

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE



**Analýza potenciálního markeru rakoviny prostaty pomocí
Magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy
spektroskopie (MA-SERS)**

Bakalářská práce

Autor:	Alena Večeřová
Školitel:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Studijní program:	B 1407 Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Alena Večeřová
Název práce:	Analýza potenciálního markeru rakoviny prostaty pomocí Magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS)
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů
Vedoucí práce:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Rok obhajoby:	2016
Abstrakt:	<p>V souvislosti s neustále se rozšiřujícími poznatky a novými možnostmi v oblasti nanočástic je také zkoumáno i jejich široké spektrum využití. Kombinace metody Ramanovy spektroskopie za přítomnosti stříbrných a magnetických nanočástic, neboli Magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (MA-SERS), představuje vhodný způsob detekce látek ve velmi nízkých koncentracích. Prostatický specifický membránový antigen (PSMA), jako potenciální ukazatel karcinomu prostaty, není kvůli své nízké koncentraci v séru, a tím i problematické detekci, doposud zařazen do diagnostického procesu. Tato práce se zabývá procesem jeho spolehlivého zjištění za účasti karboxymethylcelulosou upravených magnetických nanočástic s inhibítorem JB-303 a nanočástic stříbra. Kdy specifická úprava magnetických nanočástic a přítomnost nanočástic stříbra dovoluje selektivní ukotvení PSMA na nanostrukturní motivy kovového povrchu. Metoda byla realizována měřením koncentrace PSMA v reálných vzorcích krve.</p>
Klíčová slova:	PSMA, SERS, nanočástice stříbra, modifikované magnetické částice, metoda standartního přídatku
Počet stran:	43
Jazyk:	čeština

Bibliographic identification

Author: Alena Večeřová

Title: Analysis of a potential marker of prostate cancer using magnetic assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS)

Type of thesis: Bachelor

Department: Regional Centre of Advanced Technologies and Materials

Supervisor: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract: In connection with the expanding knowledge and new possibilities in the field of nanoparticles is also examined their wide range of applications. Combination method of Raman spectroscopy with using of silver and magnetic nanoparticles, or Magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS) is an appropriate method for detecting substances in a very low concentrations. Prostate specific membrane antigen (PSMA) as a potential indicator of prostate cancer is not due to its low concentration in serum, previously included in the diagnostic process. This paper examines the process of finding a reliable attended by modified carboxymethylcellulose magnetic nanoparticles inhibitor JB-303 and silver nanoparticles. Where a specific arrangement of magnetic nanoparticles and the presence of silver nanoparticles allows selective anchoring motifs PSMA on nanostructured metal surface. The method was realised by measuring the concentration of PSMA in real blood samples.

Keywords: PSMA, SERS, silver nanoparticles, modified magnetic particles, standard addition method

Number of pages: 43

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím, aby má bakalářská práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Alena Večeřová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce panu RNDr. Václavu Rancovi, PhD., za odborné vedení, jeho čas a ochotu při zpracování mého tématu. Stejně tak děkuji paní Mgr. Zuzaně Chaloupkové za pomoc a trpělivost při realizaci experimentální části. Oběma tímto děkuji za milý a svěží přístup, i díky čemuž mě práce bavila. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Zdence Medřikové za poskytnutí vzorku cMNPs-JB-303 s postupem přípravy, fotografiemi a změřením zeta potenciálu, DLS a FT-IC. Děkuji i panu Ing. Rudolfu Logaji za poskytnuté IT konzultace.

Chtěla bych poděkovat Regionálnímu centru pokročilých technologií materiálů a Katedře fyzikální chemie za umožnění tuto práci vypracovat. A v neposlední řadě děkuji celé mé rodině za podporu při studiu.

Obsah

Obsah	6
Úvod	7
1 Teoretická část	9
1.1 Optické pro studium biologických markerů	9
1.1.1 UV-Vis spektroskopie.....	9
1.1.2 Infračervená spektroskopie	11
1.1.3 Ramanova spektroskopie.....	13
1.1.4 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie.....	15
1.2 Nanotechnologie v Ramanově spektroskopii	16
1.2.1 Nanočástice	17
1.3 Karcinom prostaty.....	18
1.3.1 Markery karcinomu prostaty	20
1.3.1.1 Prostatický specifický membránový antigen.....	20
1.3.1.2 Ostatní markery	21
2 Experimentální část	23
2.1 Instrumentace a materiály	23
2.2 Pracovní postupy.....	24
2.2.1 Příprava koloidního roztoku stříbra.....	24
2.2.2 Příprava stabilizovaných magnetických nanočástic	25
2.2.3 Postup při analýze vzorku	27
2.2.3.1 Optimalizace podmínek měření.....	27
2.2.3.2 Zjišťování koncentrace PSMA v modelových vzorcích.....	30
2.2.3.3 Zjišťování koncentrace PSMA v reálném vzorku	30
2.2.4 Zjišťování dalších aspektů metody	31
3 Výsledky	32
3.1 Stanovení koncentrace modelových vzorků	32
3.2 Stanovení koncentrace reálného vzorku	33
3.3 Další aspekty metody.....	35
3.3.1 Opakovatelnost měření.....	35
3.3.2 Stabilita měření	35
3.3.3 Změna pH.....	36
Závěr	38
Summary	39
Reference	40

Úvod

Tato bakalářská práce na téma „*Studium potenciálního markeru rakoviny prostaty pomocí povrchem zesílené Magneticky Ramanovy spektroskopie*“ je zaměřena na vývoj spolehlivé analytické metody ke stanovení PSMA (prostatický specifický membránový antigen) pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie v lidské krvi.

Ve spektroskopických metodách, jejichž podstatou je absorpce nebo emise energie ve formě elektromagnetického záření, je rozhodující poznatek, že každému stavu částice, který je popsán vlnovou funkcí, charakterizující jeho vlastnosti, odpovídá určitá hodnota energie. Spektroskopické metody lze rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinu tvoří interakce, při nichž dochází k výměně energie mezi zkoumanou látkou a zářením. V druhém případě látka pouze určitým způsobem ovlivňuje vlastnosti procházejícího záření, aniž by docházelo k výměně energie.

Ramanova spektroskopie je analytická metoda známá již z třicátých let minulého století. Jedná se o metodu vhodnou pro identifikaci látek, při určování jejich složení a struktury. Velkého rozmachu se ale dočkala až s vývojem moderních technologií. K moderním metodám Ramanovy spektroskopie patří i využití nanočástic. Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie si získala pověst vhodného nástroje pro biochemické a biofyzikální vědy. Předností této metody je velká citlivost pro strukturální změny molekuly. Dovoluje také pracovat s velmi malými objemy a koncentracemi zkoumané látky, což umožňuje přiblížení se fyziologickým koncentracím. Jako spektroskopická nedestruktivní technika má řadu výhod a může být použita za podmínek vyhovujícím i živým organismům.

Rakovina prostaty je velmi závažnou a u mužů velmi častou formou nádorových onemocnění. Karcinom prostaty je z počátku asymptomatický, výrazné klinické projevy jsou až známkou pokročilejšího stádia. Dnešní nejčastěji používané diagnostické metody nemusí tuto diagnózu zcela jasně potvrdit. Příkladem je stanovení hodnoty ukazatele aktivity prostaty, neboli prostatický specifický antigen (PSA). Koncentrace tohoto antigenu může být pro jednoho pacienta vypovídající o vyšším riziku vzniku karcinomu, zatímco u druhého může stejná koncentrace náležet již rozvinuté nemoci. Hladina PSA narůstá v průběhu života, ovšem sama o sobě nemusí nutně souviset s rakovinou. Příčinou zvýšení PSA může být benigní hyperplazie prostaty, zánět prostaty nebo dokonce stav po masáži prostaty. Potvrzení nebo

vyločení nádoru prostaty lze spolehlivě uskutečnit pomocí její biopsie, která s sebou nese svá nezanedbatelná rizika. S ohledem na rostoucí počty nově vzniklých onemocnění a prodlužování délky života, se stává adekvátní diagnostika a terapie tohoto onemocnění zásadní socioekonomickou a zdravotnickou prioritou.

K nalezení spolehlivé neinvazivní metody se vyvíjí velké úsilí, k čemuž může právě přispět využití MA-SERS. Pomocí Ramanova zesílení lze dosáhnout výrazného znásobení signálu biomarkerů adsorbovaných na površích nanočástic kovů, nejčastěji však stříbra, zlata nebo mědi. Diagnostické biomarkery jsou biologické molekuly, jako například proteiny, peptidy nebo nukleové kyseliny, které se nacházejí v tkáních, krvi a jiných tělesných tekutinách [1], a u kterých může změna jejich koncentrace signalizovat zvýšené riziko sledovaného onemocnění. Úkolem práce je získat co nejsilnější signál při interakci elektromagnetického vlnění s molekulami prostatického specifického membránového antigenu, které se musí vhodnou metodou selektivně ukotvit na nanostrukturní motivy kovového povrchu.

1 Teoretická část

1.1 Optické metody pro studium biologických markerů

Typické postupy sloužící pro analýzu a detekci biologických markerů se odvíjí právě od metod spektroskopických, mezi jejichž aplikacemi je určitá analogie. Avšak k dispozici nejsou pouze metody spektroskopické, nýbrž i separační, jako například chromatografické či elektromigrační. Nevýhodou je však požadavek na vysokou čistotu vzorku. Klíčovou metodou je v tomto případě MA-SERS. Tato spektroskopická metoda je zvolena díky svým jedinečným vlastnostem a nekomplikovaným požadavkům. Není zde například kladen tak vysoký nárok na přípravu vzorku. V této práci se vychází ze vzorku lidské krve a díky speciální úpravě magnetických částic se požadovaný protein vyselektuje bez větší pomoci sám. Avšak k teoretickému základu, realizaci a charakterizaci výsledků je zde potřebná nejen MA-SERS, ale také UV-Vis nebo i infračervená spektroskopie.

Obecně lze spektroskopické metody zařadit do kategorie oborů, které se zabývají studiem interakcí látek s elektromagnetickým zářením. Jedním z hlavních zdrojů pro část 1.1 jsou skripta vydaná na této škole, s názvem *Spektrální metody studia chemických látek*. V této publikaci jsou spektroskopické metody dále členěny na tři podkategorie. Na metody odvíjející se od vlnových délek, od studovaných látek a poslední skupinou jsou metody rozdělené na bázi charakteru spekter.

Světlo je zpravidla pohlcováno nebo emitováno, tyto základní schopnosti interakce jsou výchozí pro další zkoumání a odhalování struktur látek. Podmínkou pohlcení světla látkou je přítomnost minimálně dvou hladin, a to E_1 – základního energetického stavu a E_2 – excitovaného energetického stavu. Pro jev absorpce je taktéž důležitá i podmínka, za které nesmí být hodnota tranzitního nulová. Zda nastane stav s nulovou nebo nenulovou hodnotou tranzitního stavu, je otázkou výběrových pravidel.¹[2]

1.1.1 UV-Vis spektroskopie

UV-Vis² spektroskopie je velmi široce užívanou analytickou metodou umožňující studium optických vlastností neznámých látek a stanovování koncentrací látek známých. V jedné studii

¹ 1. Δn libovolné 2. $\Delta l = \pm 1$ 3. $\Delta m_s = 0$ 4. $\Delta m = 0; \pm 1$

² zkr. z angl. *ultraviolet-visible*

se dokonce uvádí její využití pro objasnění procesu, kdy se nanomateriál navazuje na protein. Na nanočástice zlata se navázal sérový albumin, což bylo monitorováno UV-Vis spektrem a získané spektrum bylo následně analyzováno pokročilým chemometrickým algoritmem multivariantního rozlišení křivek, označovaného jako MCR-ALS. [3]

Veličinami, bez kterých se tato analytická metoda UV-Vis spektroskopie neobejde, jsou transmittance T a absorbance A . Transmittance je veličina, která je výsledkem podílu intenzity záření, které vzorkem prošlo a které do něj vstoupilo. Absorbance je naopak definována jako záporný dekadický logaritmus transmittance nebo také pomocí Lambert-Beerova zákona

$A = c \cdot \varepsilon \cdot l$, kde ε je molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$], c je koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] a l je tloušťka měřené vrstvy [cm].

Podstata UV-Vis spočívá v absorpci elektromagnetického záření v rozmezí 200 až 800 nm molekulami vzorku. Při pohlcení tohoto záření se valenční elektrony, jako součást molekulových orbitalů, excitují. Jejich absorpční molekulová spektra se v podstatě shodují s elektronovými. V důsledku přítomnosti vibračních a rotačních podhladin můžeme tato spektra pozorovat jako spojitá.

Ultrafialové (UV) záření v rozpětí 100 – 400 nm se podle svých vlnových délek dále rozděluje na dvě větve, blízké ultrafialové záření (200 – 400 nm) a daleké ultrafialové záření (100 - 200 nm). Záření v rozmezí vlnových délek od 315 do 400 nm je nazýváno UVA a na Zemi ho dopadá 95 % celkového UV záření. Existuje ještě několik zástupců UV záření, za zmínku stojí například UVB a UVC, které jsou prokazatelnými karcinogeny.[4] [3]UV záření vychází z těles zahřátých na velmi vysokou teplotu jako hvězdy, rtuťové výbojky nebo elektrický oblouk.

Viditelné světlo je elektromagnetické záření o vlnové délce 390 – 760 nm. Pochází ze dvou základních zdrojů, přirozeného (hvězdy) a umělého (žárovka, laser). Je buď polychromatické nebo monochromatické. Ukázkou polychromatického světla je světlo bílé, které obsahuje více vlnových délek záření, zatímco monochromatické obsahuje pouze jednu.

Přístrojem pro měření UV-Vis spekter je spektrometr. Je sestavován jako jedno nebo dvou paprskový. Základními částmi jsou zdroj světla, monochromátor (vstupní štěrbinu – disperzní hranol – výstupní štěrbinu), měřicí prostor a detektor. Zdrojem viditelného světla bývá nejčastěji wolframové vlákno, halogenová či kryptonová lampa (300 – 2500 nm) a pro UV oblast to bývají deuteriové výbojky (190 – 400 nm). Polychromatické záření jde nejprve na vstupní štěrbinu přes monochromátor (optická mřížka) až na výstupní štěrbinu. Již

monochromatické záření prochází kyvetou (křemenné a obyčejné sklo, plast) se vzorkem a nakonec se detekuje pomocí fotonásobiče, fotodiody nebo CCD³ detektorem. Takto analyzovaný vzorek lze následně vyjádřit jako graf závislosti absorpce na vlnové délce. Vyhodnocení spekter probíhá pomocí metody lineární regrese z kalibrační přímky. [2]

1.1.2 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je analytická nedestruktivní technika, kdy se kvalitativně i specificky stanovuje struktura organických a anorganických látek. Zkoumá se pohlcení infračerveného záření analyzovaným materiálem. Infračervené záření je charakteristické vlnovými délkami 0.78 – 1000 mm, v přepočtu na vlnočty 12800 – 10 cm⁻¹. Zmíněné rozpětí je dále členěno na oblast blízkou (13000 – 4000 cm⁻¹), střední (4000 – 200 cm⁻¹) a vzdálenou (200 – 10 cm⁻¹). Nejvíce využívanou oblastí je střední.

Hlavní podmínkou infračervené spektroskopie je změna dipólového momentu. Zásadou metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, kdy v důsledku změny dipólového momentu dochází k modifikacím rotačně vibračních energetických stavů molekuly. Absorbovaná energie totiž není dostatečná k excitaci elektronů, proto se zvýší pouze energie vibrační a rotační. [2]

Vibrace u dvouatomových molekul (při zjednodušení, kdy molekula nemůže rotovat a přechází tedy mezi vibračními hladinami) lze prezentovat harmonickým oscilátorem. Tento pohyb má přirozenou frekvenci [Hz] $\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{m}}$.⁴ Ovšem se do této rovnice zavádí, z důvodu dvouatomové molekuly, také redukovaná hmotnost μ [kg]. Zavedením redukované hmotnosti molekuly $\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$, se frekvence změní tvar na $\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{\mu}}$. Pro přesnější vyjádření chování částic je třeba přejít do kvantové mechaniky, jelikož energie vibračního pohybu je kvantována $E = \left(v + \frac{1}{2}\right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$ ⁵, z čehož vyplývá vztah $E = \left(v + \frac{1}{2}\right) \cdot h \cdot \nu_m$.⁶ Frekvence pohlceného záření je vždy rovna frekvenci vibrace molekuly, absorpcí energie dojde pouze ke zvětšení amplitudy vibrace. Vibrační frekvence není ovšem harmonická, protože energie stoupá

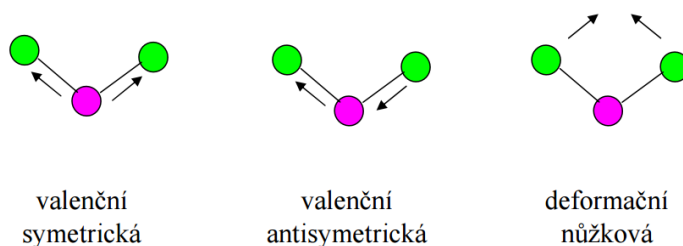
³ zkr. z angl. Charge couple device

⁴ f – frekvence [Hz]; m – hmotnost [kg]; π – konstanta s hodnotou 3,14

⁵ v – vibrační kvantové číslo, může nabývat hodnot 0,1,2,...

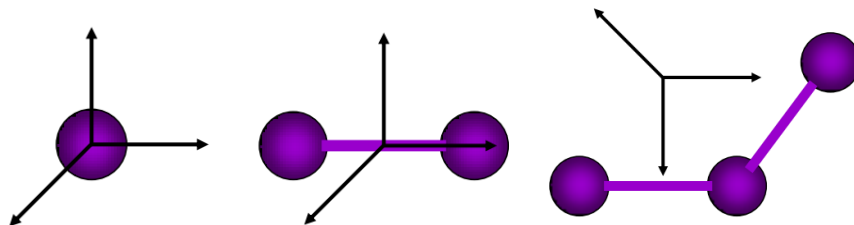
⁶ h – Planckova konstanta, hodnota 6,626070·10⁻³⁴ J·s

jen do doby, dokud nedojde k disociaci vazby a navíc zde dochází ke komplikovanějším vibracím při rostoucím počtu atomů v molekule. [5] [6] [7]



Obrázek 1. Typy molekulových vibrací; valenční symetrická a asymetrická, deformační nůžková [8]

Vibraci molekuly lze chápat jako opakující se změnu vzdálenosti mezi jádry a atomy. Molekula se také ale může pohybovat ve směru os x, y, z, tedy translačně, a navíc může i rotovat. Tento jev vystihuje stupeň volnosti, kdy pro n atomovou molekulu všeobecně platí $3n$ stupňů volnosti.



Obrázek 2. Pohyb částic v prostoru; jeden atom (vykonává pouze translační pohyb ve směru os x, y, z); lineární dvouatomová molekula ($3n-5 \rightarrow 6-5 \rightarrow 1$ stupeň volnosti); lomená tříatomová molekula ($3n-6 \rightarrow 9-6 \rightarrow 3$ stupně volnosti)[7]

Základní výběrové pravidlo říká, že elektromagnetické záření je pohlceno v důsledku interakce s oscilujícím dipólem. Pokud se změní dipólový moment, vzroste i intenzita vibrace. Kromě vibrací, zde však existují i rotace, nejsou ovšem příliš výrazné a lze je detekovat pouze v plynech. Absorbovanou energii potřebnou pro změnu rotačního stavu lze odvodit ze vztahu tuhého rotoru $E = 2BhcJ(J + 1)$.⁷

Grafickým zobrazením IR spektroskopie je funkční závislost energie absorbance nebo transmitance na vlnové délce dopadajícího záření. Nespornou výhodou infračervené spektroskopie je možnost měřit vzorky všech skupenství. Je zde možnost volby dvou druhů technik buď transmisní nebo reflektanční.

Transmisní techniky, kdy záření prochází přímo vzorkem, nemají žádné speciální požadavky,

⁷ B – rotační konstanta; J – rotační kvantové číslo (0,1,2);

co se týče kapalných a pevných vzorků, snad jen speciální kyvety. Avšak pro analýzu pevných vzorků je třeba jejich převedení na prášek. Ten je později měřen ve formě směsi s halogenidy alkalických kovů slisovaných do tenkých tablet, či metodou kapilární vrstvy, nebo jako suspenze v lehkém alifatickém oleji mezi okénky z monokrystalů halogenidů alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin.

Reflektanční techniky se blíže specifikují na zeslabenou úplnou reflektanci (ATR)⁸, spekulární (zrcadlovou) a difúzní reflektanci (DRIFT)⁹. Zeslabená úplná reflektance je vhodná pro silně absorbující vzorky, které mohou být pevné i kapalné. Principem je násobný úplný odraz záření na fázovém rozhraní měřeného vzorku a měřicího krystalu z materiálu o vysokém indexu lomu. Tímto krystalem může být ZnSe, diamant, AgCl, Si, Ge nebo safír. Spekulární reflexí jsou na základě indexu lomu měřeny materiály s velmi odražejícím zářením. Při difúzní reflektanci je vzorek převeden na prášek, který pohlcuje část infračerveného záření, další část je odražená, a poslední rozptýlená část je analyzována. [2] [5]

1.1.3 Ramanova spektroskopie

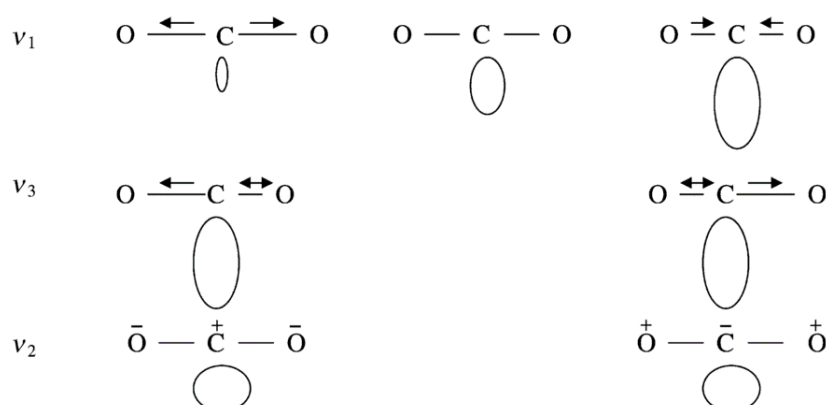
Zatímco je IR spektroskopie založena na absorpci, odrazu a emisi záření, je Ramanova spektroskopie založena na jeho rozptylu. K rozptylu záření dochází při kolizi fotonu s molekulou, obecně s látkou. Pokud je molekula vystavena záření o určité frekvenci, znamená to, že dochází k interakci fotonů energií $E = h \cdot \nu_0$. Jak uvádí Slobodan Šašić ve své knize *Pharmaceutical applications of Raman spectroscopy*, laserové světlo o vlnové délce 500 nm o výstupu 1 W vyzařuje přibližně $2,5 \cdot 10^{18}$ fotonů za sekundu. Tyto fotony v sobě zahrnují jak ty, co s molekulou interagují, tak i ty, co ji minou. Při ozáření chloridu uhličitého, což je bezbarvá kapalina, bylo zjištěno, že z celkového počtu $2,5 \cdot 10^{18}$ fotonů s molekulou interagovalo přibližně 10^{13} až 10^{15} fotonů. [9]

Oproti infračervené spektroskopii, kdy základní podmínkou byla změna dipólového momentu, je u Ramanovy spektroskopie podmínkou změna polarizovatelnosti během vibračního pohybu. Ramanova, stejně jako infračervená spektroskopie poskytuje data o vibračně-rotálních pohybech více atomických částic a navíc získaná data jsou k sobě komplementární. V IR spektrech jsou zobrazovány především polární vazby (např. C-O,

⁸ zkr. z angl. *Attenuated Total Reflectance*

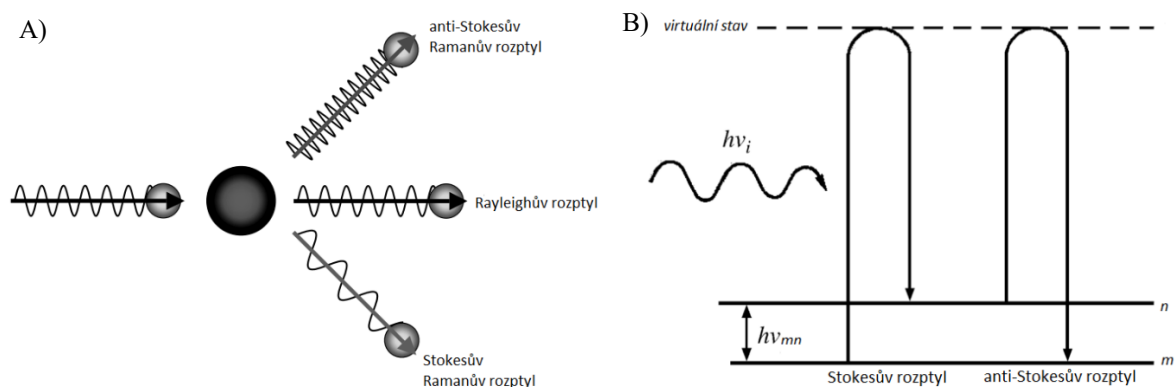
⁹ zkr. z angl. *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*

C=O,O-H), zatímco u Ramanových spekter jsou znatelnější vazby nepolární, symetrické (C=C, C≡C, N=N, S-S).



Obrázek 3. Změna polarizovatelnosti molekuly CO_2 ; vibrace $v_1 - v$ Ramanově spektru aktivní (neaktivní pro IR - nedochází ke změně dipólového momentu) - z důvodu rozmístění elektronů a vzdáleností od jádra; vibrace v_2 a v_3 - neaktivní - z důvodu stejného tvaru elipsoidu při různém rozmístění elektronů [9]

Metoda je pojmenována po indickém fyzikovi Siru Chandrasekharu Venkata Ramanovi, který byl oceněn v roce 1930 Nobelovou cenou. Se svým kolegou, K. S. Krishnanem, vysvětlil jev neelastického rozptylu světla. Klíčovou teorií je fakt, že rozptýlené záření pojímá nejen fotony o identické frekvenci jako dopadající záření, ale i fotony s frekvencí odlišnou. Podstatou Ramanovy spektroskopie je zářivý dvoufotonový přechod mezi dvěma stálými vibračními stavy molekuly, kdy je zkoumaná látka ozářena silným monochromatickým zářením, kterým může být laser. Pro objasnění děje, jsou důležité jevy Rayleighův, Stokesův a anti-Stokesův rozptyl.



Obrázek 4. A) i B) Schéma dvoufotonových přechodů, Ramanův a Rayleighův rozptyl [9]

Rayleighovým rozptylem je pojmenován jev, kdy se větší část záření elasticky odrazí, nepatrná

zbývající část (0,0001%) podléhá neelastickému rozptylu. Lze tedy vyvodit odevzdání části energie pro molekulové vibrace. Právě neelastickému rozptylu je možno přidělit Stokesův a anti-Stokesův rozptyl. Stokesovým rozptylem se rozumí emise fotonu s nižší energií, než jakou excitující foton původně nesl. Rozptyl anti-Stokesův je podmíněn vyšší energií rozptýleného záření než záření, které dopadlo. [10] [2]

Pro aktivní vibrační mód, na základě změny polarizovatelnosti, lze v Ramanově spektru pozorovat signál o dvou liniích. Tyto linie jsou osově souměrné, kdy uprostřed je signál Rayleighova rozptylu. V převážném množství se měří pouze oblast Stokesova rozptylu, s anti-Stokesovou oblastí je shodná.

Podobně jako IR, tak i Ramanova spektroskopie používá principiálně shodné spektrometry, disperzní a reflektanční. Disperzní Ramanův spektrometr, jehož zdrojem je laser, má intenzivní signál především pro UV-Vis oblast, na druhé straně je zde i riziko fluorescence. Aby bylo možné získat Ramanův signál, je třeba oddělení jednotlivých vlnových délek rozptýleného Ramanova záření, což lze pomocí disperzního prvku.

Reflektanční spektrometr, prostřednictvím laseru s menší energií, již omezuje jak jev fluorescence, tak i jiných fotochemických reakcí. Pro zdokonalení rychlosti a kvantity měření vlnových délek slouží interferometr. [10] [11]

Specializovanějšími metodami Ramanovy spektroskopie jsou také například rezonanční povrchem zesílená (SERRS)¹⁰, povrchově zesílená (SERS)¹¹, fotoakustická (PARS)¹², koherentní anti-Stokes (CARS)¹³ nebo koherentní Stokes (CSRS)¹⁴. [5]

1.1.4 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) a povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl (SERRS) jsou metody, díky kterým je možné zkoumat nedestruktivně látky, které kvůli své nízké koncentraci piko a až femtomolární ($10^{-12} - 10^{-15}$).

V případě SERRS, pro uskutečnění resonance stačí excitační zdroj o vhodné vlnové délce. Ovšem původ SERS se o zákon neopírá. Existují ovšem dvě teorie, kdy první vychází z předpokladu přímé závislosti intenzity Ramanova záření na druhé mocnině indukovaného

¹⁰ zkr. z angl. *Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy*

¹¹ zkr. z angl. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*

¹² zkr. z angl. *Photoacoustic Raman Spectroscopy*

¹³ zkr. z angl. *Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy*

¹⁴ zkr. z angl. *Coherent Stokes Raman Spectroscopy*

dipólového momentu. Tento elektromagnetický průběh, je zapříčiněn intenzivnějším elektromagnetickým polem v přítomnosti kovových částic. Zatímco druhá teorie uvažuje zvýšenou intenzitu na základě interakce mezi vnější strukturou kovu a analyzovanou látkou.

Počátečním krokem ke zvýšení elektromagnetického signálu je vytvoření povrchové plasmonu. Povrchový plasmon je kolektivní oscilace elektronů vázaných na povrch kovu. Jeho chování je závislé na povaze povrchu. Na hladkém jsou elektrony poutány a oscilují, na zdrsnelém povrchu elektrony oscilují kolmo. Velikost částic, při které povrchový plasmon vzniká, nastává u velikosti částic o 30 nm, stříbrné částice mají velikost 400 - 410 nm. S rostoucí velikostí částic, rezonanční frekvence klesá. Jedním z důvodů, proč se pro účely SERS volí stříbro a zlato, je, že vytváří povrchový plasmon při frekvencích příslušící viditelné části spektra. [2] [12]

Větší intenzita elektrického pole je zapříčiněna místní excitací plasmonu, kdy se pomocí laserového paprsku excitují vodivostní elektrony. Proto je také nutno dbát na výběr kovu s náležitým povrchem. Pro SERS je velmi často používáno koloidních částic jako stříbro nebo zlato. [5]

Vždy je tendence určitou metodu co možná nejvíce zdokonalit. Použitím magnetických nanomateriálů se toho dosáhlo a vznikla metoda magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS)¹⁵. Podstatnou vlastností nanokompozitů je vytvoření kovalentní vazby mezi kovovými a magnetickými nanočásticemi.

MA-SERS s využitím nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{streptavidinu}@\text{anti-IgG}$ pro detekci nejrozšířenějších protilátek v krvi savců prokázala účinnost metody. Ovšem jsou potřebné určité úpravy. Magnetické jádro bylo modifikováno O-karboxymethylchitosanem a povrch stříbrných nanočástic upraven streptavidinem, na němž byl navázán anti-imunoglobulin G. [13]

1.2 Nanotechnologie v Ramanově spektroskopii

Neustále se rozvíjející odvětví vědy, jejichž základem je syntéza, analýza a následná aplikace částic s rozměry od 1 nm do 100 nm. Vytvořený nanomateriál má odlišné vlastnosti od ostatních s větším rozměrem, počínající v mikrometrech. Odlišnými vlastnosti se rozumí kvantové jevy, kdy příčinnou chování je menší objem oproti povrchu. Jejich aplikace mohou dosahovat i diagnostických a léčebných účelů, příkladem je využití indocyaninu, což je klinicky schválené

¹⁵ zkr. z angl. *Magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy*

tepelně nestálé barvivo, v konjugaci s nanočásticemi zlata a zlatými nanotyčinkami. Taková modifikace se ukázala jako stabilnější, navíc s potenciálem zabíjet zhoubné buňky. [14] [15] Výzkumem nanotechnologií v rané diagnostice, sledování léčiv nebo přímo léčbě rakoviny prostřednictvím křemíkových nanokrystalů, se zabývá držitelka ceny Česká hlava, Anna Fučíková. Tato vědkyně tvrdí, že křemíkové nanokrystaly jsou zcela netoxické a samovolně se v organismu rozloží, čehož lze využít při jejich sledování v těle uvnitř buněk. Křemíkový nanokrystal je dále také schopen imitovat světlo, tedy změnit vlnovou délku světla. Dále jsou také schopny po určité úpravě povrchu vytvořit singletní kyslík, teoreticky je pak schopen reagovat s buňkou, kterou pak i zničí. [16]

Jiná úprava, například uhlíkové nanotrubičky, jsou vynikající vodiče elektrického náboje a jejich velký povrch umožňuje velký počet elektroaktivních míst. Mohou být tak ideální fixační matice pro biomolekuly. Elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami, na nichž je navázán enzym zesilují elektrochemický signál při biochemických reakcích. Uhlíkové nanotrubičky podporují účinné vedení elektrického proudu mezi redoxními centry několika metaloproteinů a elektrodou. [17]

Heterogenní materiály, které jsou charakteristické minimálně jednou složkou v rozměrech nano (10^{-9} m), se označují jako nanokompozity. Na otázku, proč se vytváří, je snadná odpověď, umocňují totiž vlastnosti ostatních materiálů, které následně disponují poutavými vlastnostmi. Je to nový rozměr, který opět posouvá hranice výzkumu. Vlastnosti pak plynou ze svého složení a charakteru jednotlivých částic. Kompozit vyjadřují matrice a plniva. Funkcí matrice je sjednocování a úkolem plniv je obohacení o určité vlastnosti, v případě nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ se jedná o vlastnosti magnetické. [18]

1.2.1 Nanočástice

Pro účely SERS a SERRS již byla studována řada kovů, ovšem jako nejvhodnější byly označeny především kovy ušlechtilé a zvláště pak koloidní stříbro. Mezi širokou veřejností je nyní nanostříbro, i přispěvkem marketingu, proslulé jako antimikrobiální prostředek. Ovšem jako každá nanočástice, disponuje i stříbro určitými magnetickými, optickými a elektrickými vlastnostmi.

Pro SERS jsou podstatné hlavně optické vlastnosti nanočástic, kdy vlivem interakce koloidu s elektromagnetickým zářením dochází k jeho částečnému rozptylu. Prokazatelně se tak děje

vlivem velikosti částic, kterou lze přibližně odhadnout i pouhým okem. Vlivem povrchového plasmonu každá velikost nanočástic pohlcuje jinou vlnovou délku záření a tudíž se barevně odlišují. Elektrický náboj na povrchu částic ovlivňuje organizaci iontů v roztoku. Takovýmto uspořádáním je elektrická dvojvrstva. [5] [18]

Příprava nanočástic se může dít způsoby, jako je „top-down“, která rozrušuje větší látku na menší, např. mletím. Nebo druhý způsob, „bottom-up“, tato metoda konjuguje dohromady velmi malé částice, jako jsou molekuly. Existuje zástup dalších metod, přes přípravu pyrolýzou až po laserovou ablací. V případě této práce je využit způsob Tollensův. Podstatou je redukce stříbrných iontů vlivem maltosy či glukosy za účasti amoniaku. Předností je flexibilita velikosti nanočástic, která je závislá a koncentraci amoniaku. Zesílením požadovaných vlastností lze navíc docílit vytvořením nanokompozitu. [18]

Magnetické nanočástice, jak z názvu vyplývá, jedná se o částice s magnetickými schopnostmi. Využití nachází tam, kde působením vnějšího magnetického pole pomáhá odseparovat požadovanou látku. Bonusem je nedestruktivní manipulace, proto je možné užití pro citlivé biomolekuly. Magnetickou částicí je určitě oxid železnato-železitý, triviálně magnetit. Připravují se spolu srážením železnatých a železitých solí za účasti báze. [18]

1.3 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty je označením pro nádorový proces vycházející z buněk předstojné žlázy. Prostata je orgán přítomný pouze u mužů, jeho funkce je úzce spojená s rozmnožováním a pohlavním ústrojím. Prostatou prochází močová trubice z močového měchýře, její standardní velikost po dovršení věku 20. let činí 4 cm x 3,5 cm x 2 cm s hmotností 29 – 40 g. [19] Příčina vzniku tohoto onemocnění není doposud známa, riziko je podmíněno především genetickými vlivy, dietními zvyklostmi, faktory životního prostředí nebo viry. [1]

Pro zajímavost bylo za rok 2012 celosvětově zaznamenáno okolo 14 milionů nových případů všech druhů rakoviny, 32,6 milionů osob žijících a 8,2 milionů osob této nemoci podlehl [20]. Karcinom prostaty je jedním z nejčastěji diagnostikovaných druhů rakovin, přitom je také druhou nejčastější příčinou úmrtí mužů na nádorová onemocnění. Jen v ČR se incidence v celé v roce 2012 atakovala hranici 7000 případů. [20]

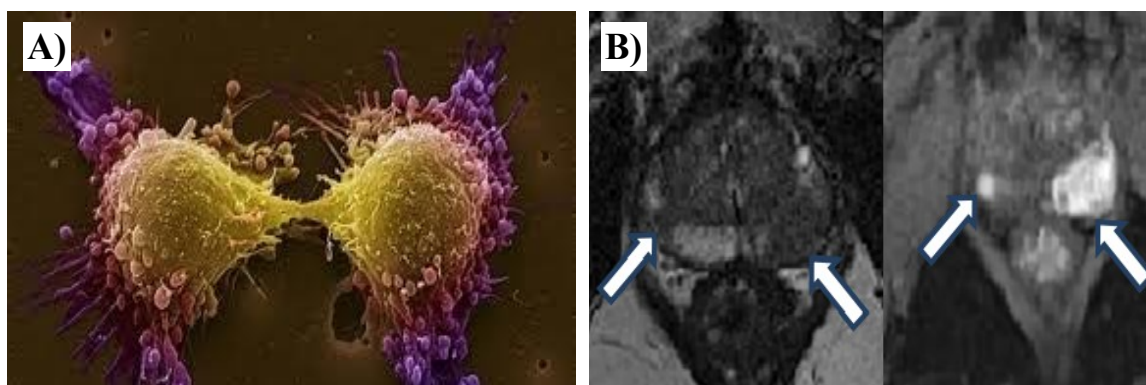
Pro normální ale také zhoubný vývoj prostaty jsou nezbytné hormony. Převážná většina adenokarcinomů je hormonálně dependentních. Na hormonální léčbu reaguje asi 80 %

pokročilých nádorů. Jedním z nejdůležitějších hormonů je testosteron a tvoří asi 95 % všech cirkulujících androgenů, tedy mužských steroidních hormonů. [19]

Rizika spojená s dědičností jsou u karcinomu prostaty úzce spjata s počtem postižených příbuzných. Muži s jedním postiženým měli dvojnásobné riziko, zatímco muži s dvěma až třemi měli riziko pětinasobné až jedenáctinasobné. Další rizikové faktory představují možný kontakt s kadmíem, rtutí, izotopy kobaltu, železa, chromu, zinku, radioaktivním materiálem, chlorovanými fenoxylowanými herbicidy nebo dioxiny a kouření. Riziko zřejmě představuje vyšší konzumace živočišného tuku, vápníku nebo naopak nedostatek selenu. Na druhé straně rizika jsou významně eliminována vyšší konzumací karotenoidu lykopenu obsaženého v rajčatech. [19][21]

V časně diagnostice se uplatňují tyto tři vyšetření, prvním je vyšetření per rectum, dále stanovení sérové hodnoty PSA a biopsie pod kontrolou transrektální ultrasonografie. První jmenované vyšetření může diagnostikovat karcinom ve 30 – 40 %. Prostata bývá zvětšená, hrbolatá, tužší až tvrdá a asymetrická. Spolu s hodnotou PSA jsou doposud nejlepšími pro předpověď onemocnění v nejrannější fázi. Potvrzení diagnózy umožňuje vyšetření řízené biopsie prostaty. Slouží ke zhodnocení morfologie prostaty a biopsie pro laboratorní potvrzení. Pro potvrzení diagnózy jsou indikovány další rozborů specifických markerů. [19]

Pokud je již karcinom prokázán, se pro upřesnění jeho rozsahu používají zobrazovací metody. Mezi nejvíce používané se řadí výpočetní tomografie (CT), scintigrafie skeletu (SPECT) a magnetická rezonance (MRI). Účelem těchto procedur je rozlišení lokalizovaného karcinomu od systémového postižení.



Obrázek 5. A) Dělení rakovinných buněk [22] B) Znáznornění karcinomu prostaty pomocí MRI [23]

Úspěšné vyléčení je možné, podmínkou ale je zachycení ve fázi na žlázu ohraničeného onemocnění. Tento stav se projevuje poruchami močení, což je známkou dráždění nebo

prorůstání nádoru do močových cest. Pokud se jedná o lokálně pokročilý nebo až metastazující karcinom, který se projevuje bolestí způsobenou kostními metastázami, parézou dolních končetin, nechutenstvím a celkovou slabostí, efektivita procedur selhává. [19]

1.3.1 Markery karcinomu prostaty

Biomarkery jsou neustále modifikovány tak, aby mohly být spolehlivě změřeny a vyhodnoceny jako ukazatel biologického či patologického procesu, a byly efektivní farmakologickou odezvou. A právě zde je velký potenciál pro PSMA.

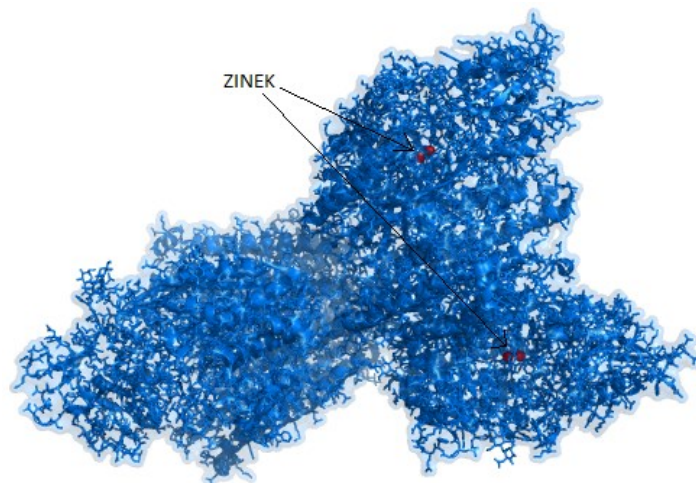
1.3.1.1 Prostatický specifický membránový antigen

PSMA¹⁶, jiným výrazem glutamát karboxypeptidáza II (GCPII), byl jako nádorový marker rozpoznán na konci 80. let minulého století.[24] Tento enzym lze v lidském organismu najít především v centrálním nervovém systému, prostatě a tenkém střevě.[25]

PSMA lze charakterizovat jako membránový glykoprotein, skládající se ze 750 aminokyselin o hmotnosti 90 – 120 kDa. Je to proteolytický enzym, který patří mezi metalopeptidázy. Enzymová aktivita závisí na aktivním místě, kde má tento protein vázané dva atomy zinku. [25] Seznámení se s bližší strukturou PSMA je důležité z důvodu následného vývoje inhibitorů, které jsou nezbytné pro nejen pro detekci, ale i léčbu. [26]

Experimentálně bylo prokázáno, že inhibování PSMA snižuje neurologické poškození při ischemickém postižení a může pomoci i při epileptických záchvatech. [27] Ve střevní sliznici se PSMA účastní štěpení polygamaglutamylovaného folátu za vzniku volné kyseliny listové. Souvislost mezi PSMA a karcinomem prostaty je pravděpodobně v tom, že podobně jako ve střevě, vzniká v prostatě za účasti PSMA kyselina listová, která je nezbytná pro syntézu DNA a tudíž potřebná pro nádorové bujení. [28] Vyšší riziko výskytu karcinomu prostaty bylo prokázáno i v souvislosti s obsahem vitamínu B₁₂ v krevním oběhu. [29]

¹⁶ zkr. z angl. *prostate specific membrane antigen*



Obrázek 6. Prostatický specifický membránový antigen, červené kuličky jsou atomy zinku; vlastní zpracování [26]

1.3.1.2 Ostatní markery

Nejvýznamnějším prognostickým markerem je již od osmdesátých let prostatický specifický antigen (PSA)¹⁷, jeho význam je obzvláště důležitý pro pacienty mezi 50. až 60. rokem života. [32]. Není přímým markerem, nýbrž pouze ukazatelem aktivity prostatické tkáně a spolehlivě nevypovídá o pozitivitě karcinomu, u některých modifikací není produkován vůbec. PSA je vylučován především epiteliálními buňkami prostaty. Jedná se o glykoprotein, jehož aktivita odpovídá serinové proteáze, o molekulové hmotnosti 33 kD. [19]

V séru se PSA vyskytuje v koncentracích ng/ml, kdy sekrece tohoto proteinu je silně ovlivněna androgeny. Je zde ve dvou formách, jako komplex nebo jako volný, kdy se pro laboratorní účely využívají oba. Zvýšená hodnota, tj. nad 4 ng/ml, je většinou výsledkem narušení buněčné celistvosti prostaty, jenž může být způsobena onemocněním, jako jsou benigní hyperplazie prostaty, prostatitidou, karcinomem nebo mechanickým narušením, např. po masáži nebo i biopsii. [19]

¹⁷ zkr. z angl. *prostate specific antigen*



Obrázek 7. Prostatický specifický antigen (PSA neboli KLK3) [30]

Faktorem zvyšování PSA je v dalším případě věk. Stárnutí je děj fyziologický, proto je pro snazší orientaci rizika vzniku karcinomu zavedena *věkově specifická střední hodnota PSA*. Je možno zmínit ještě pár dalších markerů, jako je antigen časného karcinomu prostatu se zkratkou EPAC, jehož výskyt je znám pouze v prostatě a jeho exprese stoupá u více než 95% karcinomů, je detekovatelný z močového sedimentu. Posledním zde zmíněným je marker používaný při detekci kancerogeneze. Slouží pro odlišení formy rakoviny lokální od metastatické, tzv. E-cadherin, což je protein jaderné matrix. [19]

2 Experimentální část

2.1 Instrumentace a materiály

Chemikálie

Na přípravu nanočástic stříbra využitím Tollensova způsobu bylo zapotřebí dusičnanu stříbrného (p. a., Sigma-Aldrich), amoniaku (p. a. vodný roztok, min 25% (v/v), Sigma-Aldrich), hydroxidu sodného (p. a., Lach-Ner) a funkci redukčního činidla plnila D (+) glukosa (Sigma Aldrich), případně D (+) maltosa monohydrát (Sigma Aldrich). Koloidní disperze se uchovávala při laboratorní teplotě 20°C.

Dále se během experimentu využívalo chloridu sodného (p. a., Penta), destilované vody a kyseliny chlorovodíkové (p.a. 35%, Penta)

Biologický materiál

Standard prostatického specifického membránového antigenu měl koncentraci 250 ng/ml, uchování při teplotě okolo -20°C. Reálné vzorky krve poskytla Lékařská fakulta a byly uchovány v rozmezí teplot od -70°C do -80°C.

Přístrojové vybavení a software

Analýza PSMA probíhala měřením spekter s využitím Ramanova spektroskopu DXR Raman (verze 8, Thermo Scientific, U.S.A.). Podmínky pro expozici vzorku byly nastavovány prostřednictvím softwaru „OMNIC For Dispersive Raman“, získaná spektra v něm byla následně i zpracována. Finální úpravy spekter probíhaly v programu Qtiplot (verze 0.9, Rumunsko). Nezbytnými byly pro experiment také analytické váhy KERN, ADT 220-5 DM a třepačka VORTEX IKA MS 3 Basic.



Obrázek 8. Fotografie používaného Ramanova spektroskopu [31]

2.2 Pracovní postupy

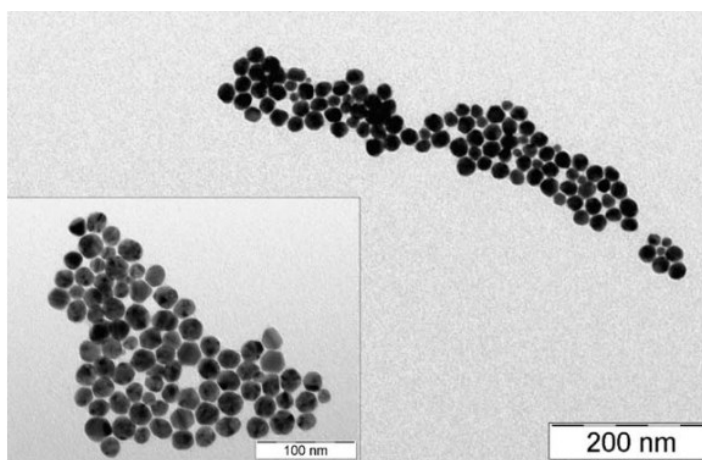
2.2.1 Příprava koloidního roztoku stříbra

Tollensova metoda, která byla na přípravu disperze nanostříbra využita, je založena na redukci amoniakálního komplexu stříbrných iontů prostřednictvím cukru, v tomto případě se jednalo o maltosu i glukosu.



Příprava probíhala následovně. Prvním krokem byla příprava 5 ml redukujícího cukrů (0,0856 gramů maltosu a 5 ml 0,05 mol/dm³ NaOH). V případě glukosy se postupovalo podobně (0,045g glukosy + 5 ml 0,05 mol/dm³).

Koloidní roztok o objemu 25 ml se připravoval smísením 5 ml AgNO₃ o koncentraci 5·10³ mol/dm³ s 14 ml destilované vody, dále s 1 ml NH₃ o koncentraci 0,25 mol/dm³. Výsledná disperze nanočástic stříbra byla zredukována v jednom případě 5 ml zásaditého roztoku maltosy, v druhém případě 5 ml zásaditého roztoku glukosy.



Obrázek 9. Velikost stříbrných nanočástic připravených redukcí D-maltosou činila 28nm, fotografie byla pořízena prostřednictvím transmisního elektronového mikroskopu [32]

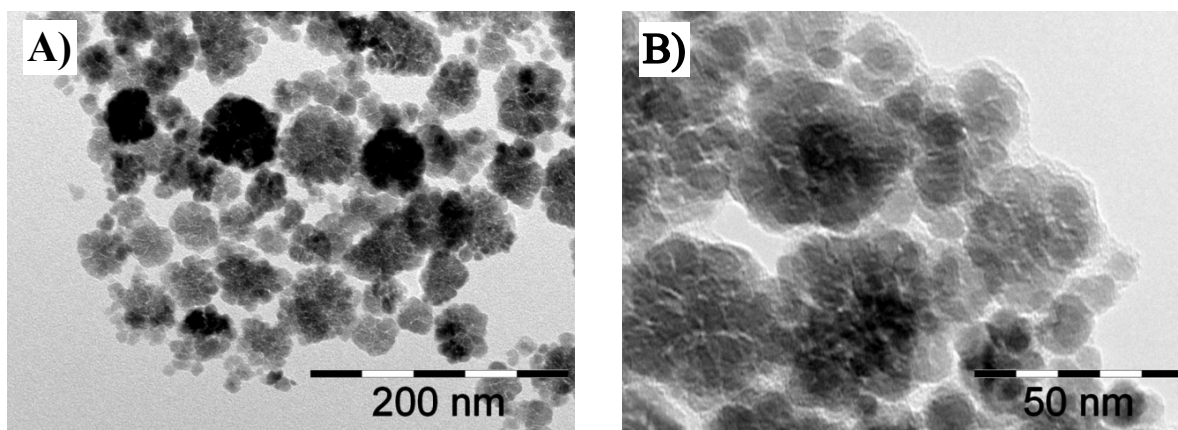
Vlastnosti těchto dvou koloidních disperzí nanočástic stříbra lze charakterizovat opalescentní žluto-hnědou barvou. Na základě měření metodou DLS¹⁸ je možné určit velikost částic, která

¹⁸ DLS – dynamický (kvazielastický) rozptyl světla; principem je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laseru okolo její průměrné hodnoty [35]

činila v případě koloidu s obsahem D-maltosy 28nm a za účasti D-glukosy 37 nm. Z hlediska SERS a požitého laseru (633 nm), je za všeobecně nejlepší rozměr považována velikost kolem 300 nm. To je také důvod, proč se těsně před měřením, přidává ke vzorku chlorid sodný. Ten v závislosti na své koncentraci způsobuje agregaci částic do požadovaných rozměrů. Mezi velikostí povrchu a stabilitou koloidu platí přímá úměra. Pro zvýšení stability koloidu se však vyžaduje nízká povrchová energie, čehož lze dosáhnout pomocí dostatečné energetické bariéry, aby ke spojování částic nedocházelo. [18]

2.2.2 Příprava stabilizovaných magnetických nanočástic

Modifikované magnetické nanočástice, které poskytla paní doktorka Medříková, byly připraveny na základě dříve publikovaného postupu Bakandritsosem a kol. [33] Magnetické nanočástice stabilizované karboxymethylcelulosou,¹⁹ jsou utvořeny za přítomnosti heptahydrátu síranu železnatého a karboxymethylcelulosy ve vodném prostředí. K takto připravené směsi se následně přidá 28% hydroxid amonný, směs se následně zahřeje na teplotu 50 °C.



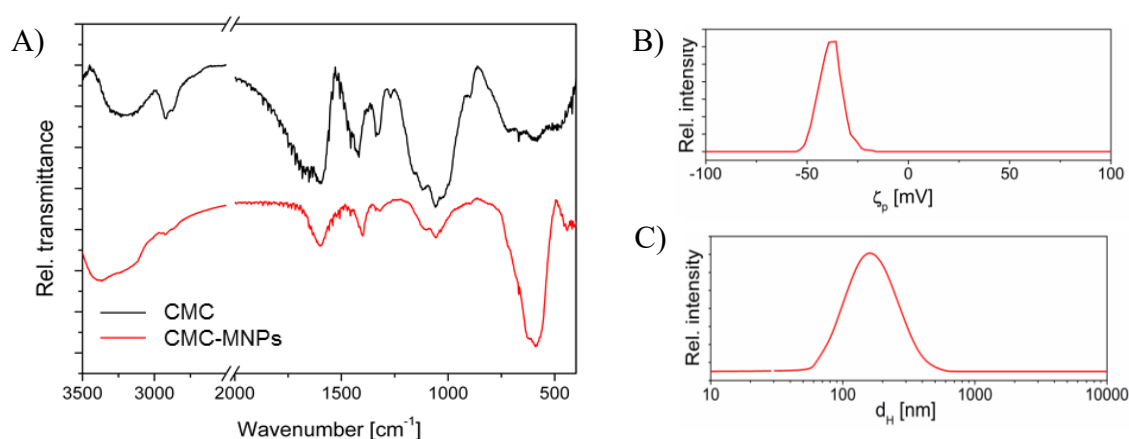
Obrázek 10. A) Velikost modifikovaných magnetických částic při měřítku 200 nm B) Velikost cMNPs při měřítku 50 nm

Pro docílení požadovaných vlastností bylo nutné vzít 75 μ l cMNPs, (s obsahem 250 μ g MNPs), k čemuž se přidalo 250 μ g ethylendichloridu, čímž se dosáhlo aktivace karboxylových skupin.

¹⁹ cMNPs – karboxymethylcelulosou stabilizované magnetické nanočástice

Po 10 minutách se přidalo 5 μg inhibitoru JB-303 (*inhibitor H₂N-PEG12-Lys-Urea-Glu*) a celkový objem byl upraven na 250 μl . Imobilizace inhibitoru byla provedena přes noc. K odstranění volného inhibitoru došlo promytím vodou a centrifugací.

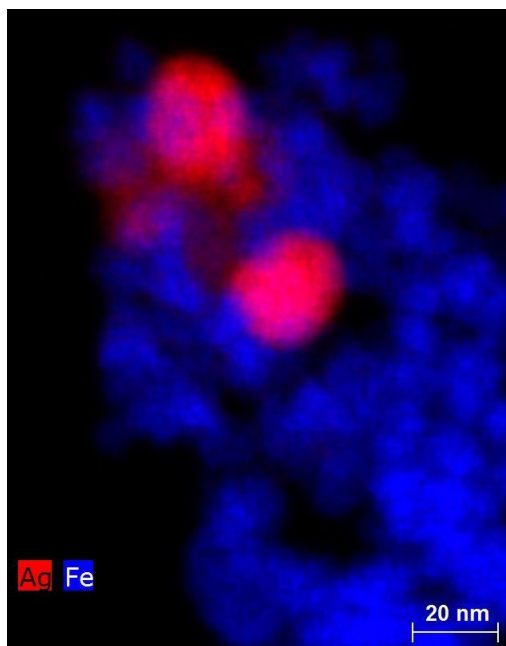
Z níže uvedených grafů (*Obrázek 11*) lze vyvodit charakteristiky připravených cMNPs. Tyto částice lze na základě zeta potenciálu, který představuje energetickou bariéru vycházející z odpudivé síly mezi částicemi a její překonání udržuje tyto částice pohromadě, definovat jako nestabilní. Za omezeně stabilní jsou považovány ty suspence, které mají zeta potenciál v rozsahu +30 až – 30 mV [34], u použitých cMNPs byl zeta potenciál naměřen právě v rozmezí –30 mV. Využitím metody DLS – dynamického rozptylu světla, byla velikost částic cMNPs suspenze stanovena na 200 nm (*Obrázek 6. C*). Stokes-Einsteinův vztah²⁰, který spojuje velikost částic a Brownův pohyb, je klíčem ke zjištění velikosti částic díky zjištění hydrodynamického průměru. [35]



Obrázek 11. A) Popisuje spektra získaná FT-IC²¹; spektrum karboxymethylcelulosity (černě); spektrum modifikovaných magnetických částic (červeně); B) Signál Zeta potenciálu cMNPs ; C) Signál DLS, hydrodynamický průměr cMNPs

²⁰ $D_h = Tk_B / 3\pi\eta D_i$; D_h je hydrodynamický průměr – velikost částic; D_i je translační difúzní koeficient a změří se DLS; k_B je Boltzmanova konstanta; T je termodynamická teplota; η je dynamická viskozita [35]

²¹ Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

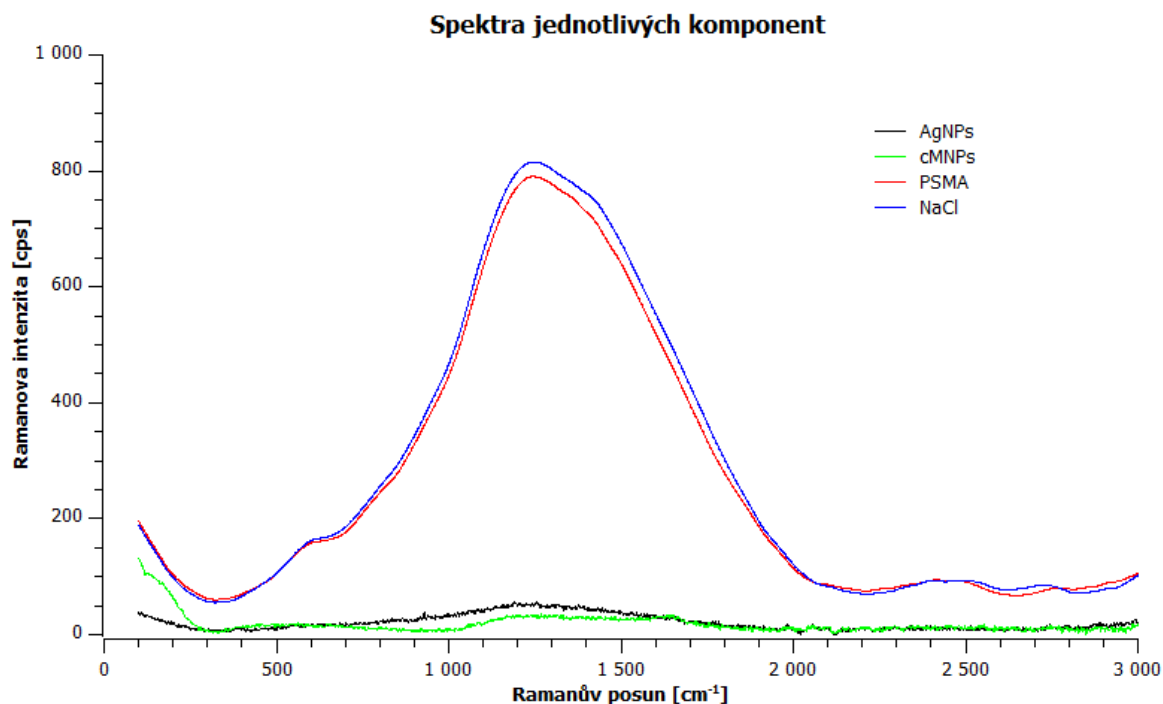


Obrázek 12. Fotografie užitých magnetických částic (modře); je zde vidět i červené zabarvení, což značí obsah stříbra

2.2.3 Postup při analýze vzorku

2.2.3.1 Optimalizace podmínek měření

Primárně bylo nutné ověřit, zda metoda bude fungovat, což se provádělo porovnáním spekter úplného vzorku se spektry dílčích komponent a pak sestavením kalibrační řady. Nanočástice stříbra (AgNPs), upravené magnetické částice (cMNPs s obsahem JB-303), roztok chloridu sodného a čistý vzorek PSMA jsou dílčí komponenty. Celkový, pro tento případ úplný vzorek má složení AgNPs + cMNPs + NaCl + PSMA. Proměřením jednotlivých látek odděleně, poskytují nanočástice stříbra, upravené magnetické částice, PSMA a chlorid sodný spektra zachycená na obrázku 13. Z těchto spekter je zřejmé, že informaci o kvalitativním i kvantitativním zastoupení prostatického specifického membránového antigenu může poskytovat pouze kompletní systém, nikoliv čisté magnetické či stříbrné nanočástice.

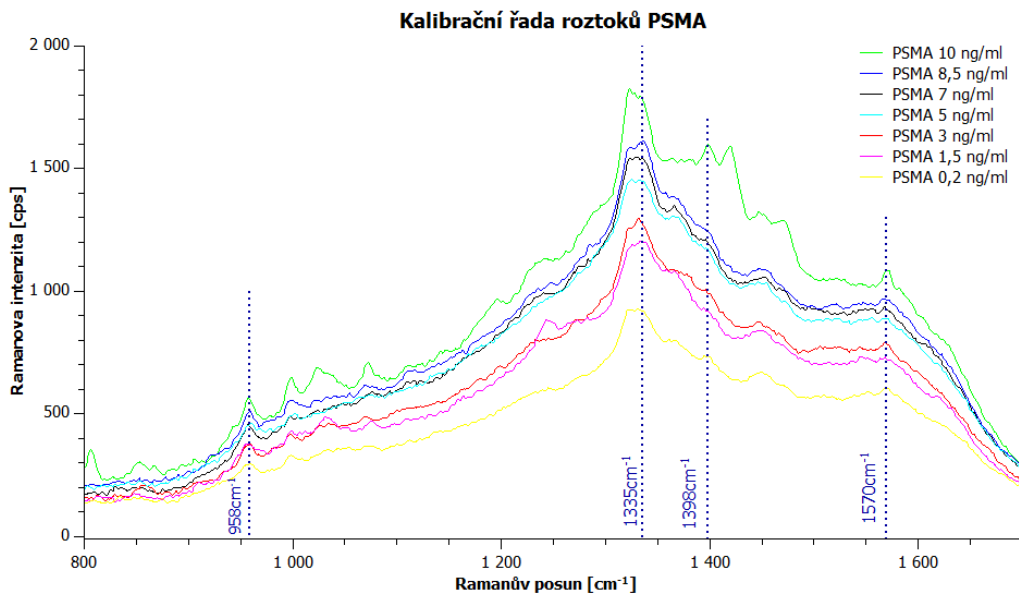


Obrázek 13. Znáznornění spekter získaných měřením jednotlivých složek celkového vzorku

Funkčnost metody vyplývá především již ze zmíněného vytvoření kalibrační řady, kde lze pozorovat rostoucí intenzitu signálu v závislosti na rostoucí koncentraci PSMA. Uskutečnění probíhá na modelových vzorcích. Druhou fází je aplikovat metodu na změření koncentrace PSMA v reálných vzorcích krve.

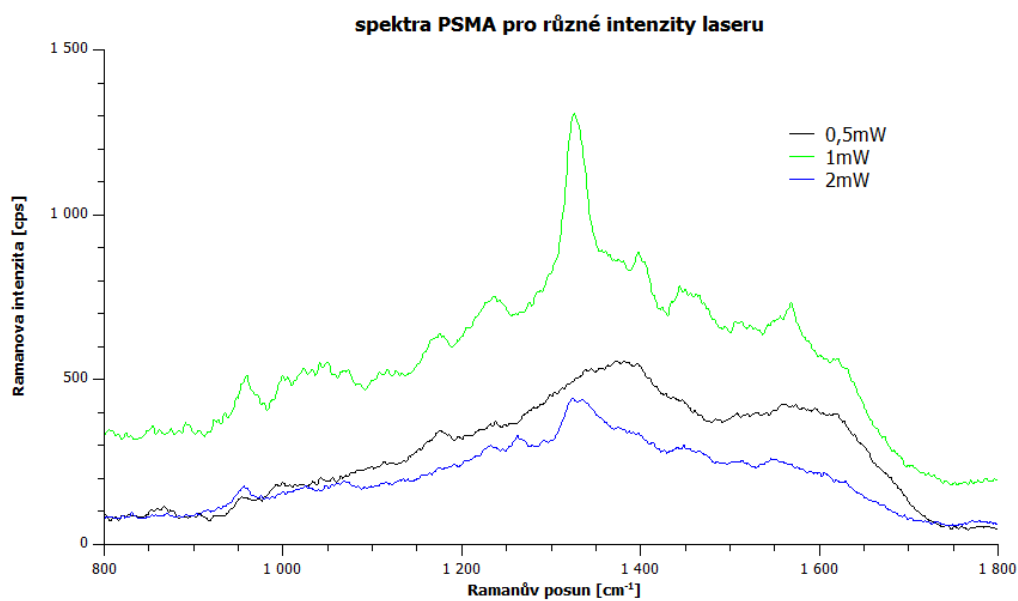
Spektra byla vyhodnocována pro spektrální pás 1335 cm^{-1} . Tento spektrální pás byl zvolen po srovnání relativních chyb změřených koncentrací i pro jiné spektrální pásy, jmenovitě 958 cm^{-1} , 1398 cm^{-1} a 1570 cm^{-1} . Koncentrace modelových vzorků, zjištěné na základě rovnic lineárních regresí, jsou pro jednotlivé vlnočty představeny s průměrnými relativními chybami ²² ($958\text{ cm}^{-1} \rightarrow 23\%$, $1335\text{ cm}^{-1} \rightarrow 7\%$, $1398\text{ cm}^{-1} \rightarrow 11\%$, $1570\text{ cm}^{-1} \rightarrow 10\%$). Ovšem určení spektrálního pásu 1335 cm^{-1} na základě nejnižší relativní chyby 7%, je diskutabilní. Ústřední je přiřazení těchto pásů jednotlivým funkčním skupinám a zjištěná relativní chyba je pak jen důsledkem tohoto správného určení. Pás 1335 cm^{-1} představuje Amid III (vazba C-N 40%, N-H 30 %). Pás 1570 cm^{-1} je pak charakteristický pro Amid II (vazba N-H 60%, C-N 40 %). [36]

²² relativní chyba – chyba vztážená ke skutečné (správné) hodnotě; uvádí se v procentech



Obrázek 14. Grafické zobrazení intenzity spekter pro vlnočty 958 , 1335 , 1398 a 1570 cm^{-1} v závislosti na rostoucí koncentraci roztoků PSMA, ovšem tyto vlnočty, kromě spektrálního pásu 1335 cm^{-1} , zřejmě s koncentrací prostatického specifického membránového antigenu nesouvisí

Vzorky byly vystaveny vlnové délce laseru 633 nm při výkonu 1 mW , ale byly zkoušeny také hodnoty $0,5 \text{ mW}$ a 2 mW . Jak je patrné z obrázku 15 při 2 mW byl vzorek zřejmě pálen, naopak $0,5 \text{ mW}$ nebylo dostatečné, nejlepší signál byl tedy získán při 1 mW .



Obrázek 15. Grafické zobrazení intenzity spekter vzhledem k různé intenzitě laseru; měřeno pro výkon $0,5 \text{ mW}$, 1 mW a 2 mW

2.2.3.2 Zjišťování koncentrace PSMA v modelových vzorcích

Zásobní roztok PSMA o koncentraci 250 ng/ml byl ředěn na koncentrace pro sestavení kalibrační řady, přičemž se jednotlivé položky připravovaly do 1 ml eppendorfek. Následně bylo od každé koncentrace PSMA odebráno 10 μ l a k tomuto objemu se přidalo 10 μ l magnetických částic. Následovalo desetiminutové promísání složek na třepačce při přibližně 2000 otáčkách za minutu. Následně se využitím magnetického pole (pomocí magnetu) odseparovaly přebývající magnetické částice do spodního úseku eppendorfky a přidalo se navíc 20 μ l destilované vody.

Protože roztok PSMA by po tomto procesu výsledek o své přítomnosti neposkytl, bylo nutno ještě před samotným měřením provést tento postup: na podložní sklo se nanese 10 μ l koloidní disperze, k ní 2 μ l PSMA a na závěr se přidala 2 μ l kapka NaCl. Celkové množství se pro kvalitní splnutí promísilo opakovaným nasátím a vypuštěním svého obsahu prostřednictvím mechanické pipety. Nato se ke kapce na sklíčku přiložil magnet, výsledkem byl vytvořený půlměsíc na jejím okraji. V tomto tzv. půlměsíci byl zaznamenán největší obsah proteinu, tedy PSMA. Celý postup je koncipován tak, aby bylo co nejvíce proteinu PSMA vycytáno a změřeno.

2.2.3.3 Zjišťování koncentrace PSMA v reálném vzorku

V případě měření reálného vzorku je oproti stanovování koncentrace modelových vzorků několik změn. První se vyskytuje hned ze začátku, kdy místo zásobního roztoku čistého PSMA je k dispozici lidská krev s neznámým obsahem PSMA. Jeho spolehlivé zjištění je tedy bez regresní rovnice nemyslitelné. Pro minimalizaci matricových efektů bylo pro analýzu reálného vzorku využito metody standartního přídatku. Ze zředěného vzorku krve (10 μ l krev s 190 μ l vody) bylo odebráno 10 μ l a smícháno s 10 μ l magnetických částic, následovalo dvacetiminutové protřepání při 2000 otáček/min. Působením magnetického pole byla na dně eppendorfky opět viditelná tmavá skvrna. Odebráním okolní tekutiny a opětovným přidáním destilované vody, byl již vzorek připraven pro orientační zjištění své koncentrace. Důležitou poznámkou je, že před vložením vzorku pod mikroskop se vždy ještě upraví na podložním skle (10 μ l koloidní disperze + 2 μ l PSMA + 2 μ l NaCl). Odečtením výšky píku pro 1335 cm^{-1} ze změřeného spektra se odhadlo, že pík o výšce 633 orientačně náleží koncentraci 2,5 ng/ml. Od této koncentrace se odvíjela kalibrační řada o standartních přídatkových koncentracích 5 ng/ml,

10 ng/ml a 20 ng/ml roztoku PSMA.

Rozdíl v samotné přípravě vzorku, pro měření metodou standartního přidavku, spočíval v přidavku 10 μ l zředěné krve k již známému obsahu, tj. k 10 μ l standardu s 10 μ l cMNPs. Nadcházející proces je pak stejný jako u modelových vzorků, čili na podložní sklo se nanoslo 10 μ l koloidní disperze, k ní 2 μ l PSMA a 2 μ l kapka NaCl. Působením magnetického pole se sledovaný protein shromáždil do menšího prostoru, a pomocí Ramanova zesílení detekován.

2.2.4 Zjišťování dalších aspektů metody

Protože se bere v potaz i možnost využití v klinické praxi, byla zjišťována opakovatelnost, stabilita a do jisté míry i reprodukovatelnost metody, zastoupenou změnou pH a změnou intenzity laseru.

Opakovatelnost je definována jako „preciznost měření za souboru podmínek opakovatelnosti měření“ [37]. Je prováděna v co možná nejméně odlišných podmínkách. Identický by měl být personál, postup, instrumentace a vše, co má nějakou spjitost s provedením experimentu a může jeho výsledky ovlivnit. Reprezentativní koncentrace 0,025 ng/ml byla namíchána 6x, s tím, že všech šest vzorků bylo Ramanovou spektroskopií změřeno do půl hodiny.

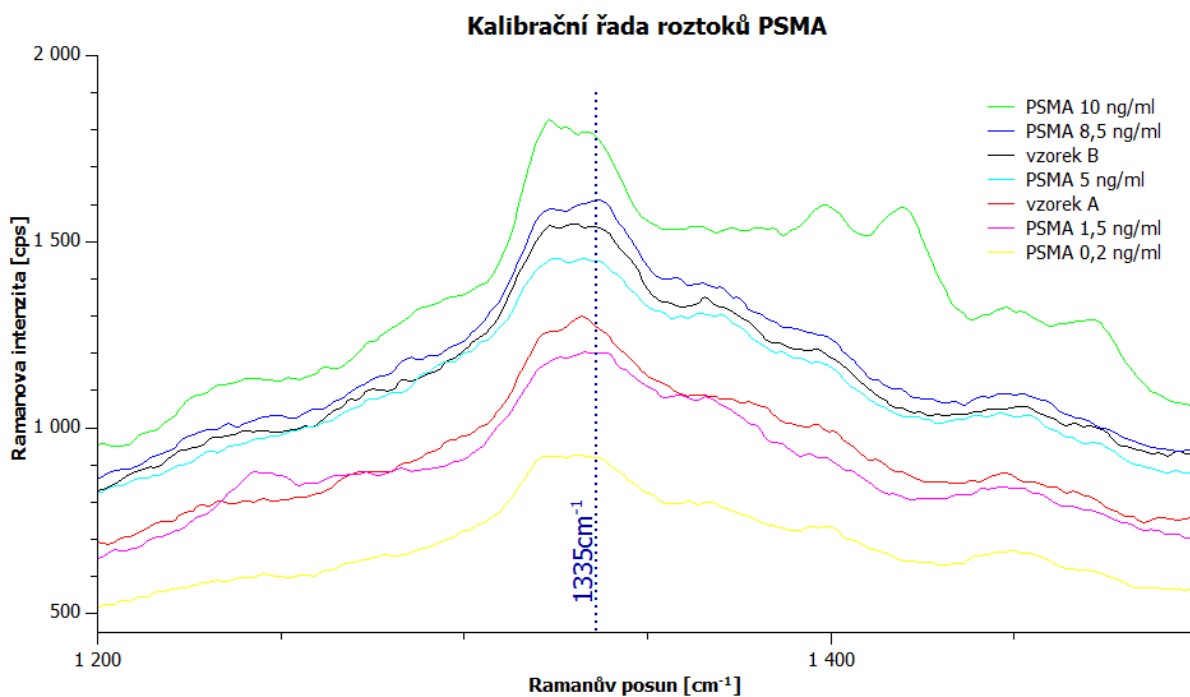
Stabilita se v tomto případě realizovala měřením v průběhu 43 dnů, taktéž pro koncentraci 0,025 ng/ml. Faktor stability je důležitý z důvodu, aby bylo možné podle výšky píku posuzovat degradaci vzorku. Kromě časové odstupnosti od jednotlivých měření, nebyly nutné žádné další speciální požadavky. Vzorek byl vždy upraven stejně jako v případě při zjišťování koncentrace.

Další informace o metodě je možné získat zastoupením souboru hodnot ze **změny pH**. Proces nejprve spočíval v přidávání kyseliny chlorovodíkové k roztoku PSMA, dokud nebylo dosaženo fyziologického prostředí o pH okolo 6. Zjišťování pH bylo původně plánováno pomocí pH metru, ale kvůli omezeným rozměrům se uchýlilo k pH papírkům. Používaný postup byl následující, 10 μ l čistého roztoku PSMA se nechalo deset minut třepat s 10 μ l cMNPs. Následně se po působení magnetického pole přidalo 20 μ l H₂O. Z takto připraveného vzorku se odebraly 2 μ l, k těm se přidalo 10 μ l koloidu a 2 μ l NaCl. Příspěvkem určitého množství kyseliny chlorovodíkové se mělo původní pH snížit na pH 6. Koncentraci HCl potřebnou pro jednorázové snížení pH bylo nutno také zjistit. Ramanovou spektroskopií bylo změřeno spektrum před a po přidavku HCl.

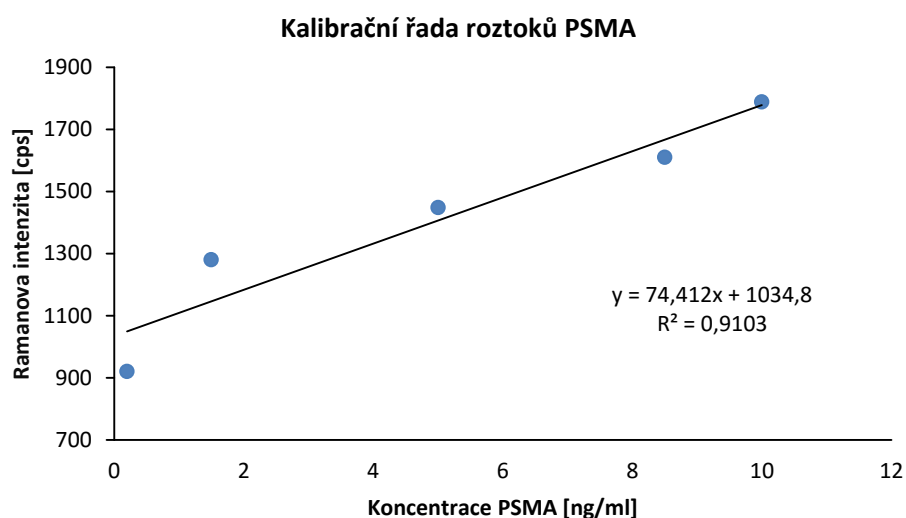
3 Výsledky

3.1 Stanovení koncentrace modelových vzorků

Vzorky se vyhodnocovaly na základě kalibrace. Než bylo docíleno spolehlivých výsledků, byla naměřena spektra, která sloužila spíše pro procvičení. Jednalo se o spektra především z počátku měření, kdy koeficient determinace (R^2) u kalibračních řad mnohdy nepřesahoval 0,70. Ovšem mezi spolehlivá měření se řadí zjištění koncentrace u dvou modelových vzorků PSMA. Koncentrace těchto vzorků byla, na základě rovnice lineární regrese $y = 74,412x + 1034,8$, stanovena na 6,8 ng/ml a 3,31 ng/ml s průměrnou relativní chybou 7%, demonstrováné výsledky byly získány a základě výšky spektrálního pásu 1335 cm^{-1} (Amid II).



Obrázek 16. Znárodnění naměřených spekter pro kalibrační řadu standardů včetně dvou zjišťovaných vzorků; koncentrace roztoků PSMA byly 0,2_1,5_5_8,5_10 ng/ml, vyhodnocení pro spektrální pás 1335 cm^{-1}



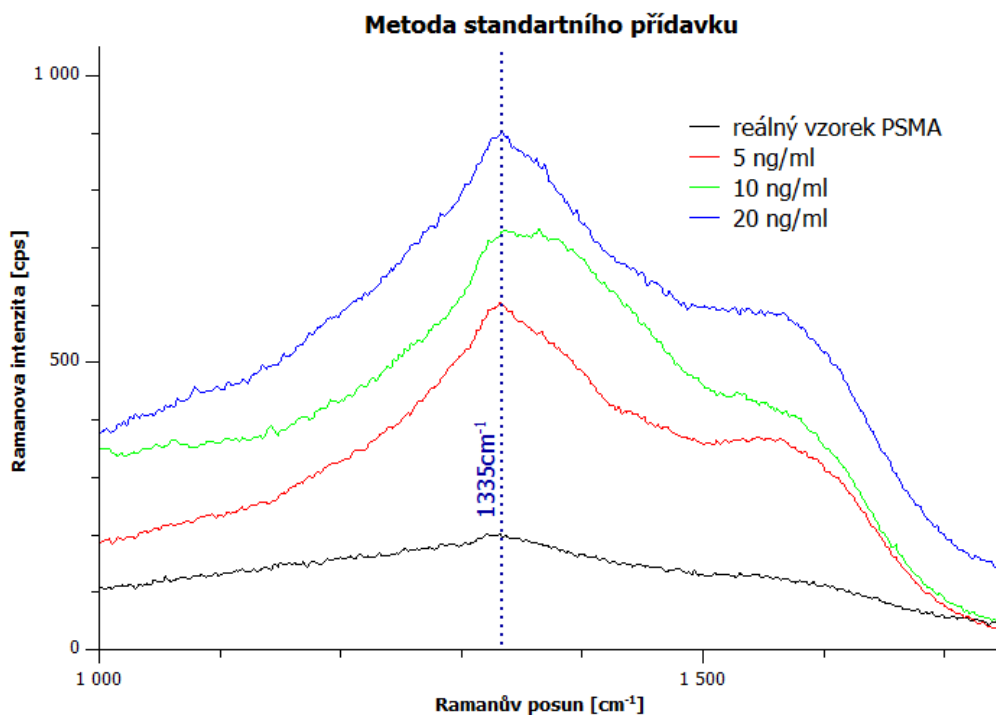
Obrázek 17. Zobrazení kalibrační přímky pro spektrální pás 1335 cm^{-1} , včetně regresní rovnice a koeficientu determinace

3.2 Stanovení koncentrace reálného vzorku

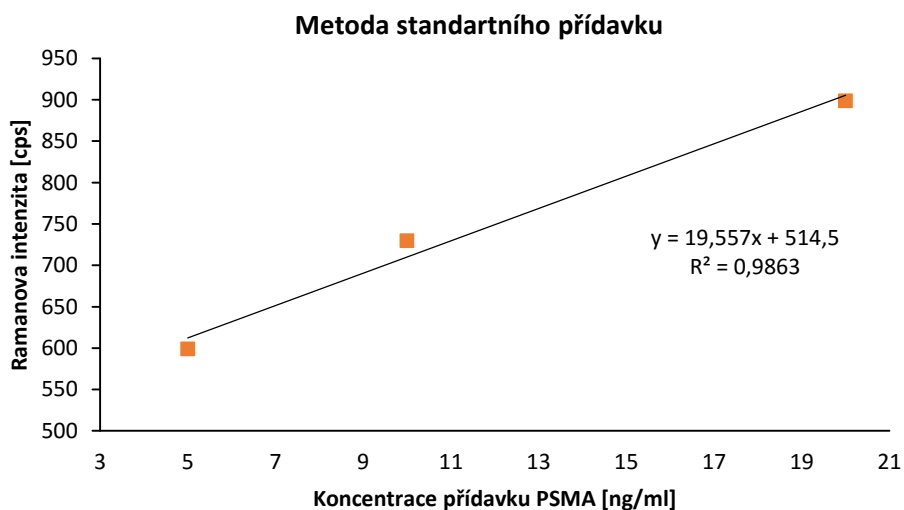
Změřením koncentrace reálného PSMA, ze vzorku krve pacienta z FN Olomouc metodou standartního přídávku (Obrázek 18.), tuto práci završovalo. Po doplnění intenzity spektrálního pásu 1335 cm^{-1} do rovnice standartního přídávku, která vychází z rovnice lineární regrese ($y = 19,557x + 14,5$; Obrázek 19.) vyšla koncentrace $10,1\text{ ng/ml}$. Ve skutečnosti činila $10,3\text{ ng/ml}$, z čehož vyplývá, že přesnost měření odpovídala 98 procentům (Tabulka 1.). Skutečná hodnota koncentrace PSMA byla opět stanovena na základě metody standartního přídávku se stejným postupem, avšak nebyla prozatím validována. Nejedná se tedy o skutečnou hodnotu, ale spíše o hodnotu referenční.

Ramanův posun [cm^{-1}]	Ramanova intenzita [cps] reálného vzorku	rovnice standartního přídávku	zjištěná c [ng/ml]	referenční c [ng/ml]	relativní chyba
1335	197	$c = 1/19,557 \cdot 197$	10,1	10,3	2%

Tabulka 1. Zobrazení naměřených hodnot pro výpočet koncentrace reálného vzorku PSMA z lidské krve metodou standartního přídávku pro spektrální pás 1335 cm^{-1} ; relativní chyba naměřené koncentrace dosáhla 2 %



Obrázek 18. Znáznornění naměřených spekter u metody standartního přidavku včetně zjišťovaného vzorku (černě); přerušovaná vertikála značí spektrální pás 1335 cm^{-1}

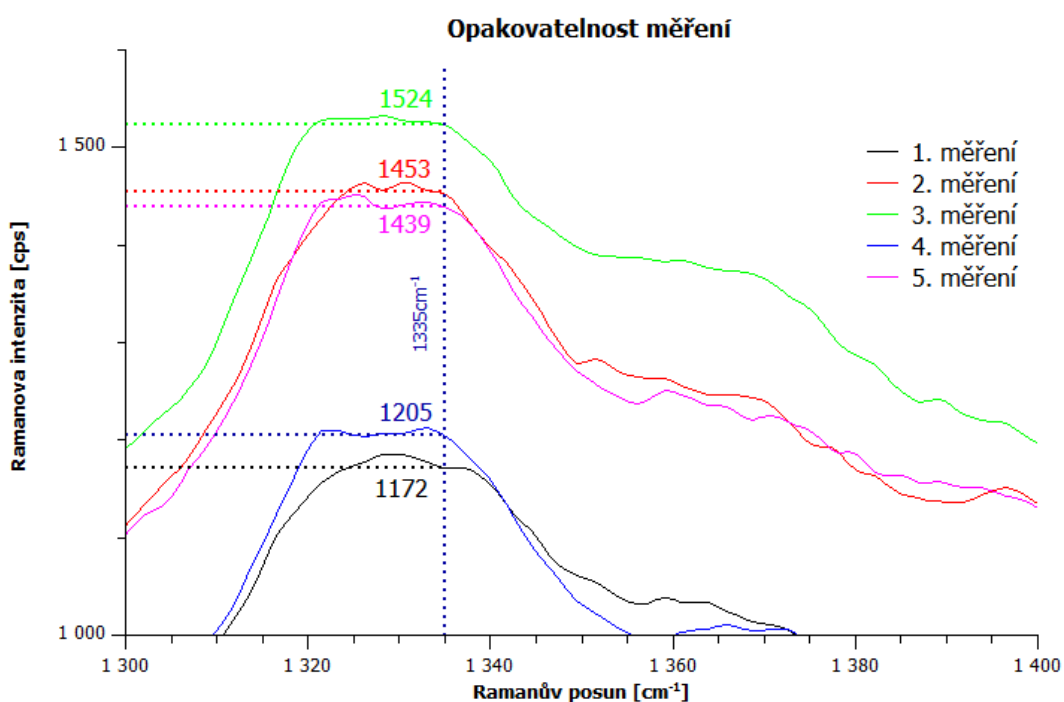


Obrázek 19. Znáznornění kalibrační přímky u metody standartního přidavku a vyhodnocení pro spektrální pás 1335 cm^{-1}

3.3 Další aspekty metody

3.3.1 Opakovatelnost měření

Jak precizní bylo měření pro koncentraci 0,025 ng/ml, lze vyčíst z grafu (Obrázek 20.). Pro vlnočetu 1335 cm⁻¹ bylo vyhodnoceno 5 stejných vzorků. Každý z těchto vzorků byl změřen pětkrát, celkem bylo tedy získáno 25 spekter, z nichž bylo vybráno pouze 5 od každého vzorku. Opakovatelnost měření byla následně vyhodnocena prostřednictvím variačního koeficientu²³, jehož hodnota činila 10,47%.

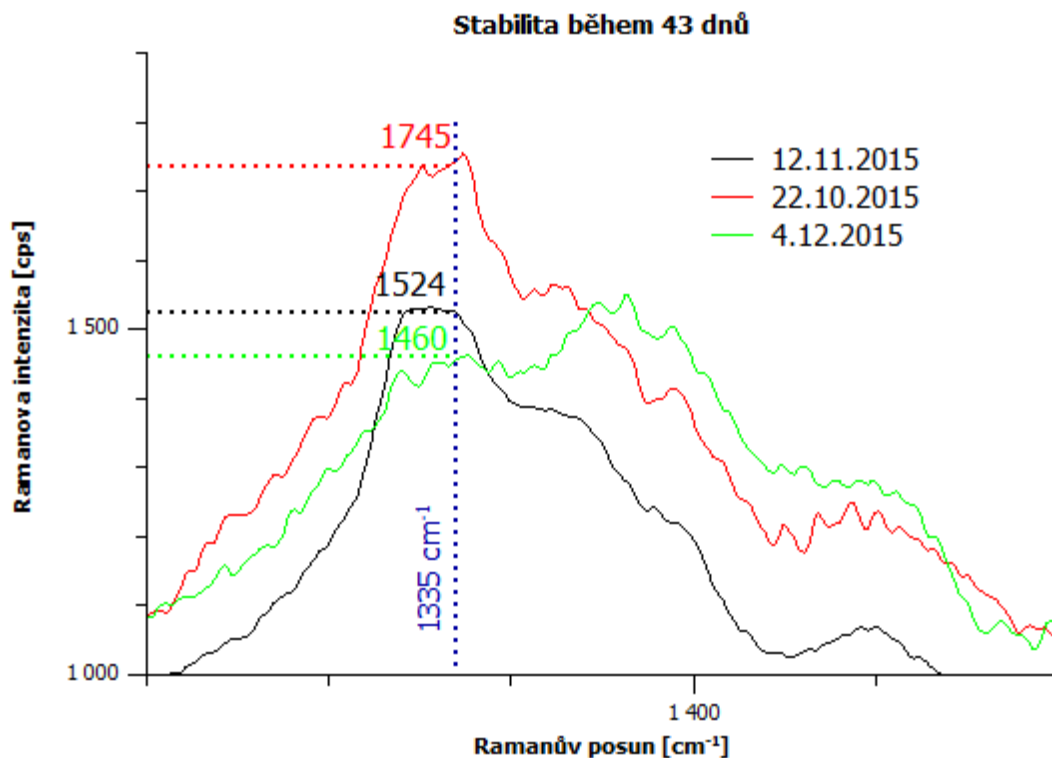


Obrázek 20. Grafické zobrazení opakovatelnosti měření; pro spektrální pás 1335 cm⁻¹ bylo dosaženo intenzit 1172, 1205, 1439, 1453 a 1524, celkově s variačním koeficientem 10,47%

3.3.2 Stabilita měření

Na základě měření, které se uskutečnilo v průběhu 43 dnů, celkem třikrát, lze posoudit stabilitu vzorku, také pro 1335 cm⁻¹ (Obrázek 21.). Po prvních 21 dnech (22/10 - 12/11/2015) klesla intenzita signálu o 13 %, O dalších 22 dnů později (12/11 - 4/12/2015) se intenzita snížila o 3 %, celkově pak klesla o 16 %.

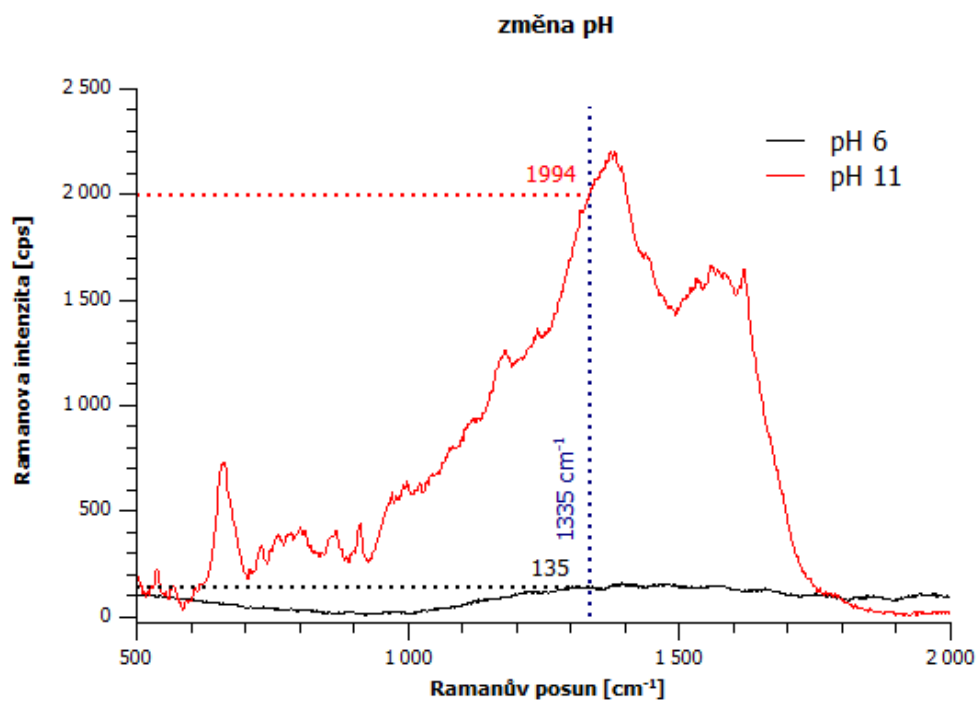
²³ Variační koeficient $v_x = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{průměr}} \cdot 100\%$



Obrázek 21. Grafické zobrazení intenzity signálu vzorku během 43 dnů; červeně je znázorněno spektrum ze dne 22.10.2015 s intenzitou signálu 1745; černé spektrum znázorňuje 13% pokles intenzity po 21 dnech; zelené spektrum s intenzitou nižší o další 3%; celkově se intenzita signálu snížila o 16%

3.3.3 Změna pH

Zjištění orientačního pH, pomocí lakmusového papírku, bylo pro samotnou koloidní disperzi rovno 8. Vzorek o složení 10 μ l koloidu s 2 μ l vzorku s obsahem cMNPs a 2 μ l NaCl, měl před přidáním kyseliny chlorovodíkové pH 11. Aby měl vzorek pH 6 bylo zapotřebí dodat 2 μ l 0,09 % HCl. Po přidání intenzita klesla z hodnoty 1994 na 135, tj. o 93% (Obrázek 22).



Obrázek 22. Grafické zobrazení intenzity signálu vzhledem k pH; po přidavku 2 μ l 0,09% HCl klesla intenzita signálu o 93%

Závěr

Jako mnoho jiných metod sloužících pro detekci biologických ukazatelů, měla by i metoda MA-SERS spolehlivě stanovit obsah žádaného proteinu, v tomto případě PSMA. Cílem práce bylo tento fakt změřit a posoudit. Práci bylo nutno vymezit do několika hlavních sekcí. Prvním úkolem bylo zjistit, který pík poskytuje spolehlivou informaci o přítomnosti PSMA a došlo se k závěru, že reprezentativním je pík o vlnočtu 1335 cm^{-1} . Výběr hodnoty 1335 cm^{-1} byl uskutečněn na základě dat z proměření kalibračních koncentrací, konkrétně vzhledem ke své nejnižší průměrné relativní chybě (7%), ale i zřetelnosti signálu. Jak už bylo nastíněno, prostřednictvím rovnice lineární regrese, byla zjištěna koncentrace dvou neznámých vzorků, což poskytovalo známku toho, že metoda je funkční. Po tomto kroku se tedy přešlo ke zjišťování koncentrace prostatického specifického membránového antigenu z lidské krve. Vzorky krve od pacientů z FN Olomouc byly testovány metodou standartního přídávku. Z vyhodnocení plyne, že koncentrace proteinu byla stanovena na $10,1\text{ ng/ml}$, referenční hodnota se rovnala $10,3\text{ ng/ml}$, což tedy odpovídá relativní chybě 2%.

V průběhu však byly zjišťovány i další aspekty, jako například nastavení vhodného výkonu laseru pro měření, ale i opakovatelnost, stabilita a změna intenzity signálu při rozdílném pH. Opakovatelnost vypovídá o tom, jak moc se od sebe jednotlivá měření při nejlépe totožných podmínkách odlišují. Zhodnoceno variačním koeficientem, opakovatelnost metody v tomto případě odpovídá 10,47%. Měření stability, která sledovala, jak moc vzorek degraduje při svém opakovaném používání v období 43 dnů, by se dalo vyjádřit zhoršením signálu vzorku o 16 %.

Na snížení pH vzorku z 11 na pH 6 se projevilo, že zásadité pH ovlivňuje proces detekce k lepšímu, jelikož po přidání kyseliny intenzita signálu strmě klesla. Velmi důležitou položkou jsou i cMNPs – modifikované magnetické nanočástice s přítomností inhibitoru JB-303, bez jejichž specifické modifikace by detekce PSMA probíhala s těží.

V této práci byla představena metoda, která je schopna detekovat i tak malá množství, jako jsou setiny nanogramů, má potenciální využití nejen v medicíně, ale i v dalších oblastech, kde se pracuje s nízkými koncentracemi. Podstatou je najít vhodnou úpravu, jako byl v tomto případě inhibitor JB-303 navázaný na cMNPs, který požadovanou látku vyselektuje a zbytek je otázkou adaptací k dosažení intenzivního signálu, což není vůbec snadné.

Summary

Like many other methods serving for the detection of biological indicators, should be the method of MA-SERS reliably to determine the content of the PSMA protein. The main focus of this work was to measure and assess the concentration of PSMA. Work has to be defined in several major sections. The first task was to determine which peak provides correct information about the presence of PSMA. It was concluded that the representative peak has the wavenumber 1335 cm^{-1} . All values for 1335 cm^{-1} was based on the data of measurement of the calibration concentration, specifically due to their low average relative error (7%), but also the clarity of the signal. As already outlined, through the equation of linear regression was observed concentrations of the two unknown samples, which gave indication that the method is working. After this step is therefore passed to detect the concentration of prostate specific membrane antigen from human blood. Blood samples, from patients of University Hospital, were tested using standard addition. The evaluation shows that the protein concentration was determined to 10.1 ng/ml , benchmark was equal to 10.3 ng/ml . It corresponds to a relative error of 2%.

However, they were investigated other aspects, such as setting suitable for laser power measurement as well as repeatability, stability and change in signal intensity according to different pH. Repeatability tells, how much are the conditions of measurement differ. Assessed the variation coefficient, repeatable methods in this case corresponds to 10.47%. Measurement stability, who watched as much sample is degraded during its repeated use during the 43 days, it could express deterioration of the signal sample by 16%.

On the reducing of the pH of the sample from 11 to pH 6 is resulted, that alkaline pH influences the detection process for the better. Because after addition of acid, the signal intensity decreased steeply. A very important item are also cMNPs (modified magnetic nanoparticles) with presence of the inhibitor JB-303. Without this specific modification, the detection of PSMA would worked very hardly.

In this work was introduced method, which can detect even such small quantities as hundredths nanograms. It has potential use in medicine, not only, but also in other areas, which works with low concentrations. The principle is to find a suitable adjustment, like in this case inhibitor JB-303 bound to cMNPs, which is able to selected required substance. The rest is a question of adaptation to achieve intense signal, but is not easy.

Reference

- [1] WATSON, J. D. *Molekulární biologie genu*. 3. vydání. Academia Praha, 1982. ISBN 14.225/76-31.
- [2] NOVOTNÁ, R., T. ŠILHA a Z. TRÁVNÍČEK. *Spektrální metody studia biologických látek*, 2011. [online]. Olomouc: UPOL [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: http://agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Spektralni_metody.pdf
- [3] WANG, Y. a Y. NI. Combination of UV–Vis spectroscopy and chemometrics to understand protein–nanomaterial conjugate: A case study on human serum albumin and gold nanoparticles. *Talanta* [online]. 2014, roč. 119, s. 320–330. ISSN 00399140.
- [4] De VRIES, E., F. ERDMANN a C. ESPINA. Ultraviolet radiation and cancer. 4. vydání. *European Code against Cancer*. [online]. 2015, s. 75–83. Dostupné z: doi:10.1016/j.canep.2014.12.014
- [5] LARKIN, P. *Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier, 2011. ISBN 9780123869845.
- [6] KANIA, P. *Infračervená spektrometrie* [online]. Praha: VŠCHT. [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf>.
- [7] MATĚJKA, P. *Metody spektrální* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/matejka/2012-ACH1-10-spektra-molekuly-vibrace.pdf>.
- [8] KOPLÍK, R. *Infračervená spektrometrie* [online]. Praha: VŠCHT. [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/~koplíkr/IR_4.pdf.
- [9] ŠAŠIČ, S. *Pharmaceutical Applications of Raman spectroscopy*. Wiley, 2005. ISBN 0471478148.
- [10] KUMAR, C. S. S. R. *Raman spectroscopy for nanomaterials characterization*. Springer, 2012. ISBN 9783642206207.
- [11] SMITH, E. a G. DENT. *Modern Raman Spectroscopy- A practical Approach*. Wiley, 2005. ISBN 0471496685.

- [12] STILES, P., J. DIERINGER, N.C. SHAH a R.P. VAN DUYNÉ. *Surface-enhanced Raman spectroscopy*. Wiley, 2008. ISBN 9783527407736.
- [13] BALZEROVA, A., A. FARGASOVA, Z. MARKOVA, V. RANC a R. ZBORIL. Magnetically-Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS) for Label-Free Determination of Human Immunoglobulin G (IgG) in Blood Using Fe₃O₄@Ag Nanocomposite. *Analytical Chemistry*. 2014, roč. 86, č. 22, s. 11107–11114. ISSN 0003-2700.
- [14] KUFA, R. Indocyaninová zeleň – vlastnosti, současné možnosti a trendy využití v klinických aplikacích. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2013, roč. 27, s. 89-91.
- [15] KUO, W. S., Y. T. CHANG, K. C. CHO, K. C. CHIU, C. H. LIEN, C. S. YEH a S. J. CHEN. Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*. 2012, roč. 33, č. 11, s. 3270–3278. ISSN 01429612.
- [16] Nanočástice možná v budoucnosti poslouží i k léčbě rakoviny. *E15.cz* [online]. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/denni-zpravy/profesni-aktuality/nanocastice-mozna-v-budoucnosti-poslouzi-i-k-lecbe-rakoviny-467852>
- [17] LAWAL, A. T. Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors. *Materials Research Bulletin*. 2016, roč. 73, s. 308–350. ISSN 00255408.
- [18] KVÍTEK, L. a A. PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. 1. vydání. UPOL, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [19] KAWACIUK, Ivan. *Urologie*. 1. vydání. Galén Praha, 2009. ISBN 978-80-7262-6277.
- [20] Léčba obtíží souvisejících se zvětšenou prostatou. *ČUS.CZ: Czech urological society* [online]. [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <http://www.cus.cz/pro-pacienty/diagnozy/lecba-obtizi-souvisejicich-se-zvetsenou-prostatou/>
- [21] ILIC, D. a M. MISSO. Lycopene for the prevention and treatment of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: A systematic review. *Maturitas*. 2012, roč. 72, č. 4, s. 269–276. ISSN 03785122.

- [22] Nádory prostaty. *UroKlinikum* [online]. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://www.uroklinikum.cz/ndory-prostaty-3126/>
- [23] SIMMONS, L., H. U. AHMED, C. M. MOORE, S. PUNWANI, A. FREEMAN, Y. HU, D. BARRATT, S. C. CHARMAN, J. VAN DER MEULEN a M. EMBERTON. The PICTURE study - prostate imaging compared to transperineal ultrasound guided biopsy for significant prostate cancer risk evaluation. *Contemporary Clinical Trials*. 2014, roč. 37, č. 1, s. 69–83. ISSN 15517144.
- [24] BARINKA, C., C. ROJAS, B. SLUSHER a M. POMPER. Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer. *Current Medicinal Chemistry*. 2012, roč. 19, č. 6, s. 856–870. ISSN 09298673.
- [25] VIK, V., P. ŠÁCHA, F. KOUKOLÍK, J. KONVALINKA, D. PACÍK a R. ZACHOVAL. Co nového víme o PSMA (prostatický specifický membránový antigen): Z pohledu urologa. *Urol List* [online]. 2007, roč. 5, č. 4, s. 10-13 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=ul_07_04_03.pdf.
- [26] 1Z8L. Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase. *RCSB PDB: Protein data bank* [online]. [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1z8l>
- [27] VOORZANGER-ROUSSELOT, N. a P. GARNERO. Biochemical markers in oncology. Part I: Molecular basis. Part II: Clinical uses. *Cancer Treatment Reviews*. 2007, roč. 33, č. 3, s. 230–283. ISSN 03057372.
- [28] YAO, V., C. E. BERKMAN, J. K. CHOI, D. S. O'KEEFE a D. J. BACICH. Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid. *The Prostate*. 2009, č. 5, s. n/a–n/a. ISSN 02704137.
- [29] PRICE, A. J., et al. Circulating Folate and Vitamin B12 and Risk of Prostate Cancer: A Collaborative Analysis of Individual Participant Data from Six Cohorts Including 6875 Cases and 8104 Controls. *European Urology*. 2016, s. 1–11. ISSN 03022838.
- [30] 2ZCK: Crystal structure of a ternary complex between PSA, a substrat-acyl intermediate and an activating antibody. *RCSB PDB: Protein data bank* [online]. [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2ZCK>

- [31] DXR™ 2 Raman Microscope. *Thermo Scientific* [online]. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://www.thermoscientific.com/en/product/dxr-raman-microscope.html>
- [32] KVÍTEK, L., R. NOVOTNÝ, P. PIKAL. Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla: *Chem. Listy*. 1998, č. 92, s. 431-433
- [33] BAKANDRITSOS, A., G. MATTHEOLABAKIS, G. CHATZIKYRIAKOS a T. SZABO. Doxorubicin Nanocarriers Based on Magnetic Colloids with a Biopolyelectrolyte Corona and High Non-linear Optical Response: Synthesis, Characterization, and Properties: *Advanced Functional Materials*. 2011, s. 1465–1475. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.201002112
- [34] Stabilita suspenzí a disperzí – proč jsou parametry jako velikost, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité?: *Chemagazín*, 2011, č. 4 [online] [cit.2016-04-08]. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_4_cl3.pdf
- [35] Dynamic Light Scattering Technology: Technology. *HORIBA Scientific*: [online]. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/dynamic-light-scattering/>
- [36] DENDISOVÁ, M., P. ŽVÁTORA a P. MATĚJKA. *Ramanova spektroskopie*. 2003, č. 2, s. 1–22. [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2016-04-07]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>
- [37] MILDE, D. *Základní terminologické pojmy: Mezinárodní metrologický slovník VIM3* [online]. Olomouc: UPOL. [cit. 2016-04-07]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/02a-terminologievim3-1287047120.pdf>.