wysokiej częstotliwości, został wykorzystany do aktywacji degradacyjnych mechanizmów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, obejmujących m.in. agregację i denaturację białek, ekspresję białek szoku cieplnego, uszkodzenia DNA, indukcję śmierci apoptotycznej czy ostatecznie uszkodzenie struktury błon komórkowych prowadzące do odwodnienia i śmierci martwiczej ko-

mórek nowotworowych [18]. Wytwarzanie ciepła przez nanocząstki magnetyczne poddane działaniu zmiennego pola magnetycznego okazało się możliwe dzięki magnetyzacji metalicznego rdzenia, która determinuje straty magnetyczne układów, zachodzące wskutek strat histerezy, reorientacji magnetyzacji (dynamika wewnętrzna) bądź rotacji cząstek magnetycznych (dynamika zewnętrzna) [18, 67]. Ponieważ rotacja wektora namagnesowania w domenach magnetycznych, jak również procesy przesunięcia granicy domen wiążą się ze stratami energii, każdy cykl procesu namagnesowania materiału jest związany z występowaniem nieliniowej i niejednoznacznej zależności indukcji magnetycznej od natężenia zastosowanego zewnętrznego pola magnetycznego. Zjawisko to określane jest mianem histerezy magnetycznej i wskazuje na zależność aktualnego stanu namagnesowania układu od stanów w poprzednich cyklach namagnesowania, co prowadzi do uzyskania w układach magnetycznych energii niższej niż energia dostarczana do układu. Powstające zatem starty energetyczne są proporcjonalne do powierzchni pętli histerezy magnetycznej ilustrującej przebieg zjawiska namagnesowania. Wzrost temperatury uzależniony jest zasadniczo od właściwości magnetycznych nanomateriału, częstotliwości oscylacji momentów magnetycznych oraz siły zastosowanego pola [39, 53]. Poprzez ścisłą kontrolę poszczególnych parametrów, w tym rozmiarów i rozkładu wielkości cząstek nanomagnetyków, struktury powłoki powierzchniowej czy zapewnienie odpowiedniej lepkości ośrodka, możliwa staje się optymalizacja procesów relaksacji zawiadujących rozproszeniem energii cieplnej w badanych układach [6]. W przypadku odpowiednio opracowanych nanocząstek, w których generowanie energii cieplnej zachodzi wskutek relaksacji momentów magnetycznych w rdzeniu, potencjał termoablacyjny może zostać zastosowany w zlokalizowanej terapii przeciwnowotworowej, ograniczając tym samym indukowane efekty cytotoksyczne jedynie do obszaru guza. Mimo, że poważnym problemem większości grup badawczych pozostaje wciąż kwestia wprowadzenia w obszar guza odpowiedniej ilości nanocząstek magnetycznych, które wygenerują dostateczny wzrost temperatury w tkance, umożliwiającą indukcję efektów toksycznych w odpowiedzi na tolerowane dawki zewnętrznego pola magnetycznego, uzasadnionym optymizmem napawają pierwsze sukcesy kliniczne w badaniach celowanej nanotermoablacji u pacjentów z nowotworami mózgu [45, 49].

BEZPIECZEŃSTWO PRZYSZŁYCH NANOMAGNETYKÓW MEDYCZNYCH

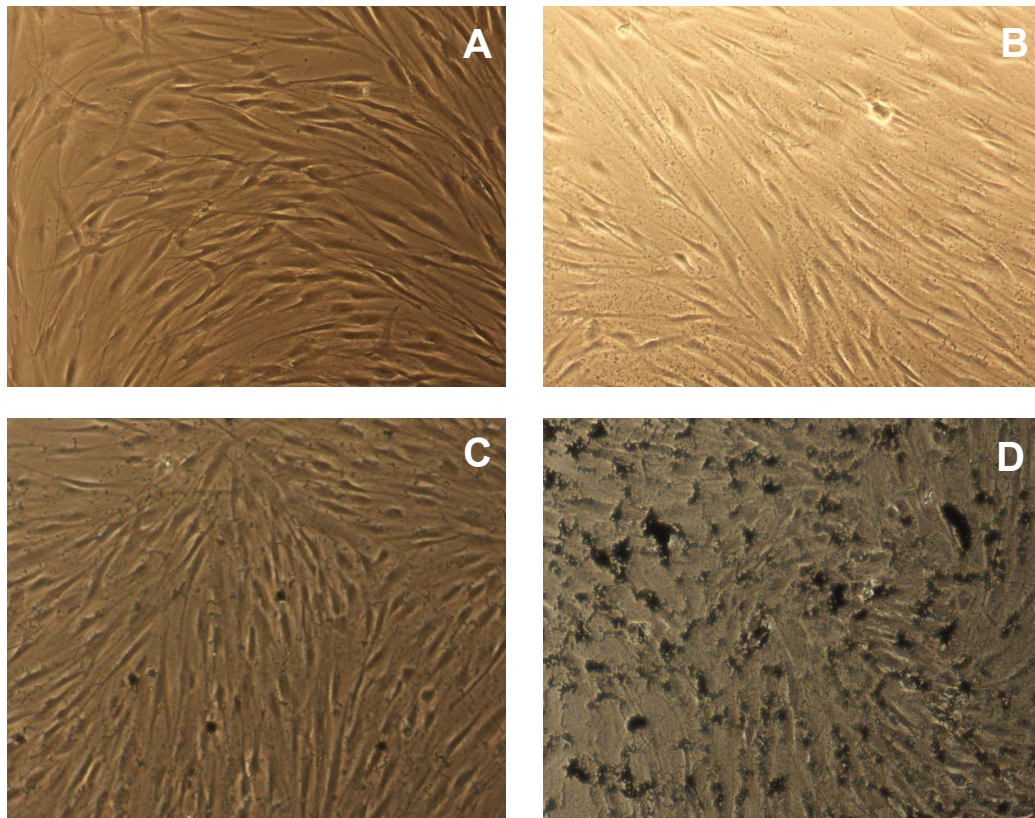
Badania prowadzone w obszarze nauk biomedycznych wskazują jednoznacznie, iż podstawowymi kom-

ponentami większości innowacyjnych nanoformulacji, znajdujących zastosowanie w terapii i diagnostyce, są odpowiednio opracowane nanomateriały magnetyczne, w tym nanostruktury żelazowe [31, 58]. Mając na uwadze specyficzne właściwości nanomagnetyków stanowiące o ich potencjalnej aplikacji jako multifunkcyjnych nanoplatform w terapii spersonalizowanej, należy domniemywać, iż postępowi w zakresie formułacji nowych nanobioproduktów leczniczych towarzyszyć będzie, w ciągu najbliższych lat, znaczący wzrost ekspozycji na nanomateriały magnetyczne. Powyższe skłania zatem do właściwego zdefiniowania problemu toksyczności nanomagnetyków medycznych oraz opracowania odpowiedniej strategii oceny bezpieczeństwa konstruowanych z ich udziałem nanoproductów leczniczych i diagnostycznych. Obiecujące w powyższej materii wydaje się, m.in. podejście oparte o poszerzenie arsenału dostępnych obecnie badań cytotoxyczności o analizę zachodzących w procesach komórkowych zmian związanych z reorganizacją cytoszkieletu, niezauważanych często w klasycznych testach toksykologicznych, a które jak ostatnio wykazano mogą być przyczyną stresu komórkowego indukowanego już na poziomie testowania potencjalnie nietoksycznych dawek nanomagnetyków [2, 61]. Raportowane zagrożenia indukcji uszkodzeń DNA, zaburzeń ekspresji genów, dysfunkcji błon mitochondrialnych, zaburzeń proliferacji komórkowej czy stresu oksydacyjnego skłaniają nie tylko do wyznaczenia ostatecznych kryteriów oceny toksyczności, ale i ponownego rozpatrzenia i zdefiniowania kwestii biokompatybilności konstruowanych struktur magnetycznych, opiniowanej dotąd na podstawie obserwowanej cytotoxyczności. Nie ulega przy tym wątpliwości, iż jednym z ważniejszych etapów oceny bezpieczeństwa przyszłych multifunkcyjnych nanoplatform medycznych powinna być analiza potencjału agregacyjnego, pozwalająca wyeliminować we wczesnym etapie badań przedklinicznych struktury potencjalnie toksyczne w strefie działania statycznego pola magnetycznego, emitowanego np. podczas badań obrazowania rezonansem magnetycznym [5]. Nie należy przy tym zapominać o konieczności monitorowania odpowiedzi komórkowej w modelach długoterminowej ekspozycji czy prowadzenia badań dotyczących stabilności i biotransformacji nanomagnetyków, istotnych z punktu widzenia oceny toksyczności kumulacyjnej konstruowanych struktur. Niezbędnym elementem prawidłowego testowania toksykologicznego powinny być również badania porównawcze z wykorzystaniem odpowiedniego zakresu stężeń testowanych nanoformulacji oraz doбором właściwych czasów ekspozycji. Szczegółnej rozprawie, obok analizy podstawowych parametrów toksykokinetycznych, powinna zostać poddana także ocena odwracalności procesów toksyczności prowadzona w odpowiednio opracowanych mo-

delach badawczych, co umożliwi ostatecznie właściwe zdefiniowanie poziomu bezpieczeństwa testowanych nanoformulacji magnetycznych.

PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ

Analiza potencjału toksycznego innowacyjnych nanoformulacji magnetycznych jest w ocenie środowisk opiniotwórczych zagadnieniem niezwykle złożonym i na dzień dzisiejszy stanowi niewątpliwie wyzwanie dla współczesnej nanotoksykologii. Śledząc uważnie literaturę przedmiotu, nie trudno zauważyć, iż mimo znaczących postępów poczynionych na polu badań przedklinicznych, dotkliwym problemem dla większości badaczy testujących multifunkcyjne platformy magnetyczne pozostaje brak standaryzacji w zakresie strategii oceny potencjału toksycznego prowadzonej w układach *in vitro* czy w doświadczalnych modelach zwierzęcych *in vivo* [62]. Bezwzględnie zdefiniowana wymaga, m.in. dobór zakresu stężeń nanoformulacji magnetycznych, badanych parametrów czy odpowiednich linii komórkowych, w których szacowanie efektu toksycznego nie będzie ograniczone jedynie do wyników uzyskanych w przeżywalności komórek docelowych, ale uwzględni również wpływ nanomagnetyków na procesy biodystrybucji i biotransformacji pierwszej i drugiej fazy [17]. Dalsze obszary badań naświetlają także pojawiające się od pewnego czasu sugestie dotyczące możliwości oddziaływania badanych nanostruktur magnetycznych z odczynnikami powszechnie stosowanych testów diagnostycznych [62]. Ponieważ powyższe poddaje pod wątpliwość wiarygodność wyników uzyskanych w badaniach toksyczności alternatywnej, głównie nanoformulacji uzyskiwanych technikami „*wet-transfer*”, konieczne obok doboru odpowiednich technik testowania staje się także uwzględnienie możliwości wystąpienia potencjalnych interakcji już na etapie opracowywania syntezy innowacyjnych nanoproductów [20]. Jednym z ważniejszych zagadnień analizy potencjału toksycznego jest bez wątpienia opracowanie zwalidowanych technik detekcyjnych i pomiarowych, które umożliwią nie tylko odróżnienie nanocząstek zinternalizowanych od przyłączonych powierzchniowo do błony komórkowej, ale przede wszystkim dokładne oszacowanie ich stężenia (Ryc. 2). Powyższe pozwoli rozwiązać kwestię rzeczywistych dawek nanomaterialów magnetycznych, które winny być wyrażane jako całkowita liczba cząstek, z uwzględnieniem ich rozkładu wielkości, oddziałujących na układy biologiczne [62]. Obiecujące w powyższej kwestii wydaje się m.in. poszerzenie arsenału dostępnych technik analitycznych o metodyki takie jak ICP-MS i ICP-AES, doskonałe

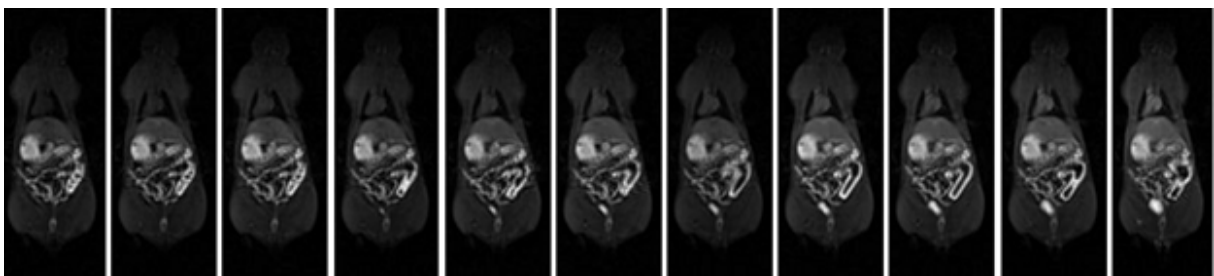


Ryc. 2. Ludzkie fibroblasty skóry podczas 24 godzinnej hodowli w obecności nanomagnetycznych kapsulek węglowych typu Fe-C (CEMNs).

Obrazy otrzymane w mikroskopie fazowo-kontrastowym podczas hodowli fibroblastów na płytkach 24-dółkowych bez dodatku CEMNs (A) oraz z dodaniem CEMNs w stężeniu 0,001 µg/ml (B), 10 µg/ml (C) i 100 µg/ml (D). Powiększenie 100x (*Grudziński i wsp.*, badania własne).

Fig. 2. Human skin fibroblasts during a 24 hour culture in the presence of carbon encapsulated magnetic nanoparticles Fe-C type (CEMNs).

Images obtained by a phase-contrast microscopy during culture of fibroblasts in 24-well plates without added CEMNs (A) and with the addition of CEMNs at concentration of 0.001 µg/ml (B), 10 µg/ml (C) and 100 µg/ml (D), respectively. Magnification 100x (*Grudziński et al.* personal research).



Ryc. 3. Obrazowanie dynamiki wzmocnienia kontrastowego (DCE-MRI) szczura w badaniu magnetyczno-rezonansowym. Badanie wykonano po dożylnym podaniu kontrastu gadolinowego. W obrazowaniu DCE-MRI zastosowano 1,5T system oraz T1-zależną sekwencję EPI. Fazy dystrybucji i wczesnej eliminacji kontrastu widoczne w postaci jasnych zmian na obrazach MR (*Grudziński i wsp.*, badania własne).

Fig. 3. Dynamics contrast enhancement imaging (DCE-MRI) of rat in the magnetic resonance study.

The study was performed after intravenous administration of a gadolinium contrast agent. A 1.5T system and T1-weighted EPI sequence was used in DCE-MRI. Distribution and early elimination phases of the contrast is visible through the bright changes on MR images (*Grudziński et al.*, personal research).

nadające się do analizy pierwiastków metalicznych w tkankach ludzkich i zwierzęcych.

Ponieważ nieodłącznym elementem prawidłowego testowania toksyczności są badania w modelach zwie-

rzęcych prowadzone w warunkach przyżyciowych, kluczowym dla oceny toksyczności i szacowania narażenia punktem pozostaje opracowanie wiarygodnych technik monitorujących biodystrybucję nanomagnetyków w or-

ganizmach żywych, które byłyby oparte o specyficzne własności nanoformulacji magnetycznych [40]. Dużym zainteresowaniem w powyższej materii zaczynają cieszyć się techniki tomografii rezonansu magnetycznego, których aplikacja może potencjalnie ułatwić wyjaśnienie szeregu zagadnień z obszaru toksykokinetyki zróżnicowanych strukturalnie i czynnościowo nanomateriałów magnetycznych (Ryc. 3). Nie mniej ważnym pozostaje dokładna analiza stopnia internalizacji i biodegradacji struktur w organizmie czy wpływu długoterminowej ekspozycji i (lub) potencjalnej kumulacji nanocząstek na aktywność układów biologicznych [10, 40, 47].

W świetle cytowanych doniesień literaturowych, podjęcia stanowczych kroków wymaga ponadto kwestia opracowania wiarygodnych testów analizy potencjału immunotoksycznego i immunomodulacyjnego oraz doświadczalnych modeli predykcyjnych, które umożliwiłyby identyfikowanie potencjału toksycznego nanoformulacji magnetycznych w oparciu o poczynione modyfikacje strukturalne testowanych nanoplateform [48]. Należy zatem domniemywać, iż w perspektywie najbliższych lat, główne wysiłki nanotoksykologów będą koncentrować się na opracowaniu właściwej metodologii badań potencjału toksycznego opartych o wykorzystanie zwalidowanych modeli eksperymentalnych *in vitro* i *in vivo* oraz budowie komplementarnego systemu predykcyjnego, który zapewni w przyszłości konstruowanie bezpiecznych nanoformulacji magnetycznych, w oparciu o dane uzyskane nie tylko w klasycznych modelach badawczych, ale także z wykorzystaniem alternatywnych technik obliczeniowych *in silico*, np. metody nano-QSAR, umożliwiających szybką ocenę potencjału toksycznego w oparciu o ilościowe zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością testowanych nanoformulacji [52].

Podziękowania / Acknowledgements

Praca została przygotowana w ramach realizacji projektu badawczego pt. „Nowe heteronanostrukturalne superparamagnetyki w molekularnym obrazowaniu nowotworów” finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Warszawa; kontynuacja finansowania przez Narodowe Centrum Nauki, Kraków (Projekt Nr N N518 381737).

PIŚMIENNICTWO

1. *Ahamed M, Akhtar MJ, Siddiqui MA, Ahmad J, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, AlSalhi MS, Alrokayan SA.*: Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology* 2011, 283, 101-108.
2. *Apopa PL, Qian Y, Shao R, Guo NL, Schwegler-Berry D, Pacurari M, Porter D, Shi X, Vallyathan V, Castranova V, Flynn DC.*: Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Particle Fibre Toxicol.* 2009, 6, 1.
3. *Arrott A.*: Criterion for ferromagnetism from observations of magnetic isotherms. *Phys. Rev.* 1957, 108, 1394-1396.
4. *Au C, Mutkus L, Dobson A, Riffle J, Lalli J, Aschner M.*: Effects of nanoparticles on the adhesion and cell viability on astrocytes. *Biol. Trace Elem. Res.* 2007, 120, 248-256.
5. *Bae JE, Huh MI, Ryu BK, Do JY, Jin SU, Moon MJ, Jung JC, Chang Y, Kim E, Chi SG, Lee GH, Chae KS.*: The effect of static magnetic fields on aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 2011, 32, 9401-9414.
6. *Bahadur D, Giri J.*: Biomaterials and magnetism. *Sadhana* 2003, 28, 639-656.
7. *Balivada S, Rachakatla RS, Wang H, Samarakoon TN, Dani RK, Pyle M, Kroh FO, Walker B, Leaym X, Koper OB, Tamura M, Chikan V, Bossmann SH, Troyer DL.*: A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. *BMC Cancer* 2010, 10, 119.
8. *Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis ASG.*: Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials* 2004, 25, 5405-5413.
9. *Briley-Saebo K, Bjørnerud A, Grant D, Ahlstrom H, Berg T, Kindberg GM.*: Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. *Cell Tissue Res.* 2004, 316, 315-323.
10. *Brisset JC, Desestret V, Marcellino S, Devillard E, Chauveau F, Lagarde F, Nataf S, Nighoghossian N, Berthezene Y, Wiart M.*: Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7T and 7T. *Eur. Radiol.* 2010, 20, 275-285.
11. *Chen YJ, Tao J, Xiong F, Zhu JB, Gu N, Geng KK.*: Characterization and *in vitro* cellular uptake of PEG coated iron oxide nanoparticles as MRI contrast agent. *Pharmazie* 2010, 65, 481-486.
12. *Cho WS, Cho M, Kim SR, Choi M, Lee JY, Han BS, Park SN, Yu MK, Jon S, Jeong J.*: Pulmonary toxicity and kinetic study of Cy5.5-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles by optical imaging. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009, 239, 106-115.
13. *Choi JY, Lee SH, Na HB, An K, Hyeon T, Seo TS.*: *In vitro* cytotoxicity screening of water-dispersible metal oxide nanoparticles in human cell lines. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2010, 33, 21-30.
14. *Clement JH, Schwalbe M, Buske N, Wagner K, Schnabelrauch M, Gornert P, Kliche KO, Pachmann K, Weitschies W, Hoffken K.*: Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells. *J. Cancer Res. and Clin. Oncol.* 2006, 132, 287-292.
15. *Cywińska MA, Grudziński IP, Cieszanowski A, Bystrzejewski M, Popławska M.*: Nanoplateforms for magnetic resonance imaging of cancer. *Polish J. Radiol.* 2011, 76, 28-38.

16. *De Jong WH, Borm PJA.*: Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* 2008, 3, 133-149.
17. *Ding J, Tao K, Li J, Song S, Sun K.*: Cell-specific cytotoxicity of dextran-stabilized magnetite nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010, 79, 184-190.
18. *Fortin JP, Gazeau F, Wilhelm C.*: Intracellular heating of living cells through Néel relaxation of magnetic nanoparticles. *Eur. Biophys. J.* 2008, 37, 223-228.
19. *Gazeau F, Levy, M, Wilhelm C.*: Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy. *Nanomedicine* 2008, 3, 831-844.
20. *Gonzales M, Mitsumori LM, Kushleika JV, Rosenfeld ME, Krishnan KM.*: Cytotoxicity of iron oxide nanoparticles made from thermal decomposition of organometallics and aqueous phase transfer with Pluronic F127. *Contrast Media Mol. Imaging* 2010, 5, 286-293.
21. *Grudziński IP.*: Bezpieczeństwo nanoproduktów leczniczych: Nowe obszary badań toksykologicznych. *Roczn. PZH* 2011, 62, 239-246.
22. *Gubin SP, Koksharov YA, Khomutov GB, Yurkov GY.*: Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. *Russian Chem. Rev.* 2005, 74, 489-520.
23. *Gupta AK, Curtis AS.*: Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials* 2004, 25, 3029-3040.
24. *Gupta AK, Gupta M.*: Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 2005, 26, 1565-1573.
25. *Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M.*: Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine* 2007, 2, 23-39.
26. *Gupta AK, Wells S.*: Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and toxicity studies. *IEEE Transactions Nanobioscience* 2004, 3, 66-73.
27. *Häfeli UO, Riffle JS, Harris-Shekhawat L, Carmichael-Baranauskas A, Mark F, Dailey JP, Bardenstein D.*: Cell uptake and in vitro toxicity of magnetic nanoparticles suitable for drug delivery. *Mol. Pharm.* 2009, 6, 1417-1428.
28. *Haglund E, Seale-Goldsmith MM, Leary JF.*: Design of multifunctional nanomedicine systems. *Annals of Biomedical Engineering* 2009, 37, 2048-2063.
29. *Huang YW, Wu C, Aronstam RS.*: Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: recent insights from in vitro studies. *Materials* 2010, 3, 4842-4859.
30. *Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ.*: In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology In Vitro* 2005, 19, 975-983.
31. *Indira TK, Lakshmi PK.*: Magnetic Nanoparticles - Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 2010, 3, 1035-1042.
32. *Jeng HA, Swanson J.*: Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ. Sci. Health. A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 2006, 41, 2699-2711.
33. *Kai W, Xiaojun X, Ximing P, Zhenqing H, Qiqing Z.*: Cytotoxic effects and the mechanism of three types of magnetic nanoparticles on human hepatoma BEL-7402 cells. *Nanoscale Res. Letters* 2011, 6, 480.
34. *Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee JK, Cho MH.*: Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol. Sci.* 2006, 89, 338-347.
35. *Krishnan KM.*: *Biomedical Nanomagnetism*: A spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE Trans. Magn.* 2010, 46, 2523-2558.
36. *Kumar A, Jena PK, Behera S, Lockey RF, Mohapatra S, Mohapatra S.*: Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery. *Nanomedicine* 2010, 6, 64-69.
37. *Kwon JT, Hwang SK, Jin H, Kim DS, Minai-Tehrani A, Yoon HJ, Choi M, Yoon TJ, Han DY, Kang YW, Yoon BI, Lee JK, Cho MH.*: Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *J. Occup. Health* 2008, 50, 1-6.
38. *Kwon JT, Kim DS, Minai-Tehrani A, Hwang SK, Chang SH, Lee ES, Xu CX, Lim HT, Kim JE, Yoon BI, An GH, Lee KH, Lee JK, Cho MH.*: Inhaled fluorescent magnetic nanoparticles induced extramedullary hematopoiesis in the spleen of mice. *J. Occup. Health* 2009, 51, 423-431.
39. *Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M.*: Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances Coll. Interface Sci.* 2011, 166, 8-23.
40. *Levy M, Luciani N, Alloyeau D, Elgrabli D, Daveaux V, Pechoux C, Chat S, Wang G, Vats N, Gendron F, Factor C, Lotersztajn S, Luciani A, Wilhelm C, Gazeau F.*: Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2011, 32, 3988-3999.
41. *Lin MM, Kim HW, Kim H, Muhammed M, Kim DK.*: Iron oxide-based nanomagnets in nanomedicine: fabrication and application. *Nanoreviews* 2010, 1, 4883.
42. *Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Shokrgozar MA, Milani AS, Häfeli UO, Stroeve P.*: A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 2010, 75, 300-309.
43. *Marmorato P, Ceccone G, Gianoncelli A, Pascolo L, Ponti J, Rossi F, Salomé M, Kaulich B, Kiskinova M.*: Cellular distribution and degradation of cobalt ferrite nanoparticles in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicol. Letters* 2011, 207, 128-136.
44. *Maurer-Jones MA, Bantz KC, Love SA, Marquis BJ, Haynes CL.*: Toxicity of therapeutic nanoparticles. *Nanomedicine* 2009, 4, 219-241.
45. *Mayer-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A.*: Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 2011, 103, 317-324.
46. *Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Veverka P, Goglio G, Demourgues A, Portier J, Pollert E, Duguet E.*: Magnetic nanoparticle design for medical applications. *Progress in Solid State Chemistry* 2006, 34, 237-247.

47. *Naubauer AM, Sim H, Winter PM, Caruthers SD, Williams TA, Robertson JD, Sept D, Lanza GM, Wickline SA.*: Nanoparticle pharmacokinetic profiling in vivo using magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Med.* 2008, 60, 1353-1361.
48. *Oostingh GJ, Casals E, Italiani P, Colognato R, Stritzinger R, Ponti J, Pfaller T, Kohl Y, Ooms D, Favilli F, Leppens H, Lucchesi D, Rossi F, Nelissen I, Thielecke H, Puentes VF, Duschl A, Borashi D.*: Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Particle Fibre Toxicology* 2011, 8, 8.
49. *Pankhurst QA, Thanh NKT, Jones SK, Dobson J.*: Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2009, 42, 1-15.
50. *Park EJ, Kim H, Kim Y, Yi J, Choi K, Park K.*: Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. *Toxicology* 2010, 275, 65-71.
51. *Prijic S, Sersa G.*: Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology. *Radiol. Oncol.* 2011, 45, 1-16.
52. *Puzyn T, Rasulev B, Gajewicz A, Hu X, Dasari TP, Michalkova A, Hwang HM, Toropov A, Leszczynska D, Leszczynski J.*: Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Nature Nanotechnology* 2011, 6, 175-178.
53. *Rodríguez-Luccioni H, Latorre-Esteves M, Méndez-Vega J, Soto O, Rodríguez AR, Rinaldi C, Torres-Lugo M.*: Enhanced reduction in cell viability by hyperthermia induced by magnetic nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 2011, 6, 373-380.
54. *Runge VM, Clanton JA, Lukehart CM, Partain CL, James AE.*: Paramagnetic agents for NMR imaging. *Am. J. Roentgenol.* 1983, 141, 1209-1215.
55. *Safi M, Clowez S, Galimard A, Berret JF.*: In vitro toxicity and uptake of magnetic nanorods. *J. Physics: Conference Series* 2011, 304, 1-8.
56. *Safi M, Courtois J, Seigneuret M, Conjeaud H, Berret JF.*: The effect of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2011, 32, 9353-9363.
57. *Schlachter EK, Widmer HR, Bregy A, Lönnfors-Weitzel T, Vajtai I, Corazza N, Bernau VJP, Weitzel T, Mordasini P, Slotboom J, Herrmann G, Bogni S, Hofmann H, Frenz M, Reinert M.*: Metabolic pathway and distribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: in vivo study. *Int. J. Nanomedicine* 2011, 6, 1793-1800.
58. *Shubajev VI, Pisanic TR, Jin S.*: Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2009, 61, 467-477.
59. *Singh N, Jenkins GJS, Asadi R, Doak SH.*: Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews* 2010, 1, 5358.
60. *Soenen SJH, De Cuyper M.*: Assessing iron oxide nanoparticle in vitro: current status and future perspectives. *Nanomedicine* 2010, 5, 1261-1275.
61. *Soenen SJ, Illyes E, Vercauteren D, Braeckmans K, Majer Z, De Smedt SC, De Cuyper M.*: The role of nanoparticle concentration dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes. *Biomaterials* 2009, 30, 6803-6813.
62. *Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro JM, Parak WJ, De Smedt SC, Braeckmans K.*: Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 2011, 6, 446-465.
63. *Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L.*: Nanomaterial cytotoxicity is composition, size and cell dependent. *Particle Fibre Toxicol.* 2010, 7, 22.
64. *Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R.*: Magnetic nanoparticles for MRI imaging: agents techniques and cardiovascular applications. *Basic Res. Cardiol.* 2008, 103, 122-130.
65. *Sun C, Du K, Fang C, Bhattarai N, Veiseh O, Kivitt F, Stephen Z, Lee D, Ellenbogen RG, Ratner B, Zhang M.*: PEG-Mediated synthesis of highly dispersive multifunctional superparamagnetic nanoparticles: their physicochemical properties and function in vivo. *ACS Nano* 2010, 4, 2402-2410.
66. *Sun C, Lee JSH, Zhang M.*: Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2008, 60, 1252-1265.
67. *Tomitaka A, Jeun M, Bae S, Takemura Y.*: Evaluation of magnetic and thermal properties of ferrite nanoparticles for biomedical application. *J. Magnetism* 2011, 16, 164-168.
68. *Wang J, Chen Y, Chen B, Ding J, Xia G, Gao C, Cheng J, Jin N, Zhou Y, Li X, Tang M, Wang XM.*: Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice. *Int. J. Nanomedicine* 2010, 5, 861-866.
69. *Wu YN, Chen DH, Shi XY, Lian CC, Wang TY, Yeh CS, Ratnac KR, Thordarson P, Braet F, Shieh DB.*: Cancer-cell-specific cytotoxicity of non-oxidized iron elements in iron core-gold shell NPs. *Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.* 2011, 7, 420-427.
70. *Yan H, Zhang B.*: In vitro cytotoxicity of monodispersed hematite nanoparticles on Hek 293 cells. *Materials Letters* 2011, 65, 815-817.
71. *Ying E, Hwang HM.*: In vitro evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings and different sizes in A3 human T lymphocytes. *Sci. Total Environ.* 2010, 408, 4475-4481.
72. *Yu Y, Sun D.*: Superparamagnetic iron oxide nanoparticle 'theranostic' for multimodality tumor imaging, gene delivery, targeted drug and prodrug delivery. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2010, 3, 117-130.
73. *Zhao L, Tang J, Feng SS.*: Nanothermotherapy by high performance magnetic nanoparticles. *Nanomedicine* 2010, 5, 1305-1308.

Otrzymano: 13.02.2012

Zaakceptowano do druku: 03.05.2012