



Přírodovědecká Fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci

KATEDRA
EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY

Diplomová práce

Interakce nanočástic oxidů železa
s Doxorubicinem

Autor
Vedoucí práce
Studijní obor
Forma studia
Rok

Bc. Jaroslav Kašpar
doc. RNDr. Roman Kubínek, Csc.
Nanotechnologie
Prezenční
2014

Jméno a příjmení autora	Bc. Jaroslav Kašpar
Název práce	Interakce nanočástic oxidů železa s Doxorubicinem
Typ práce	magisterská
Pracoviště	Katedra experimentální fyziky
Vedoucí práce	doc. RNDr. Roman Kubínek, Csc.
Rok obhajoby práce	2014
Počet stran	69
Jazyk	český
Abstrakt	Tato diplomová práce se věnuje vývoji a charakterizaci nanonošičů protinádorového léku doxorubicinu, pro využití v cílené distribuci léčiva. Pro vypracování práce byly využity dva vzorky nanočástic a jejich následné porovnání. Imobilizace chemoterapeutika na povrch nanočástice je podmíněna morfologií a chemickou skladbou, což je znázorněno ve výsledcích experimentů.
Klíčová slova	doxorubicin, cílená distribuce léčiv, polymer, hypertermie

Author's first name and surname	Bc. Jaroslav Kašpar
Title	Interaction between iron oxide nanoparticles and Doxorubicin
Type of thesis	master
Department	Department of Experimental
Supervisor	doc. RNDr. Roman Kubínek, Csc.
Year of presentation	2014
Number of pages	69
Language	czech
Abstract	This thesis deals with the development and characterization of nanocarriers anticancer drug doxorubicin, for use in the development of targeted drug delivery. We used two samples of nanoparticles and their subsequent comparison. Immobilization of anticancer drug to the surface of nanoparticles depends to the morphology and chemical composition, which is shown in the results of experiments.
Keywords	doxorubicin, targeted drug delivery, polymer, hypothermia

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením, a že jsem použil zdrojů, které cituji a uvádím v seznamu použitých zdrojů.

V Olomouci dne

.....
Podpis

Poděkování

Děkuji doc. RNDr. Romanu Kubínkovi za cenné připomínky a rady při vypracování a úpravě diplomové práce a také za pomoc při obstarání chemoterapeutické látky. Obrovské poděkování patří Mgr. Zdeňce Markové, PhD. za její trpělivost, rady, ochotu a obětavost, díky níž jsem mohl tuto práci vypracovat a pochopit různé mechanismy, které využiji v budoucnu. V neposlední řadě děkuji RNDr. Karolíně Machalové Šiškové a doc. Mgr. Jiřímu Tučkovi, PhD. za konzultace a pomoc při popisování výsledků, Mgr. Markétě Havrdové za ochotu a pomoc při pokusech na buňkách.

Obsah

Úvod.....	8
1 Strukturní formy oxidů železa.....	10
1.1 Magnetit.....	10
1.2 Maghemit.....	11
1.3 Jednodoméovost	13
1.4 Superparamagnetismus.....	14
1.5 Superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPION)	16
1.6 Stabilizace nanočástic polymerem	19
2 Doxorubicin	24
3 Metody studia nanočástic	26
3.1 Transmisní elektronová mikroskopie	26
3.2 Rentgenová difrakce (XRD).....	27
3.3 Spektroskopie	28
3.3.1 UV/Vis spektroskopie	28
3.3.2 Infračervená spektroskopie	28
3.4 Termogravimetrická analýza	29
3.4.1 Termogravimetrie (TGA).....	29
3.4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie	30
4 Transport přes buněčnou membránu (endocytóza)	31
5 Cílená distribuce léčiv	32
6 Hypertermie.....	34
7 Experimentální část.....	37
7.1 Materiály a metody.....	37

7.1.1	Syntéza	37
7.2	Charakterizace superparamagnetických nanočástic	38
7.2.1	Stanovení koncentrace železa	38
7.3	Termogravimetrická analýza	40
7.4	Mössbauerova spektroskopie	42
7.5	Transmisní elektronová mikroskopie	47
7.6	Dynamický rozptyl světla.....	49
7.7	Zeta potenciál	51
7.8	Rentgenová prášková difrakce	52
7.9	Infračervená spektroskopie.....	54
7.10	Syntéza komplexu SPION-DOXORUBICIN	55
7.10.1	Spektroskopické stanovení doxorubicinu	56
7.10.2	Imobilizace doxorubicinu na magnetický nosič.....	57
8	Testy na buňkách.....	61
8.1	Značení buněk	61
	Závěr	63
	Literatura.....	64
	Seznam zkratk	69

Úvod

Magnetické nanočástice oxidů železa si získávají pozornost díky svému aplikačnímu potenciálu a zajímavým magnetickým vlastnostem. Touto významnou vlastností je například superparamagnetismus při pokojové teplotě, který vykazují jednodoménné částice. Tyto nanočástice se studují a nalézají hojně uplatnění v bionanotechnologiích a medicíně, kde se využívají při protinádorové léčbě, jako nosiče léků, nebo jako kontrastní činidla při zobrazování magnetickou rezonancí. Největší uplatnění v medicíně nachází maghemit a magnetit.[1]

Železo je kov, který je hojně zastoupen v lidském těle. U dospělých lidí, lze v těle nalézt více než 4 g Fe. Toto naznačuje, že přítomnost železa v organismu nevykazuje toxicitu, avšak jen do určitého množství. Nanočástice oxidů železa mohou být přirozeně odbourány za vzniku železitanu železitého, který podléhá fyziologickému metabolismu železa.[2]

Povrchová úprava částic je cestou, která umožňuje úspěšné aplikace těchto superparamagnetických nanočástic. Povrch se může modifikovat anorganickými/organickými polymery s různými funkčními skupinami, například amino skupinou – NH₂, karboxylovou skupinou – COOH, hydroxylovou skupinou – OH. Tato modifikace má vliv na magnetické vlastnosti, na stabilitu systému, aj. [2]

Doxorubicin byl poprvé izolován v 60. letech minulého století z bakterií produkující pigment, *Streptomyces peucetius*. Je to jedna z nejúčinnějších chemoterapeutických látek nádorů hrudníku, atd. [3]. Doxorubicin je hydrofilní látka, která je nevhodná pro perorální aplikaci, protože je absorbováno méně než 5% léku. [4]. Transformace doxorubicinu v buňkách myokardu způsobuje tvorbu volných radikálů, které snižují koncentraci koenzymu Q10, což je

mitochondriální enzym, a tím dochází k oslabení srdeční tkáně. Tento jev zabraňuje regeneraci buněk a dochází k nekróze, nebo k apoptóze. Doxorubicin také zmenšuje kontraktilitu srdečního svalu, protože snižuje syntézu specifického srdečního proteinu. [5]

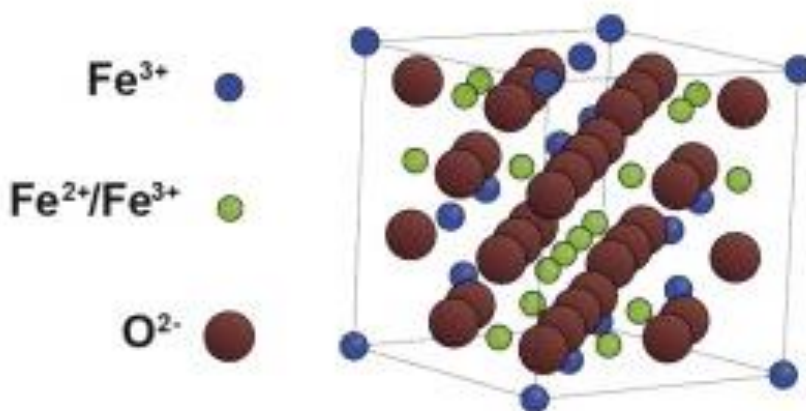
1 Strukturní formy oxidů železa

1.1 Magnetit

Mezi významné oxidy železa patří magnetit (Fe_3O_4 , oxid železnatoželezitý), též nazývaný magnetovec. Je to černý, tvrdý, magnetický minerál vyskytující se v kamenech. Přírodním zdrojem magnetitu jsou magnetotaktické bakterie, které si pomocí biomineralizace syntetizují nanočástice, které slouží k jejich orientaci. Takto vytvořené nanočástice se nazývají magnetosomy [6]. Jsou to mikroorganismy, které se vyskytují v mořských i sladkovodních prostředích. Vyskytuje se několik druhů magnetotaktických bakterií, které se liší počtem, tvarem a velikostí magnetosomů. Přínosem těchto bakterií je především syntéza biokompatibilního magnetitu. Předností takových nanočástic je uniformita částic, tedy jejich shodný tvar a obal z fosfolipidové membrány, umožňující vazbu bioaktivních látek, jakými jsou enzymy, léky či různé protilátky. Kultivace magnetotaktických bakterií je velmi náročná.[7]

V magnetitu se vyskytují Fe^{2+} i Fe^{3+} ionty, krystalová struktura spadá do rodiny kubických krystalografických struktur, magnetit vykazuje inverzní spinelovou strukturu. Třicet dva aniontů kyslíku vytváří FCC (face centered cubic) mřížku. V této struktuře jsou ionty železa umístěny v 8 tetraedrických a 16 oktaedrických pozicích. V tetraedrických pozicích se přednostně vyskytují ionty Fe^{3+} , zatímco Fe^{3+} a Fe^{2+} obsazují oktaedrické pozice. Uspořádání je někdy uváděno v jiném vzorci pro magnetit $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]\text{O}_4$ [6].

Obrázek 1 představuje grafickou podobu krystalové mřížky magnetitu.

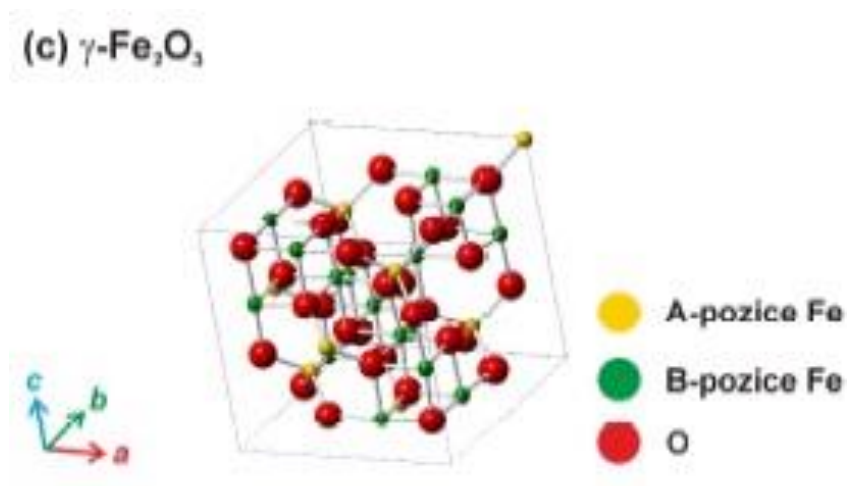


Převzato a upraveno: NADOLL, P., ANGERER, T., MAUK, J., FRENCH, D., WALSHE, J. The chemistry of hydrothermal magnetite: A review. *Ore Geology Reviews*, 2014, vol. 61, p. 1–32.

1.2 Maghemit

Druhým významným oxidem, pro bioaplikace, je maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Maghemit je hnědočervený minerál, vykazující magnetické vlastnosti. Je izostrukturální vůči magnetitu, avšak vykazuje kationtovou vakanci [6]. Při pokojové teplotě je feromagnetický, v čase ztrácí susceptibilitu a je nestabilní při vyšších teplotách. Maghemit vykazuje spinelovou kubickou krystalovou strukturu inverzního typu. V $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ rozeznáváme dvě krystalografické pozice, oktaedrickou – B a tetraedrickou – A. [8] Maghemit obsahuje pouze trojmocné ionty železa, které obsazují všechny tetraedrické pozice a pouze 5/3 oktaedrických pozic; 1/3 oktaedrických pozic je ponechána vakantní kvůli kompenzaci elektrického náboje kationtů a zachování neutrálního náboje skrz mřížku.

Obrázek 2 představuje grafickou podobu krystalové mřížky maghemitu.



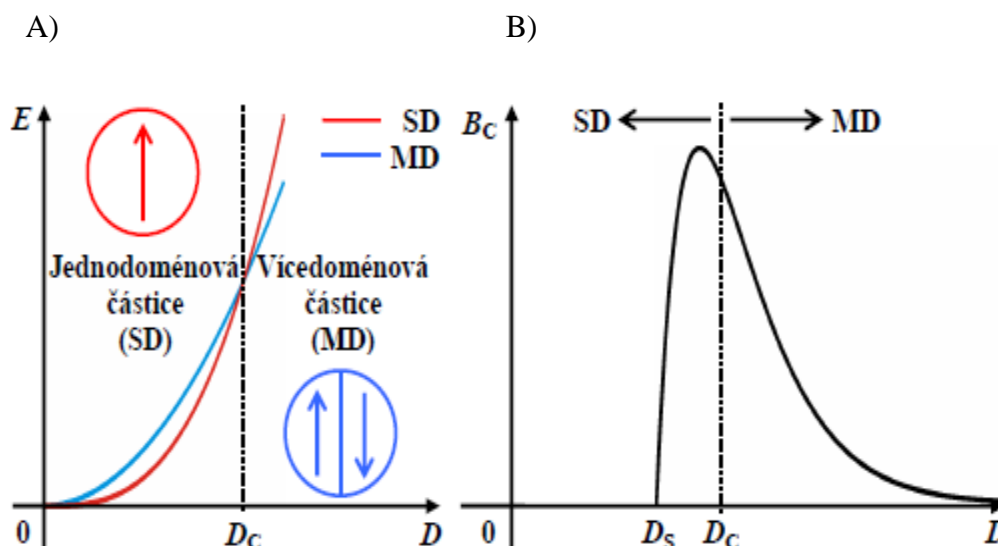
Zdroj: Tuček, J. Nanometrické polymorfy oxidu železitého, jejich magnetické vlastnosti a aplikační potenciál. HABILITAČNÍ PRÁCE, Univerzita Palackého v Olomouc, 2012.

Curieova teplota fáze $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ je v rozmezí mezi 780 K – 980 K, avšak přesné určení této teploty není možné kvůli fázové transformaci na hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Teplota, při které dochází k přechodu, je nad 600 K. Při zmenšení částice pod kritickou mez (asi 25 nm), se začne projevovat superparamagnetické chování. Toto chování je charakteristické velmi silnou magnetickou odezvou v přítomnosti vnějšího magnetického pole. [8]

1.3 Jednodoménořost

Jednodoménořost je jeř spojený s konečným rozměrem částic. Objemový materiál je složen z jednotlivých domén, což jsou spontánně zřagnetované oblasti. Domény dělí energetické bariéry, charakteristické svou šířkou a energií, nazýřující se doménové stěny. Jednotlivé domény mají své magnetické momenty, které spolu kooperují. Rozdíly mezi jednotlivými magnetickými momenty pak určují výsledný tvar a strukturu domény. Pokud budeme zmenřovat velikost částic, bude se redukovat počet doménových stěn. Při neustálém zmenřování dosáhneme kritického rozměru, kdy budou energetické požadavky na existenci domén vyšší, než celkový úbytek energie při rozdělávání domény do menřích domén. Pod tímto kritickým rozměrem dochází k jeřvu známému jako jednodoménořost, kdy jsou magnetizační změny charakterizované koherentní rotací magnetických momentů. Výsledkem jsou vysoké hodnoty koercitivity. Magnetické momenty jednodoménořových částic jsou uspořádaný ve stejném směru, což má za následek velmi vysoký výsledný magnetický moment. Teoretický kritický rozměr jednodoménořových částic je definovaný pouze pro magneticky neinteragující, sférické nanočástice se silnou anizotropií. Pokud jsou částice nesférické, je potřeba započítat i tvarovou anizotropii, která zvyšuje hodnoty kritických rozměrů částic.[10]

Obrázek 3 A) ilustruje přechod mezi jednodoménovou a vícedoménovou částicí v závislosti na velikosti částic (D), B) průběh koercitivity v systému jedno/vícedoménových částic.



Zdroj: TUČEK, J. *Magnetismus nanočástic oxidů železa a dvojného perovskitu typu Sr₂FeRuO₆: PhD Thesis.* Univerzita Palackého v Olomouci, 2008.

1.4 Superparamagnetismus

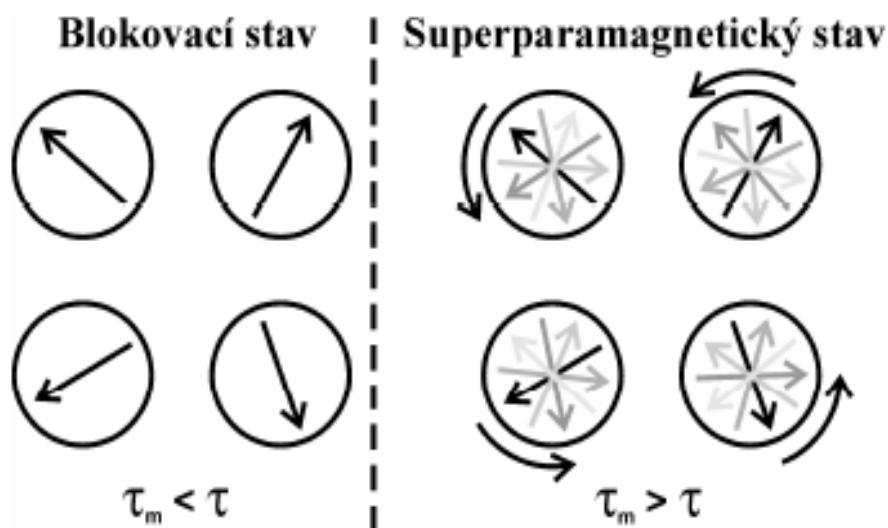
Superparamagnetismus je jev, který je spojen s konečným rozměrem částic. U jednodoménových částic je anizotropní energie úměrná jejich objemu. V jednoosé anizotropii je energetická bariéra, dělící energeticky příhodné směry magnetizace, rovna KV . Při zmenšování rozměru částic se bude snižovat i anizotropní energie. Pokles rozměru pod určitou mez má za následek, že anizotropní energie se stane menší, nebo srovnatelná s tepelnou energií $k_B T$. Z uvedeného vyplývá, že je možné překonání energetické bariéry, která udržuje magnetizaci nanočástic ve výhodném energetickém stavu, jestliže platí $k_B T > KV$.

Celkový spinový systém, který reprezentuje výsledný superspin (magnetický moment), se samovolně překlání do jiného energeticky výhodného směru magnetizace. Toto magnetické chování, které je teplotně aktivované, je nazýváno jako superparamagnetismus. K charakterizaci se zavádí pojem relaxační čas $[\tau]$, který udává čas setrvání magnetického momentu v jednom význačném směru magnetizace, než se překlápí do směru dalšího. [10]

Arrhenius-Néelova rovnice:

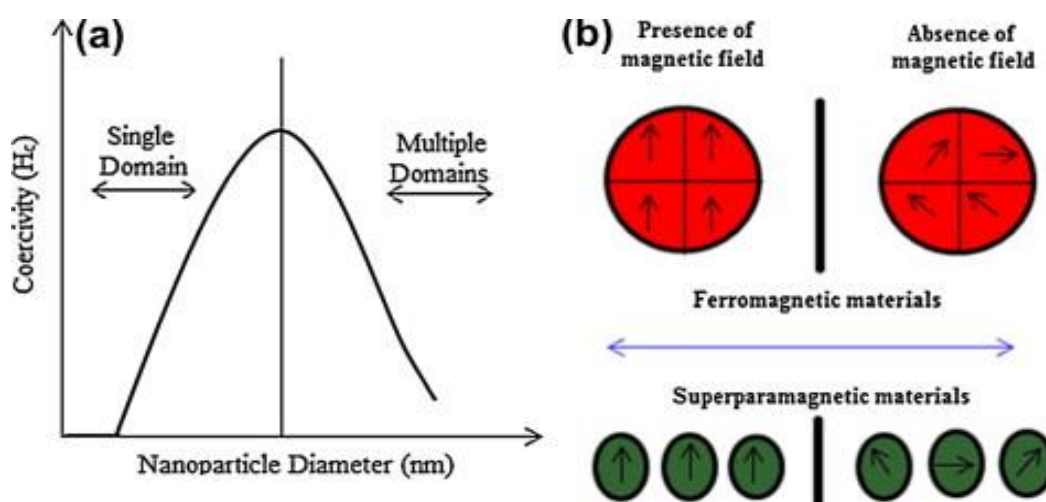
$$\tau = \tau_0 \exp \left[\frac{KV}{k_B T} \right]$$

Obrázek 4 vyznačuje dva odlišné magnetické stavy, a sice blokovací stav a superparamagnetický stav.



Zdroj. TUČEK, J. *Magnetismus nanočástic oxidů železa a dvojného perovskitu typu Sr₂FeRuO₆: PhD Thesis.* Univerzita Palackého v Olomouci, 2008.

Obrázek 5 graf a) znázorňuje mez dělicí jednodoménové a vícedoménové částice, obrázek b) ukazuje rozdíl mezi feromagnetickou multidoménovou, částici v přítomnosti magnetického pole i bez jeho působení a superparamagnetickou, jednodoménovou částici se superspinem.



Převzato a upraveno: BUDIME SANTHOSH, P., POKLAR ULRIH, N. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Letters*, 2013, vol. 336, no. 1, p. 8–17.

1.5 Superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPION)

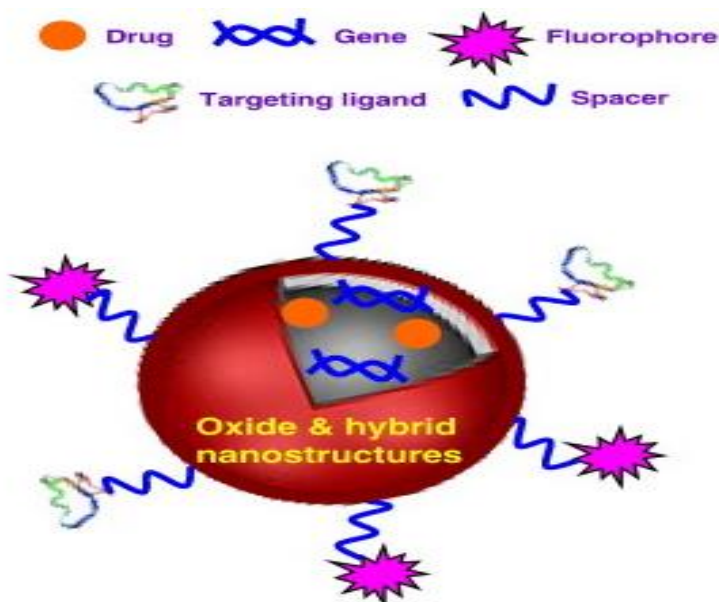
Superparamagnetické nanočástice oxidů železa jsou významné v medicíně, díky superparamagnetickému chování a možnosti modifikovat povrch částic, a tím měnit jejich chování. SPION nanočástice jsou biokompatibilní, biodegradabilní a

mohou být metabolizovány či transportovány pomocí bílkovin, jako například transferinem, hemosiderinem či ferritinem. Výhodou je i pozdější zakomponování těchto nanočástic do endogenních zásobáren železa. Velká plocha povrchu těchto částic umožňuje kovalentní navázání různých protilátek, bílkovin, ligandů, či receptorů k zasažení cílové oblasti v lidském těle, a proto mají tyto materiály velký potenciál v biomedicínských aplikacích. [9]

Možnost využití se naskytuje v zobrazování magnetickou rezonancí (MRI), diagnostikování a léčba nádorů, cílená distribuce léčiv a biomolekulární separace. Pro využití v těchto odvětvích by měly být superparamagnetické nanočástice stabilní, umístěny do vodného roztoku a s úzkou velikostní distribucí. [11]

Pro všechny biologické aplikace je potřeba, aby byly částice netoxické, pH-stabilní ve fyziologickém prostředí a biokompatibilní.

Obrázek 6 představuje strukturu SPIO nanočástice s možnostmi funkcionalizace.



Převzato a upraveno: CHANDRA, S., BARICK, K., BAHADUR, D. Oxide and hybrid nanostructures for therapeutic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, vol. 63, no. 14-15, p. 1267–1281.

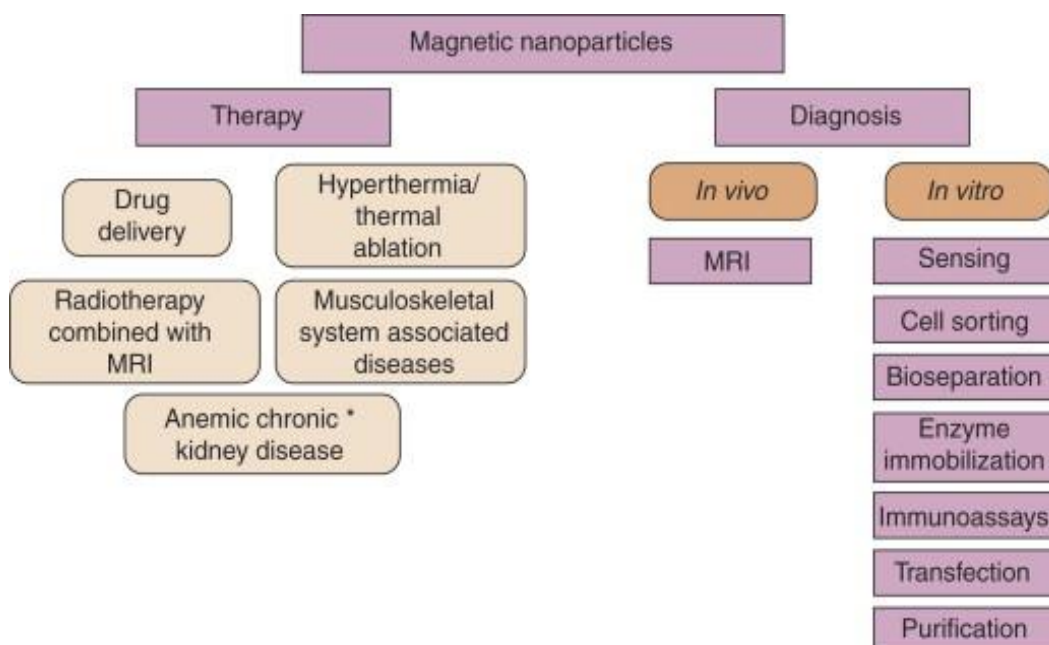
Hlavní výhody užití magnetických nanočástic jsou:

1. Možná vizualizace (SPIO nanočástice se používají u zobrazování magnetickou rezonancí)
2. Vedení/udržení nanočástic do/v cílové oblasti v lidském těle pomocí magnetického pole
3. Hypertermie (působení střídavého magnetického pole způsobí zahřátí nanočástice a tím i k možné ablacii tumorózní tkáně, či ke stimulaci uvolnění léčiva z povrchu částic) [12]

SPIO nanočástice použitelné pro protinádorovou léčbu by měly splňovat tato kritéria:

1. Úzká křivka velikostní distribuce, velká magnetizace
2. Vhodné hodnoty zeta potenciálu
3. Prodloužení času cirkulace v krevním řečišti
4. Schopnost změny vazebných podmínek (při změně teploty, pH,....)
5. Schopnost vazby funkčních skupin, léků či receptorů
6. Možnost obalení povrchu nanočástice (zamezení agregace systému)
7. Kontrastní pro MRI (zobrazení v nádorové tkáni) [9]

Obrázek 7. Schéma ukazuje možnosti využití magnetických nanočástic v terapii, ale také v diagnostice v nejrůznějších vědních oborech.



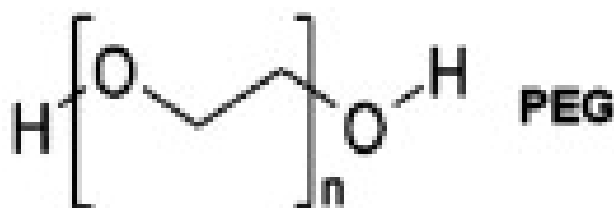
Zdroj: ARRUEBO, M., FERNÁNDEZ-PACHECO, R., RICARDO IBARRA, M., SANTAMARÍA, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2007 (June), vol. 2, no. 3, p. 22–32

1.6 Stabilizace nanočástic polymerem

Obalení nanočástic polymerem zajišťuje zvýšení biokompatibility při práci s organickým materiálem a zamezuje povrchové oxidaci částic. Takové nanočástice vykazují důležité vlastnosti, než částice bez povrchové úpravy. Při použití organického polymeru dochází ke zlepšení chemické stability a snížení toxicity. [13]

Polyethylenglykol (PEG) je atraktivním materiálem, protože snižuje míru účinnosti fagocytů (opsonizace), díky jeho hydrofilitě a neutrálnímu náboji. Přítomnost řetízku PEG navázaného na povrch nanočástice zajišťuje zvýšení stability ve vodném roztoku, a zároveň prodlužuje životnost komplexu v krevním řečišti. [14]

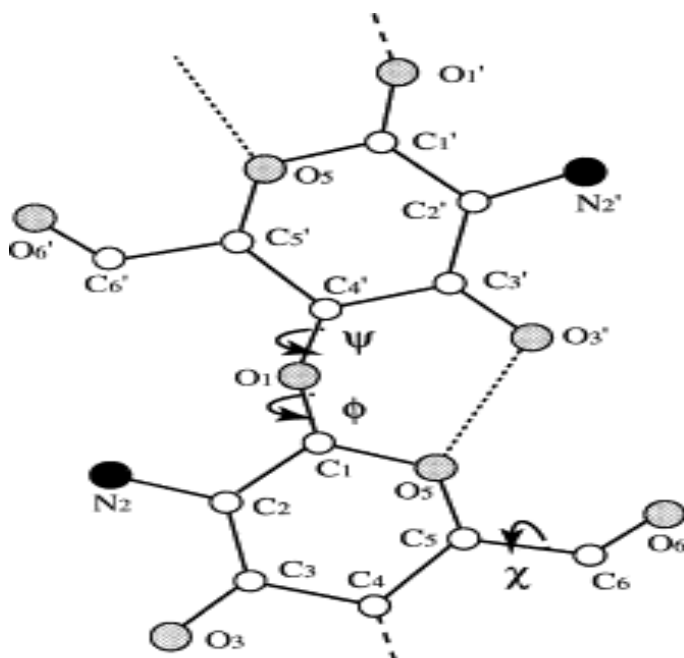
Obrázek 8. Chemický vzorec polymeru polyethylglykol (PEG).



Převzato a upraveno : ILEANA COVALIU, C., JITARU, I., PARASCHIV, G., VASILE, E., BIRIȘ, S., DIAMANDESCU, L., IONITA, V., IOVU, H. Core-shell hybrid nanomaterials based on CoFe_2O_4 particles coated with PVP or PEG biopolymers for applications in biomedicine. *Powder Technology*, 2013, vol. 237, p. 415–426.

Chitosan je přírodní polymer, vznikající z chitinu. Je hojně využíván u nanočástic vytvořených samoshromážděním. Chitin se vyskytuje ve skeletu bezobratlých živočichů, ale také v exoskeletu, zámočcích a peritrofických membránách. Při hodnotě disociační konstanty kyselosti asi 6,5, je chitosan nerozpustný v neutrálním pH, ale plně rozpustný a s kladným nábojem v pH kyselého prostředí. [15]

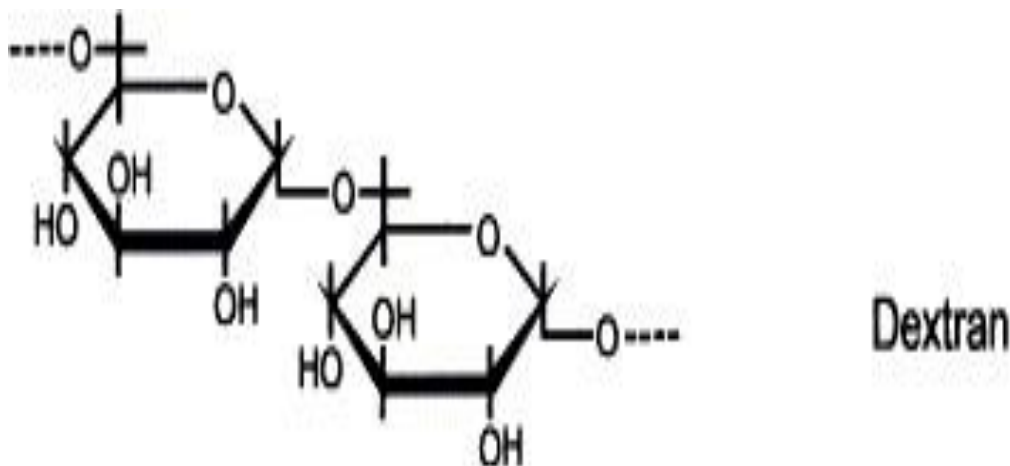
Obrázek 9. Chemický vzorec polymeru chitosan.



Zdroj: AGRAWAL, P., J. STRIJKERS, G., NICOLAY, K. Chitosan-based systems for molecular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, vol. 62, no. 1, p. 42–58.

Dextran je ve vodě rozpustný přírodní polysacharid. Má mnoho výhod, jako například biodegradabilita, biokompatibilita, netoxicita a zlepšuje transfekci, což umožňuje použití v organismu. Je také snadno dostupný a levný. Obalení dextranem prodlužuje dobu cirkulace v krvi. [16]

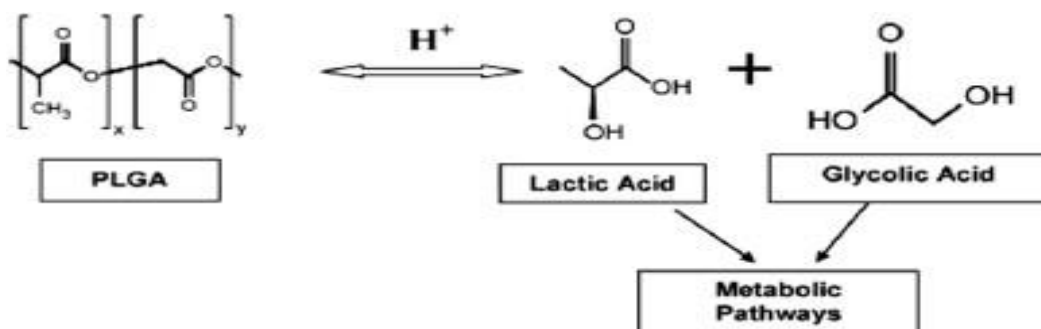
Obrázek 10. Chemický vzorec polymeru dextran.



Zdroj: BARIÉ, N., RAPP, M., SIGRIST, H., J. ACHE, H. Covalent photolinker-mediated immobilization of an intermediate dextran layer to polymer-coated surfaces for biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, vol. 13, no. 7-8, p. 855–860.

Poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) je velmi používaný biologicky odbouratelný polymer, jehož hydrolýzou vznikají monomery, kyselina glykolová a kyselina mléčná. Tyto dvě kyseliny jsou metabolizovány pomocí Krebsova cyklu. Polymer je dostupný komerčně s lišícími se molekulovými hmotnostmi. Čas degradace v organismu se liší v závislosti na množství kopolymeru, molekulové hmotnosti a pohybuje se od několika měsíců po léta. Označení polymeru se řídí dle zastoupení jednotlivých kompozitů (PLGA 50:50 ukazuje 50% zastoupení kyseliny glykolové a rovněž 50% zastoupení kyseliny mléčné). [17]

Obrázek 11. Chemické vzorec polymeru poly(lactid-co-glycolic) acid s jeho metabolismem v organismu



Převzato a upraveno: DANHIER, F., ANSORENA, E., M. SILVA, J., COCO, R., LE BRETON, A., PRÉATA, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 2012, vol. 161, no. 2, p. 505–522.

Tabulka 1. představuje nejpoužívanější polymery ke stabilizaci povrchu nanočástic.

Polymer	Použití
Polyethylen glykol (PEG)	Zvyšuje biokompatibilitu, cirkulaci v krevním řečišti a také internalizaci (endocytózu) nanočástic
Polyvinyl alkohol (PVA)	Zabraňuje shlukování nanočástic
Polyacrylic acid	Zvyšuje stabilitu a biokompatibilitu nanočástic
Dextran	Stabilizuje koloidní roztok a prodlužuje dobu cirkulace částic v krevním řečišti
Chitosan	Hydrofilita, kompatibilita, přírodní polymer
Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)	Nízká toxicita, biokompatibilita

Převzato a upraveno: AJAY KUMAR GUPTA, MONA GUPTA Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, p. 3995–4021

2 Doxorubicin

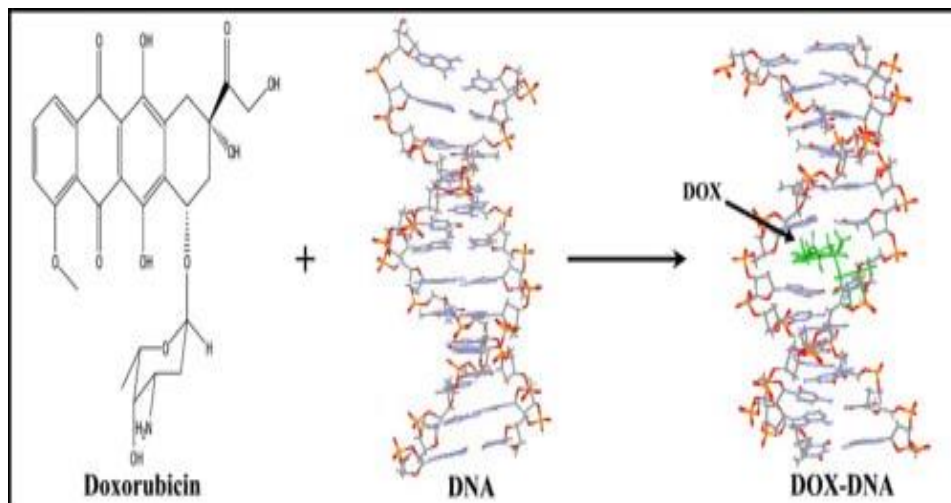
Doxorubicin je sekundárním produktem metabolismu bakterií rodu *Streptomyces peucetius*, patřící mezi anthracyklická antibiotika, která jsou vysoce efektivní v léčbě nádorů hrudníku, leukémie, lymfomů a solidních nádorů.[18] Jedná se o hydrofilní chemoterapeutikum. Farmakokinetika ukazuje, že toto léčivo není vhodné pro perorální aplikace, protože se resorbuje méně než 5% z aplikovaného množství.[19] Použití doxorubicinu je omezeno četnými vedlejšími efekty, jako nevolnost, zvracení, potlačení krvetvorby, alopecie a výrazná kardiotoxicita. Symptomy kardiotoxicity se mohou projevit až 15 let po podstoupení chemoterapie[20]. Vznikající resistance vůči doxorubicinu, také zkracuje dobu použití toho léčiva. [18]

Doxorubicin je podáván intravenózně v dávkách 60 – 90 mg/m² v průběhu 21 dní. Léčivo vykazuje kumulativní charakter dávky, což se projevuje v maximální dávce 550 mg/m², z důvodu vysoké pravděpodobnosti vzniku kardiotoxicity.[21]

Vedlejší toxické účinky jsou závislé také na pohlaví nemocného. Bylo prokázáno, že u žen se vyskytují vážnější formy kardiotoxicity. Dalším významným faktorem je věk. Pacienti mladší 4 let a starší 65 let mají zvýšené riziko vzniku kardiotoxicity způsobené doxorubicinem. Stejně tak i chronická onemocnění, jako diabetes mellitus, hypertenze, onemocnění jater a srdeční potíže, vedou ke zvýšenému riziku vzniku kardiomyopatie.[20]

Doxorubicin je chemoterapeutikum, které inhibuje topoizomerázu II. Vznik komplexu topoizomerázy II s doxorubicinem, vede ke zlomům ve dvoušroubovici DNA, nebo k interkalaci s DNA, což se projeví v poruchách duplikace a transkripce do mRNA. Dalším cytotoxickým mechanismem účinku je tvorba ROS (reactive oxygen species).[18].

Obrázek 12. Znázornění molekuly Doxorubicinu, molekuly DNA a následnou interkalaci chemoterapeutika do dvoušroubovice DNA.



Zdroj: AGUDELO, D., BOURASSA, P., BÉRUBÉ, G., ALI TAJMIR-RIahi, H. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, vol. 66, p. 144–150.

3 Metody studia nanočástic

3.1 Transmisní elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie využívá k zobrazení elektrony, zatímco optická elektromagnetické vlny ve viditelné oblasti. V roce 1925 navrhl Luis De Broglie, že urychlené částice mají korpuskulární i vlnový charakter. K usměrnění letících elektronů byly použity solenoidy, což jsou elektromagnetické cívky, protože optické čočky by působily jako bariéry, kterými by elektrony neprošly.

První pozorované preparáty pomocí transmisní elektronové mikroskopie byly biologické. Pozorovány byly rostlinné tkáně, schránky hmyzu, krevní destičky. Podmínkou při přípravě vzorků byla nutnost dehydratace a patřičné tloušťky, protože elektrony mají omezenou prostupnost. [7]

Interakce elektronů se vzorkem

U transmisní elektronové mikroskopie (TEM) elektrony procházejí vzorkem. Při průchodu dochází k nepružnému a pružnému rozptylu elektronů. Elektrony při pružném rozptylu neztrácejí výrazně energii v porovnání s energií primárních elektronů. Při průchodu vzorkem se elektrony vychylují v závislosti na velikosti elektrického náboje jádra a vzdálenosti mezi procházejícím elektronem a jádrem vzorku. V důsledku vychylování a následného odclonění elektronů vzniká kontrast snímku. Fázový kontrast způsobuje tvorbu více odstínů šedi. Tento jev je způsoben rozdílem drah elektronů, které byly odchýleny pod rozdílnými úhly.[7]

U nepružného rozptylu dochází k interakci obalových elektronů preparátů s primárními elektrony. Při interakci dojde k výraznému poklesu energie a tím ke změně vlnové délky. Tento parazitní jev roste s klesající hodnotou urychlovacího napětí a s rostoucí tloušťkou zkoumaného vzorku.[7]

Příprava vzorku pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Pomocí TEM získáme přesnou morfologii vzorku. Při zachycení ultratenkých řezů, povrchu, buněk či nanočástic se využívá tenké fólie, která je pro elektrony transparentní, vykazující nízkou zrnitost a s tloušťku okolo 20 nm. Fólie jsou nejčastěji vyrobeny z plastu či uhlíku. Nezbytnou součástí je síťka, která tvoří podporu pro vzorek a fólii, jenž je vyrobena z mědi, aby nedošlo k ovlivnění procházejících elektronů.[7]

3.2 Rentgenová difrakce (XRD)

Interakce fotonů rentgenového záření s látkou se děje pomocí dvou procesů, a to rozptylem, nebo absorpcí. Absorbce může vést k fotoelektrickému jevu, případně ke vzniku fluorescence. O rozptylu mluvíme tehdy, pokud dojde k odchýlení fotonů dopadajícího svazku. Dle změny energie záření, dělíme rozptyl na Thompsonův, kdy nedochází ke ztrátě energie, a Comptonův, kdy dochází k energetickým ztrátám. Vznik difrakčního obrazu je podmíněn interakcí stacionárních atomů s RTG zářením.

Difrakce se řídí Braggovou rovnicí $2d\sin\theta = n\lambda$, kde d je mezivířinná vzdálenost, $\sin\theta$ – úhel dopadajícího záření, λ – vlnová délka dopadajícího záření a n je řád difrakce. [22]

3.3 Spektroskopie

3.3.1 UV/Vis spektroskopie

Spektroskopií ve viditelné a ultrafialové oblasti se detekují molekuly látek, absorbující elektromagnetické vlnění, které má vlnové délky v rozsahu 200 nm až 800 nm.

V klidových podmínkách se molekuly látek vyskytují v tzv. základním elektronovém stavu, jejich celková energie je dána součtem jednotlivých základních energií, vibrační, rotační a elektronové. Při absorpci fotonů o vlnové délce z viditelné a UV oblasti spektra, molekula zvýší svou energii a dostane se do excitovaného stavu. Setrvání ve stavu s vyšší energií trvá pouze krátce a poté se vrátí do energeticky základního stavu, za emise energie. [23]

3.3.2 Infračervená spektroskopie

Spektroskopie v infračervené oblasti detekuje látky, absorbující záření, která má vlnové délky od 800 nm do 100 μm . Při absorpci záření o těchto vlnových délkách dojde ke změně rotačních a vibračních molekulových stavů. Mezi jednotlivými rotačními a vibračními stavy existují velmi malé rozdíly v energiích, ve srovnání s rozdíly mezi jednotlivými elektronovými stavy, tzn. Pro absorpci záření stačí elektromagnetické záření nízké energie, infračervené záření. IČ záření můžeme rozdělit, podle vlnových délek, na tři oblasti [23]:

1. Blízká oblast se označuje jako near-infrared, které se nachází v oblasti 800 – 2500 nm, o vlnočtu 4000 – 12000 cm^{-1}
2. Střední oblast (middle-infrared) -> 2,5 – 50 μm , vlnočet 200 – 4000 cm^{-1}
3. Vzdálená oblast (far-infrared) -> 50 – 100 μm , vlnočet 200 – 10 cm^{-1}

Při aplikaci záření blízké a střední IČ oblasti dojde k rotačně-vibračním přechodům. V tomto stavu se mění rotační i vibrační stav molekuly současně.

K interpretaci IČ spekter nás zajímají 4 hlavní kritéria:

1. Tvar absorpčních pásů
2. Poloha absorpčních pásů
3. Počet pásů
4. Intenzita pásů

Zdroj: NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ, L., RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody*. 2nd ed. 2004. ISBN 802460776X.

3.4 Termogravimetrická analýza

3.4.1 Termogravimetrie (TGA)

Termogravimetrie studuje změnu hmotnosti ve vzorku, vzhledem k teplotě. Výstupem termogravimetrické analýzy je termogravimetrická křivka, znázorňující závislost na čase, případně hmotnosti na teplotě. Na termogravimetrické křivce sledujeme několik oblastí [33] :

1. Beze změny hmotnosti (plato, teplotní stabilita látky)
2. Se změnou hmotnosti (nárůst, úbytek)
3. Dílčí snížení hmotnosti
4. Celkové snížení hmotnosti

Příprava vzorku

Je nezbytné, aby byly vzorky připraveny totožným postupem. Volíme rovnoměrné nanesení materiálu, abychom dosáhli lineárního ohřevu vzorku. Toto

je v praxi zajištěno vtlačení navážky do kelímku. Materiál, ze kterého je kelímek vyroben, nesmí ovlivňovat děje probíhající ve vzorku (například porcelán či safír). [33]

3.4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie

Tato termická metoda je založena na udržování stejné teploty mezi referenčním a zkoumaným vzorkem pod stejným programem. Referenčním materiálem může být:

1. Pro anorganické materiály – Al_2O_3 (oxid hlinitý) a SiC (karbid křemíku)
2. Pro Organické materiály – oktyl ftalát a silikonový olej

Rozlišují se dva různé typy diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Prvním je diferenční skenovací kalorimetrie s kompenzací příkonu, kdy na základě probíhajících dějů ve studovaném vzorku (endo/exoefekty) je buď rychleji zahříván zvýšením příkonu, nebo naopak se příkon sníží, aby došlo k vyrovnání teploty mezi studovaným a referenčním vzorkem.[33]

Druhým typem je DSC s tepelným tokem. Zde jsou oba vzorky (referenční i studovaný) vloženy do stejné kalorimetrické cely a vzájemně spojeny tepelným mostem. Při endo/exotermických dějích dochází k rozdílu teplot obou vzorků a následnému tepelnému toku, který je extrapolován na energetický ekvivalent.

Pomocí DSC můžeme posoudit základní parametry křivek, což jsou endo/exoefekty.

Endotermické děje: rozpouštění, tání, termický rozklad, dehydratace, atd.

Exotermické děje: krystalizace, pevnofázové reakce, oxidace. [33]

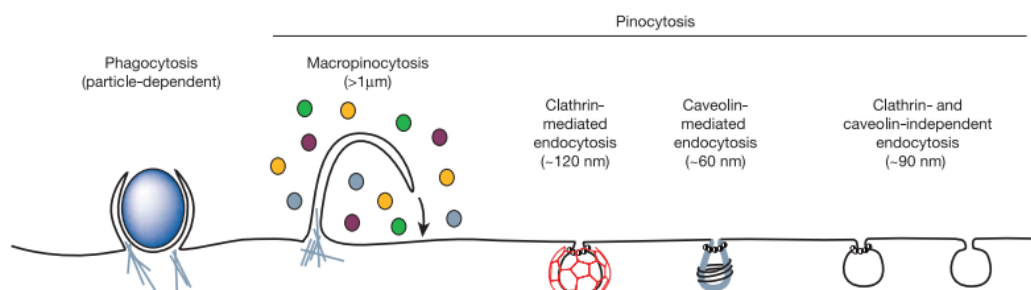
4 Transport přes buněčnou membránu (endocytóza)

Buňky využívají endocytózu především k příjmu výživy [24]. Existují dva mechanismy endocytózy, mezi které patří fagocytóza a pinocytóza.[25]. Fagocytóza se označuje také jako „buněčné jezení“ a slouží k pohlcení větších elementů, jako například částic, jejichž rozměr přesahuje 0,5 mikron, nebo bakterie. Pinocytóza, jinak nazývaná buněčným pitím, slouží k pohlcování tekutiny, ve které je buňka situovaná.

Dle specifických molekulárních regulátorů můžeme dělit endocytózu na několik typů. Prvním je endocytóza zprostředkovaná proteinem klatrinem (CME – clathrin-mediated endocytosis). Vyskytuje se především u buněk savců a slouží k neustálému příjmu základních živin. Je nezbytná ke komunikaci na intracelulární úrovni při vývinu orgánů a tkání po celou dobu života organismu. Slouží také k regulaci internalizace membránových iontových pump, které řídí průchod iontů a malých molekul skrz buněčnou membránu. Internalizace zprostředkovaná proteinem klatrinem umožňuje řídit sílu synaptického přenosu (díky přenosu Ca^{2+} iontů) a existuje i souvislost s pamětí a učením. Poslední význam CME je v efektivní obnově membrány synaptických váček po nervovém přenosu.[24].

Endocytóza zprostředkovaná kaveoly je dalším mechanismem pinocytózy. Kaveoly jsou na mnoha buňkách a vyskytují se v mikrodoménách plazmatické membrány, kde se hojně vyskytují sfingolipidy a cholesterol. Strukturální organizace a tvar kaveolů jsou dány kaveolinem, což je dimerní protein reagující s cholesterolem. [24]

Obrázek 13. Ilustrace jednotlivých mechanismů prostupů nanočástic do buňky.



Zdroj: S. D. CONNER, S. L. SCHMID, Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 2003 (6 March), vol. 422, p. 37–44.

5 Cílená distribuce léčiv

Nevýhodou konvenční chemoterapie je celková nespecifita a nutnost aplikace vysoké dávky léku [7] [9]. Chemoterapeutikum je podáváno intravenózní cestou, tudíž dochází k systémové distribuci po celém těle [12]. Toxicita léčiva je doprovázena četnými a závažnými vedlejšími účinky. Tomuto lze předejít použitím nanočástic, které lze použít k cílené distribuci léčiv, hypertermii či k možnosti navázání protilátky na povrch částic. Nanočástice oxidů železa, vykazující strukturu „core-shell“, jsou nejpoužívanějšími materiály. [12] Základními parametry, které charakterizují chování magnetických nanočástic jsou spjaty s chemickým složením povrchu, magnetickými vlastnostmi (remanence, koercivita, magnetický moment), velikostí (velikost magnetického jádra, velikostní distribuce, hydrodynamický poloměr). [12] Funkcionalizace nanočástic polymerem, amino skupinami (NH₂) a různými organickými sloučeninami vede

ke zlepšení chemických a fyzikálních vlastností. Více funkčních skupin na povrchu nanočástic slouží k zajištění variabilních vlastností. Nanočástice si zachovávají hydrofilitu a při zachování velikosti do 100 nm zamezují degradaci pomocí retikuloendoteliálního systému (RES), což je složka imunitního systému. [12] [26]. Je dokázáno, že funkcionalizace pomocí polymerů a velikost NPs hraje významnou roli ve výsledné toxicitě nanočástic. [26]. Konjugace s hydrofilickým zbytkem (polysacharidy, polyethylenglykol, atd.) vede ke zvýšení poločasu cirkulace na několik hodin až dnů. Vyřazení RES by bylo možné pomocí snižování rozměrů nanočástic, ale při příliš malé velikosti by docházelo k migraci NPs do různých částí těla a tím ke vzniku možných toxikologických problémů [12] Cílení může být prováděno pasivně, aktivně. Aktivní cílení léčiv je prováděno pomocí konjugace protilátky na povrch nanočástice, či užitím magnetického pole.

Pasivní cílení léčiv využívá EPR jevu. Jinak je také nazýváno EPR efekt (enhanced permeability and retention effect), volně přeloženo jako zvýšení permeability a retence. Tento jev umožňuje nosičům léku prostupovat přes nedokonalou stěnu krevní cévy vyživující nádorovou tkáň. Bylo zjištěno, že cévami nádorů mohou prostupovat částice s velikostí až 2 μ m a pronikání je vyšší, než u normálních cév [21]. Vzhledem k rychlému růstu rakovinné tkáně se začne rychle tvořit i vaskulární síť, na kterou je tento růst závislý, vzhledem k nárokům na výživu a oxygenizaci. Nanočástice ve velikosti lipozomů se mohou akumulovat v těchto bohatě prokrvených tkáních. Mechanismy zacílení nanočástic s léčivem jsou různé, avšak většinou založeny na interakci receptor-ligand. [27]

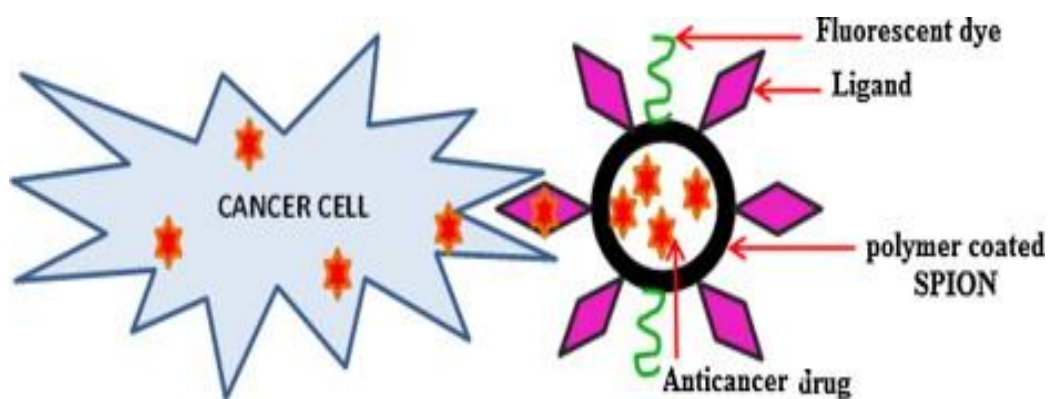
SPIO nanočástice použitelné pro protinádorovou léčbu by měly splňovat tato kritéria:

1. Úzká křivka velikostní distribuce, velká magnetizace
2. Vhodné hodnoty zeta potenciálu
3. Prodloužení času cirkulace v krevním řečišti

4. Schopnost změny vazebných podmínek (při změně teploty, pH,....)
5. Schopnost vazby funkčních skupin, léků či receptorů
6. Možnost obalení povrchu nanočástice (zamezení agregace systému)
7. Kontrastní pro MRI (zobrazení v nádorové tkáni)

Zdroj: [9]

Obrázek 14. Představuje teoretický model ideální theranostické částice



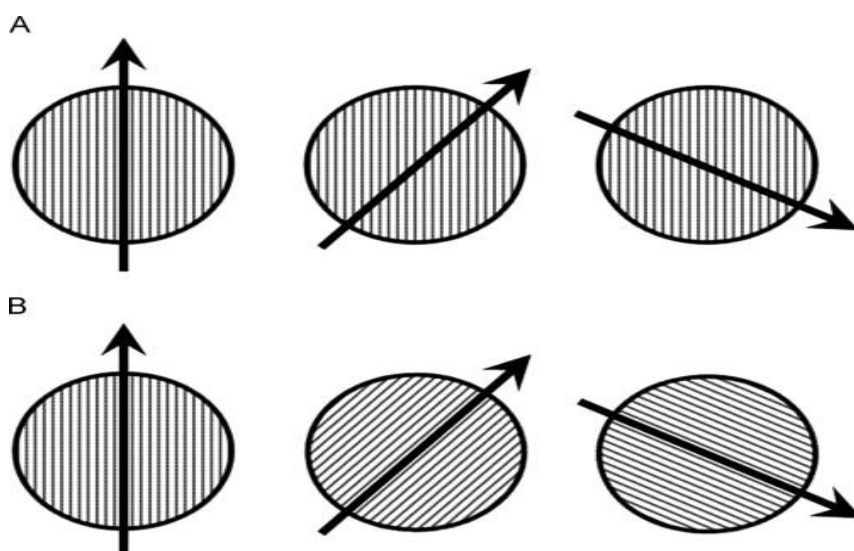
Převzato: [9]

6 Hypertermie

Magnetická hypertermie je novým možným přístupem k léčbě rakoviny. Základním přístupem je zavedení superparamagnetických nebo feromagnetických nanočástic do cílové oblasti a následné aplikaci střídavého magnetického pole.

Částice absorbují energii ze střídavého magnetického pole a přeměňují ji na teplo jako výsledek hysterézních ztrát, vírovými proudy, Brownovou a Néelovou relaxací. Hysterézní ztráty jsou hlavním mechanismem ohřívání u nanočástic 100 nm a větších. V takových částicích je zahřívání způsobeno rotací magnetického momentu jednotlivých nanočástic vůči energetické bariéře. Pokud jsou podmínky takové, že dojde k hromadné rotaci magnetických nanočástic, znamená to projití Brownové relaxace a skrz smykové tření je tepelná energie uvolněna do okolní tekutiny. Pokud rotační pohyb vykonává pouze magnetický moment, zatímco samotná částice je nehybná, mluvíme o Néelově relaxaci, kdy je tepelná energie rozptýlena v krystalu při reorganizaci dipólových momentů jednotlivých atomů [28] [29] [30].

Obrázek 15. popisuje A) stav, kdy jsou nanočástice zablokované a otáčí se pouze superspin, B) stav, kdy nanočástice vykonávají otáčky spolu se superspinem



Zdroj: E. DEATSCH, A., A. EVANS, B. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2014 (March), vol. 354, p. 163–172.

Jelikož jsou superparamagnetické nanočástice složeny z jedné domény, každá z nich má svůj vlastní magnetický moment. V nepřítomnosti pole je orientace magnetického momentu popsána pomocí krystalové anisotropie. [29]

Efektivita přeměny závisí jak na povrchové modifikaci nanočástic, tak na jejich velikosti a v neposlední řadě na frekvenci vnějšího magnetického pole. Léčba spočívá ve zvýšení teploty tumorózní tkáně na 41°C – 46°C, kdy dochází k indukci apoptózy rakovinných buněk. [30]. Apoptóza je programovaná smrt buňky, která je geneticky regulovaná, je hlavním obranným mechanismem potlačující rakovinné bujení. Potlačení apoptózy může vést ke kancerogenezi. [31].

Při vhodné modifikaci nanočástic a jejich akumulaci pouze v rakovinné tkáni, lze tyto částice aplikovat intravenózně, což by vedlo ke zlepšení kvality života pacienta. Pasivní cílení částic je velmi důležitý krok k vývoji účinné léčby, pomocí hypertermie, protože dochází k migraci do retikuloendoteliálního systému. Takovým systémem jsou například Kupfferovy buňky v játrech a slezině. [28]

7 Experimentální část

7.1 Materiály a metody

Superparamagnetické nanočástice smCMC-Ar byly připraveny dle [32] a smbisCOOH-CH připravila Mgr. Zdeňka Marková, PhD.

7.1.1 Syntéza

Nanočástice smCMC-Ar

Do 10 ml vody (H_2O) bylo přidáno 0,72g heptahydrátu síranu železnatého ($FeSO_4 \times 7H_2O$) a 100 mikrol 37% kyseliny chlorovodíkové (HCl). 0.5g carboxymethyl celulózy bylo rozpuštěno ve 30 ml vody (H_2O). Tyto dva vzniklé roztoky byly smíchány při udržování teploty $30^\circ C$ a neustálého magnetického míchání. Poté bylo přidáno 7 ml 30% hydroxidu amonného (NH_4OH). Po 30 minutách byla teplota zvýšena na $50^\circ C$ s přidáním dalších 10 ml 30% NH_4OH . Směs byla míchána dalších 15 minut a poté odejmuta z ohřívací plotýnky. Kádinka s roztokem se nechala zchladnout na pokojovou teplotu. Hodnota pH finálního roztoku byla přibližně 6,5.

Vzniklý koloidní roztok byl vložen do centrifugy na dobu 1 hodiny a 13 000 otáček za minut, abychom oddělili nanočástice pokryté polymerem od samotného polymeru, který se po odstředění nacházel v supernatantu. Pelet byl znovu rozpuštěn ve vodě a vzniklý roztok byl podstoupen sonikaci po dobu 10 minut. Oddělení supernatantu a peletu bylo provedeno třikrát. Nakonec byl výsledný pelet smíchán s 35 ml vody (H_2O).

Tento koloidní roztok se přelil do skleněné zkumavky a byl sonikován 15 minut. Pro odstranění agregátů byl roztok centrifugován po dobu 20 minut při cca 1000 g. Vzniklý hnědý roztok byl skladován v lednici při teplotě 7°C. [32]

7.2 Charakterizace superparamagnetických nanočástic

7.2.1 Stanovení koncentrace železa

Pro zjištění koncentrace oxidů železa v roztoku jsme použili UV-VIS spektrometr, který využívá jako zdroj He-Ne laser, pracující na vlnové délce 633 nm. Postupovali jsme pomocí Ferrozinové metody. Připravili jsme si 2 pufrů, redukční a ferrozinový. Redukční pufr vznikl rozpuštěním 10 g hydroxylaminhydrochloridu v 50 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové (HCl). Roztok se nechal stát, abychom dosáhli dobrého rozpuštění a doplnili jsme jej 1 M HCl do celkového objemu 100 ml. Ferrozinový pufr jsem připravili rozpuštěním 50 g amonium acetátu (octanu amonného) a 0,1 g ferrozinu ve 40 ml deionizované vody. Po dostatečném rozpuštění jsme objem pufru doplnili do 100 ml. Kádinka se vzniklým roztokem se musela obalit alobalem a vložit do lednice, protože pufr je citlivý na světlo. Pro stanovení kalibrační křivky, jsme připravili zásobní roztok FeSO₄, který vznikl smícháním 27,8 mg FeSO₄ x 7 H₂O s 62,5 ml 25% HCl. Po rozpuštění na míchačce se objem roztoku doplnil do 100 ml a uskladnil za laboratorní teploty. Kalibrační křivka se vytvořila dle následujícího postupu. Zásobní roztok jsme naředili 10x. Do ependorfek jsme napipetovali 0,5 M HCl a roztok FeSO₄ v množství dle následující tabulky.

Tabulka 2 znázorňuje poměr jednotlivých složek výsledného roztoku pro vytvoření kalibrační křivky.

standard	0,5 M HCl (μl)	FeSO ₄ (μl)
80	50	200
70	75	175
60	100	150
50	125	125
40	150	100
30	175	75
20	200	50
10	225	25
8	230	20
6	235	15
4	240	10
0	250	0

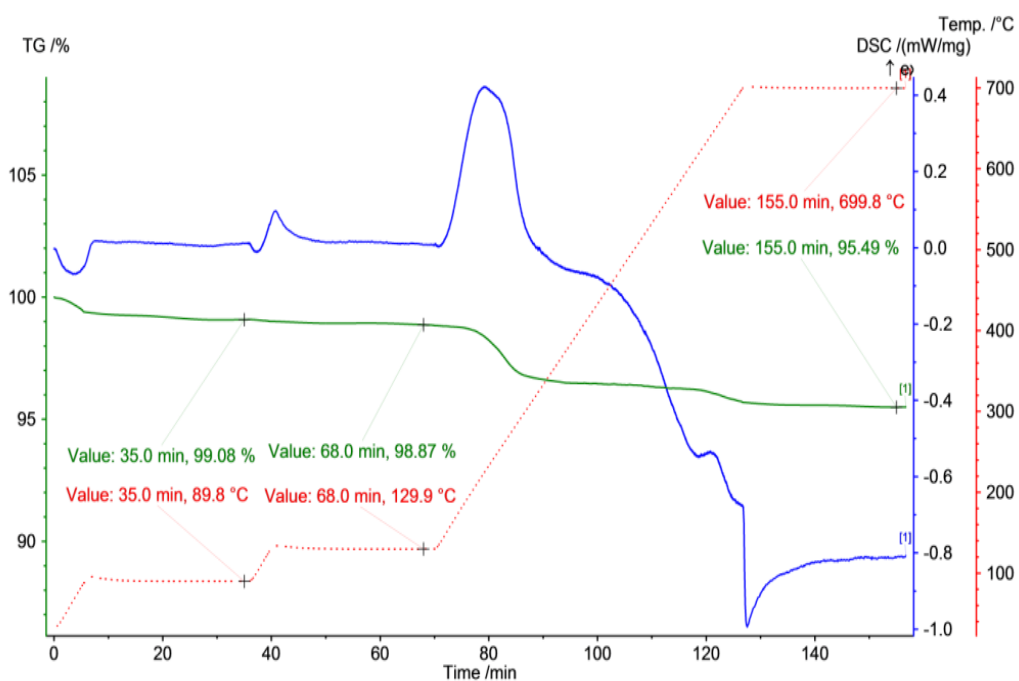
Do jednotlivých ependorfek bylo postupně přidáno 250 μl redukčního pufru s 15 minutovým „stáním“ a 500 μl ferrozínového pufru s 10 minutovým „stáním“. Nakonec jsme změřili vlnovou délku vzorků při 562 nm. Po zhotovení kalibrační křivky jsme přešli na stanovení koncentrace železa, při které jsme postupovali následovně. Do ependorfky se šroubovacím uzávěrem a těsněním jsme napipetovali 90 μl 65% kyseliny dusičné (HNO₃) a 10 μl vzorku. Vzorek se nechal rozpustit po dobu 30 minut ve vodní lázni o teplotě 98°C. Po inkubaci se ke vzorku přidalo 900 μl 0,5 M HCl. Poté jsme si připravili vzorky smícháním 250 μl vzorku s 250 μl redukčního pufru a nechali 15 minut stát. Nakonec jsme přidali 500 μl ferrozínového pufru a nechali dalších 10 minut stát. Následovalo měření absorbance při vlnové délce 562 nm. Z hodnot absorbance jednotlivých

vzorků lze vypočítat výsledné hodnoty koncentrace. Absorbance vzorku smCMC-Ar měla hodnotu $A = 0,355$, zatímco u vzorku smbisCOOH-CH $A = 0,268$. Pomocí výpočetního programu jsme získali hodnoty koncentrace. Vzorek smCMC-Ar obsahoval 4,246 mg/ml maghemitu. Druhý vzorek smbisCOOH-CH obsahoval 3,206 mg/ml maghemitu. Z těchto hodnot koncentrací jsme vycházeli v pozdějších fázích experimentů.

7.3 Termogravimetrická analýza

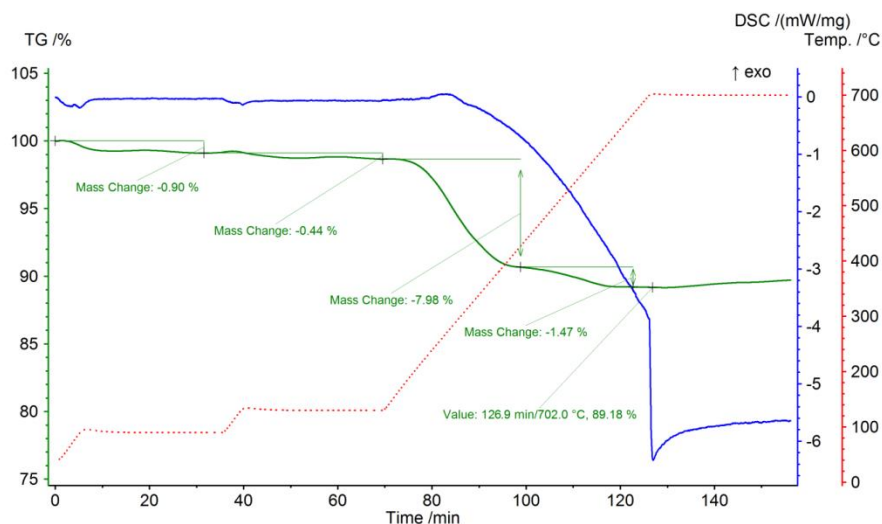
Při přípravě vzorků se postupovalo následovně. Na váze jsme si navážili 120 mg prášku KBr (bromid draselný). Přibližně 1/5 jsme si v drtítku rozdrtili na velmi jemný prášek, abychom zajistili relativně homogenní velikost jednotlivých zrn. Takto nadrcený KBr jsme nanесли na střed podložního sklíčka a dlouhou špachtličkou zarovnali. Následovalo přidání 50 μl vzorků smCMC-Ar, smbisCOOH-CH a 2x CMC. Vzniklé vzorky se vložily do pece a sušily se při teplotě 60°C. Za pomoci magnetu (abychom zamezili odskoku magnetických nanočástic) jsme usušený vzorek seškrábali ze sklíčka a smíchali se zbytkem, důkladně rozdrceného, KBr.

Obrázek 16. Graf představuje záznam TGA (termogravimetrické analýzy) – zelená křivka, a DSC (diferenční skenovací kalorimetrie) – modrá křivka, vzorku smCMC-Ar.



Na TG křivce (zelená) jsou vyznačeny charakteristické body, označující hmotnostní úbytek navážky. Tvar křivky ukazuje na termický rozklad v jednom kroku, ohraničený dvěma platy, což značí na ztrátu organické fáze. Celkový úbytek hmotnosti je 4,51%, při konečné teplotě 699,8°C za čas 155 min.

Obrázek 17. Graf představuje záznam TGA (termogravimetrické analýzy) a DSC (diferenční skenovací kalorimetrie) vzorku smbisCOOH-CH.



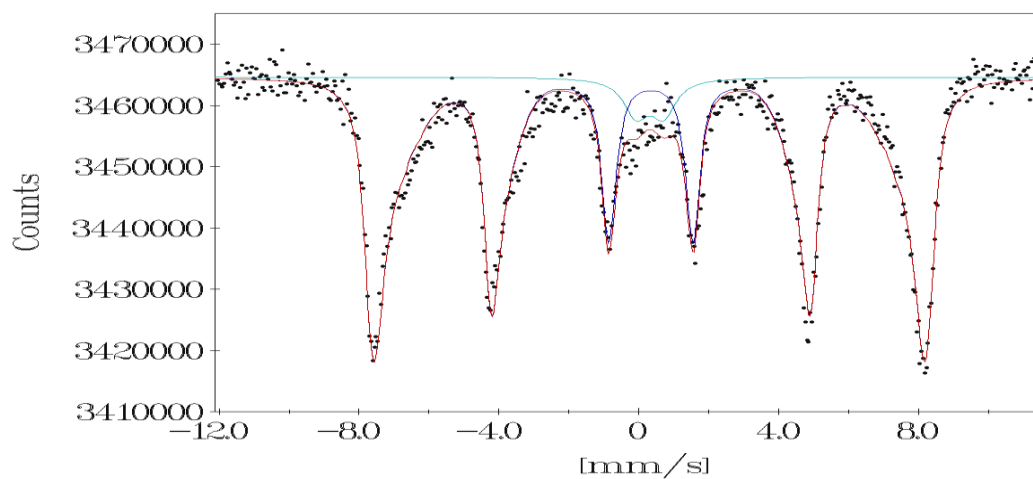
Na TG křivce (zelená) jsou vyznačeny charakteristické body, označující hmotnostní úbytek navážky. Tvar křivky ukazuje na termický rozklad v několika krocích, ohraničený platy, což značí na ztrátu organické fáze. Celkový úbytek hmotnosti je 10,82%, při konečné teplotě 700°C.

7.4 Mössbauerova spektroskopie

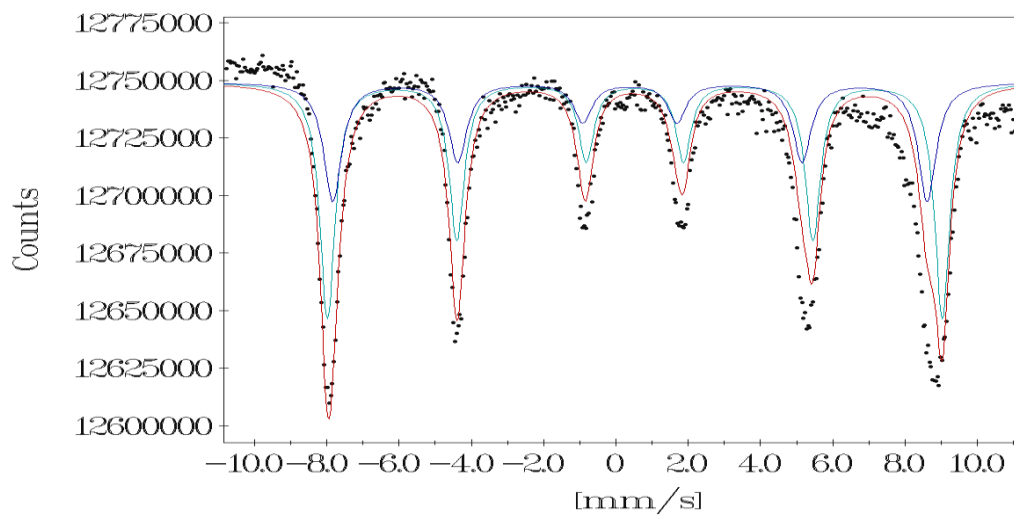
Tato metoda byla použita pro identifikování fáze oxidu železa a pro zjištění magnetického stavu nanočástic. Vzorky byly připraveny ve formě prášku a nanášeny na podložní sklíčko. Je kladen požadavek, aby povrch vzorku byl hladký a vytvořená vrstva byla homogenní, abychom zamezili přednostní orientaci krystalů. U obou vzorků bylo měření provedeno při teplotě 300 K a 20 K, navíc u vzorku smbisCOOH-CH bylo použito vnější pole o velikosti 5 T (spektrum není součástí práce).

Obrázek 18. Představuje Mössbauerovská spektra vzorku smCMC-Ar, při teplotě 300 K a 20 K.

300 K



20 K



Tabulka 3. Hodnoty mössbauerovských hyperjenných parametrů odvozených z naměřených mössbauerovských spekter vzorku smCMC-Ar, kde T je teplota

měření, δ je izomerní posun, ΔE_Q je kvadrupólové štěpení, B_{hf} je hyperjenné pole a RA je relativní spektrální ploch jednotlivých spektrálních komponent.

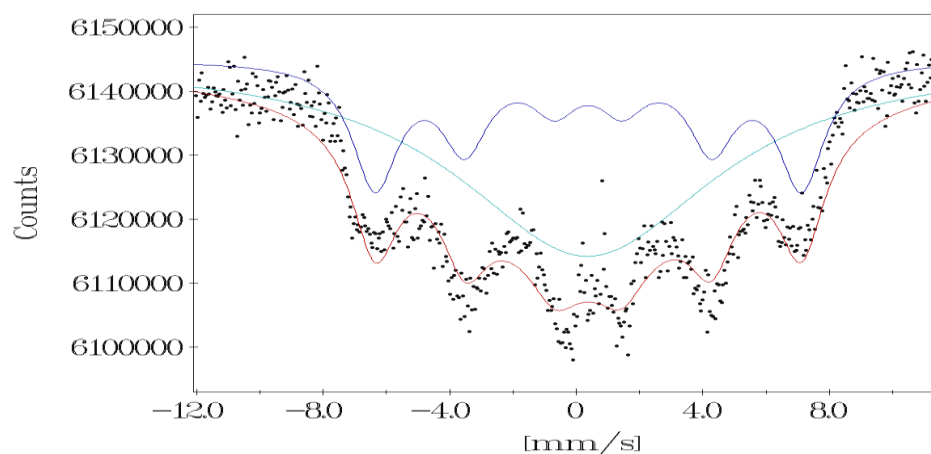
T (K)	Složka	δ ± 0.01 (mm/s)	ΔE_Q ± 0.01 (mm/s)	B_{hf} ± 0.3 (T)	RA ± 1 (%)	Přiřazení
300	Sextet	0.33	-0.04	47.1	94	γ -Fe ₂ O ₃ – nanočástice v zablokovaném stavu
	Dublet	0.33	0.79	-----	6	γ -Fe ₂ O ₃ – nanočástice v superparamagnetickém stavu
20	Sextet	0.38	0.00	51.1	37	Tetraedrické pozice γ -Fe ₂ O ₃
	Sextet	0.51	0.00	52.9	63	Oktaedrické pozice γ -Fe ₂ O ₃

- Při pokojové teplotě se většina částic nachází v magneticky zablokovaném stavu
- Pouze nejmenší nanočástice vykazují superparamagnetismus z pohledu měření Mössbauerovy spektroskopie – nejmenší částice v systému.
- Střední blokovácí teplota se nachází pod 300 K (určována jako teplota, kdy spektrální plocha sextetu se rovná spektrální ploše dubletu.
- Z hodnoty izomerního posunu vyplývá, že železo je v trojmocném stavu (Fe^{III}) a ve vysokospinovém stavu ($S = 5/2$).
- Hodnota hyperjenného pole sextetu odpovídá hodnotám běžně pozorovaným pro nanočásticové systémy γ -Fe₂O₃ původu.
- S poklesem teploty dochází k magnetickému zablokování nejmenších nanočástic v systému – při 20 K jsou všechny nanočástice přítomné v souboru magneticky zablokovány.
- Lze rozlišit dvě spektrální komponenty s hodnotami hyperjenných parametrů odpovídajících tetraedrickým a oktaedrickým pozicím γ -Fe₂O₃.
- Spektrální poměr tetraedrické sextetu ku oktaedrickému sextetu je 1:1,66, což přesně odpovídá stechiometrickému γ -Fe₂O₃, kdy tetraedrické pozice jsou všechny obsazeny Fe³⁺ ionty a pouze 5/3 oktaedrických pozic je obsazeno Fe³⁺ ionty; zbylé oktaedrické pozice jsou vakantní v důsledku zachování neutrálního elektrického náboje skrz mřížku (takže vakance je nositelem virtuálního záporného náboje).

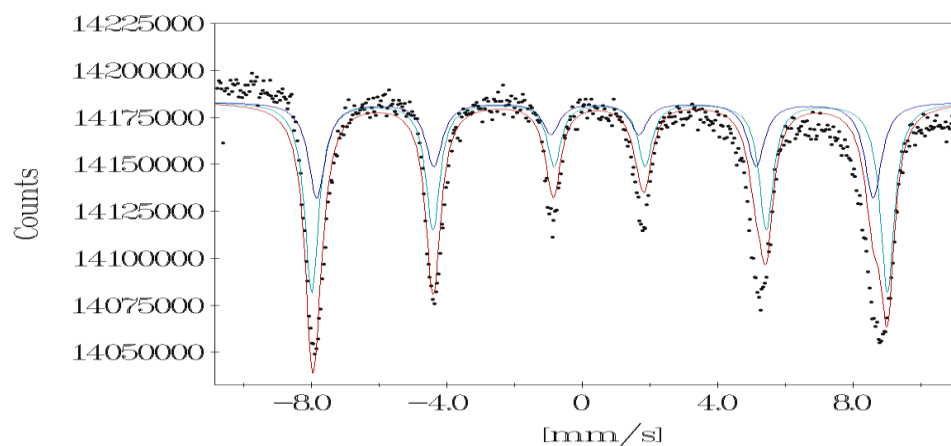
- Ze spektra (neukázáno) při nízké teplotě (5K) a ve vnějším magnetickém poli (5T) byly rovněž identifikovány dvě spektrální komponenty (sextety), odpovídající tetraedrickým a oktaedrickým pozicím γ -Fe₂O₃ spinelové struktury; jejich spektrální poměr byl 1:1,66 ve prospěch oktaedrického sextetu; tato hodnota byla použita při fitu spektra při 20 K.
- Z profilu spektra při pokojové teplotě lze usoudit, že většina částic je větších než 15 nm.
- Dublet dávají částice, které jsou menší než 15 nm.

Obrázek 19. Představuje Mössbauerovská spektra vzorku smbisCOOH-CH, při teplotě 300 K a 20 K.

300 K



20 K



Tabulka 4. Hodnoty mössbauerovských hyperjemných parametrů odvozených z naměřených mössbauerovských spekter vzorku smbisCOOH-CH, kde T je teplota měření, δ je izomerní posun, ΔE_Q je kvadrupólové štěpení, B_{hf} je hyperjemné pole a RA je relativní spektrální ploch jednotlivých spektrálních komponent.

T (K)	Složka	δ ± 0.01 (mm/s)	ΔE_Q ± 0.01 (mm/s)	B_{hf} ± 0.3 (T)	RA ± 1 (%)	Přiřazení
300	Sextet	0.33	0.04	41.9	31	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ – nanočástice v zablokovaném stavu
	Singlet	0.33	-----	-----	69	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ – nanočástice v superparamagnetickém stavu
20	Sextet	0.38	0.00	51.1	37	Tetraedrické pozice $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
	Sextet	0.52	0.00	52.9	63	Oktaedrické pozice $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

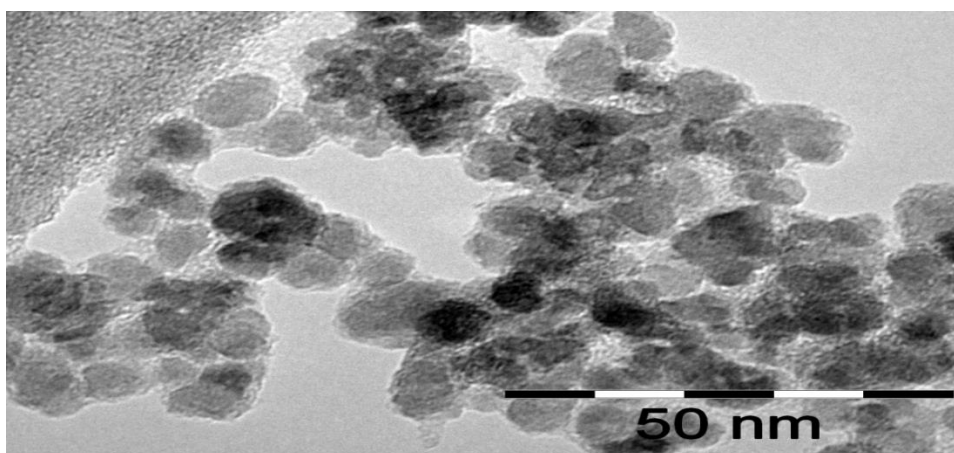
- Při pokojové teplotě se většina částic nachází v superparamagnetickém stavu jak demonstruje přítomnost singletu.
- Střední blokovací teplota se nachází nad 300 K.
- Z hodnoty izomerního posunu vyplývá, že železo je v trojmocném stavu (Fe^{III}) a ve vysokospinovém stavu ($S = 5/2$).
- Hodnota hyperjemného pole sextetu odpovídá hodnotám běžně pozorovaným pro nanočásticové systémy $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ původu.
- S poklesem teploty dochází k magnetickému zablokování nejmenších nanočástic v systému – při 20 K jsou všechny nanočástice přítomné v souboru magneticky zablokovány.
- Lze rozlišit dvě spektrální komponenty s hodnotami hyperjemných parametrů odpovídajících tetraedrickým a oktaedrickým pozicím $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.
- Spektrální poměr tetraedrické sextetu ku oktaedrickému sextetu je 1:1,66, což přesně odpovídá stechiometrickému $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, kdy tetraedrické pozice jsou všechny obsazeny Fe^{3+} ionty a pouze 5/3 oktaedrických pozic je obsazeno Fe^{3+} ionty; zbylé oktaedrické pozice jsou vakantní v důsledku zachování neutrálního elektrického náboje skrz mřížku (takže vakance je nositelem virtuálního záporného náboje).

- Ze spektra při nízké teplotě (5K) a ve vnějším magnetickém poli (5T) byly rovněž identifikovány dvě spektrální komponenty (sextety), odpovídající tetraedrickým a oktaedrickým pozicím γ -Fe₂O₃ spinelové struktury; jejich spektrální poměr byl 1:1,66 ve prospěch oktaedrického sextetu; tato hodnota byla použita při fitu spektra při 20 K.
- Z profilu spektra při pokojové teplotě lze usoudit, že většina částic je menších než 15 nm.
- Singlet dávají částice, které jsou menší nebo rovny 15 nm.
- Systému obsahuje menší částice než systém smCMC–Ar.

7.5 Transmisní elektronová mikroskopie

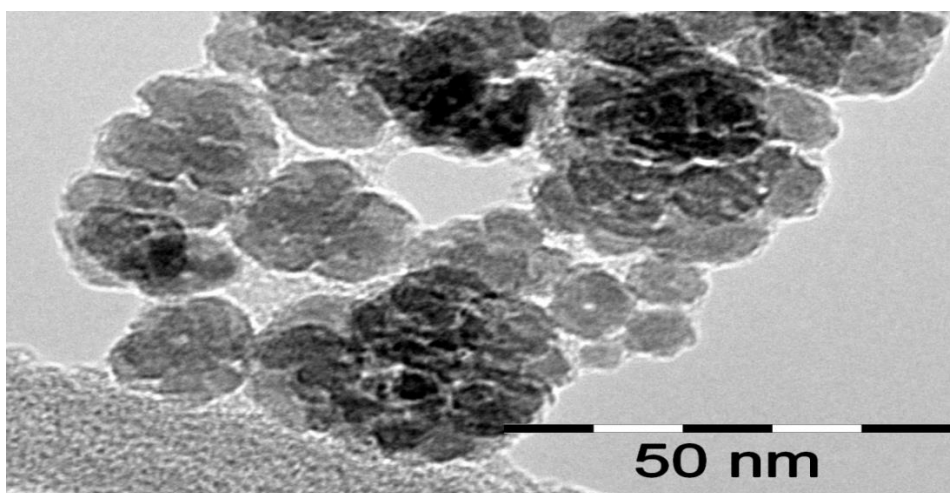
Transmisní elektronovou mikroskopii podstoupily oba vzorky nanočástic, tedy smCMC-Ar i smbisCOOH-CH. V obou případech se velikost nanočástic pohybuje mezi 5 nm – 50 nm. Na mikroskopických snímcích lze pozorovat strukturu „core-shell“ nanočástic. Tedy jádro, které je tvořeno oxidy železa a obal, tvořen organickým polymerem, chitosanem. Příprava vzorků na TEM spočívala ve vysušení roztoku, ve kterém se nacházely nanočástice.

Obrázek 20. Ukazuje snímek z TEM (transmisní elektronové mikroskopie) vzorku smbisCOOH-CH.



Nanočástice vykazují sférický charakter s „core-shell“ strukturou. Na skenu jde snáze rozlišit magnetické jádro a polymer (chitosan) obalující celou nanočástici. Velikostní distribuce nanočástic vzorku smbisCOOH-CH se pohybuje od 5 nm do 30 nm.

Obrázek 21. Ukazuje snímek z TEM (transmisní elektronové mikroskopie) vzorku smCMC-Ar.



Nanočástice u vzorku smCMC-Ar vykazují také sférický charakter s „core-shell“ strukturou, ovšem je zřetelné tvoření aglomerátů. Polymer, kterým je v tomto případě karboxymethylceluloza, obaluje celý vzniklý útvar. Částice jsou u toho vzorku zřetelně větší a jejich velikostní distribuce se pohybuje od 10 nm do 50 nm.

7.6 Dynamický rozptyl světla

Fyzikální metoda, kterou lze měřit hydrodynamický poloměr nanočástic v koloidním roztoku. Měření probíhalo na přístroji Zeta nanosizer, kterým disponuje katedra Fyzikální chemie – Přf UP. Pro potřeby měření bylo připraveno 23 od každého vzorku nanočástic, celkově tedy 46. K ředění roztoků byl použit roztok NaCl o rozdílných molárních koncentracích, viz. následující tabulka.

Tabulka 5 popisuje výrobu vzorků, na kterých byl měřen hydrodynamický poloměr.

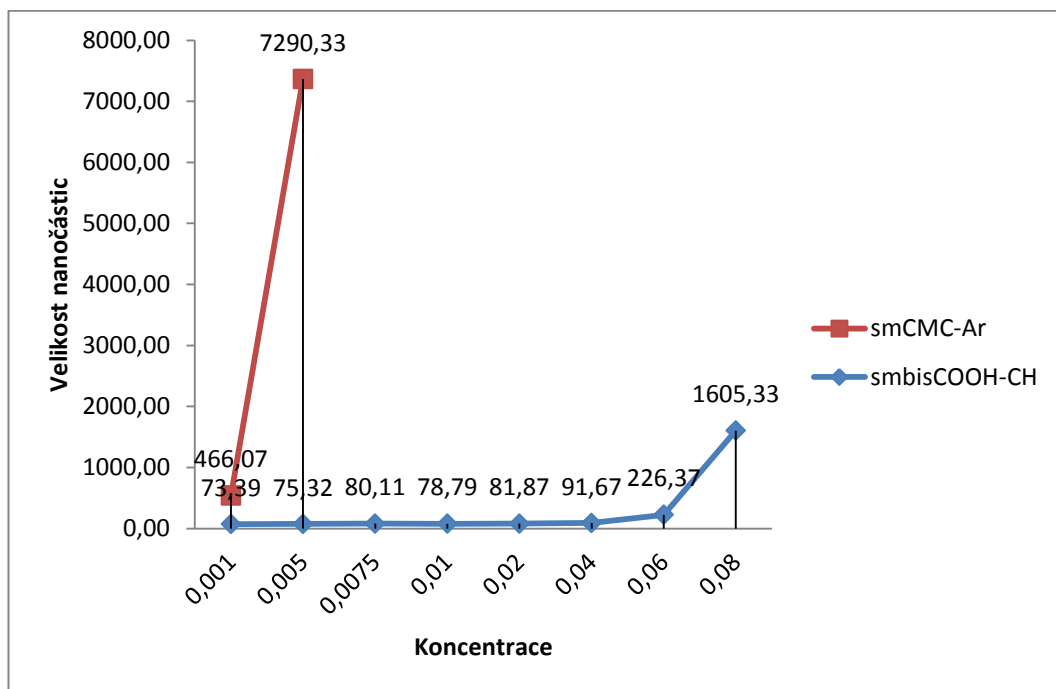
vzorek číslo	molární koncentrace NaCl (M)	množství NaCl (μ l)	množství vzorku smbisCOOH-CH (μ l)	množství vzorku smCMC-Ar (μ l) + ddH ₂ O (μ l)
1	0,001	450	50	25 + 25
2	0,005	450	50	25 + 25
3	0,0075	450	50	25 + 25
4	0,01	450	50	25 + 25
5	0,02	450	50	25 + 25
6	0,04	450	50	25 + 25
7	0,06	450	50	25 + 25
8	0,08	450	50	25 + 25
9	0,1	450	50	25 + 25
10	0,12	450	50	25 + 25
11	0,14	450	50	25 + 25
12	0,15	450	50	25 + 25
13	0,16	450	50	25 + 25
14	0,18	450	50	25 + 25
15	0,2	450	50	25 + 25

16	0,3	450	50	25 + 25
17	0,4	450	50	25 + 25
18	0,5	450	50	25 + 25
19	0,6	450	50	25 + 25
20	0,7	450	50	25 + 25
21	0,8	450	50	25 + 25
22	0,9	450	50	25 + 25
23	1	450	50	25 + 25

První měření velikosti koloidních částic bylo provedeno s roztokem ředěným ddH₂O. Vzorek smbisCOOH-CH obsahoval částice s průměrnou velikostí (Z-Average) 103 nm a u vzorku smCMC-Ar byla průměrná velikostní distribuce 122 nm.

Měření koloidních částic zředěných NaCl se uskutečnilo ve třech krocích. Z jednotlivých výsledků se vyhotovil aritmetický průměr. Dle křivky lze pozorovat změnu velikosti koloidních částic, vzhledem k různé molární koncentraci roztoku. Z níže uvedeného grafu lze pozorovat pokles hydrodynamického poloměru. Pokles je způsoben smršťováním částic vlivem prostředí. U vzorku smCMC-Ar se objevovala vysoká míra agregace, proto měření podstoupily pouze 2 vzorky. Lidskému tělu se nejvíce blíží molární koncentrace 0,2 M, ale v tomto případě je velikost částic 12 024 nm, tedy už nelze mluvit o nanočásticích.

Obrázek 22. Graf znázorňuje velikostní distribuci podle hydrodynamického poloměru částic.



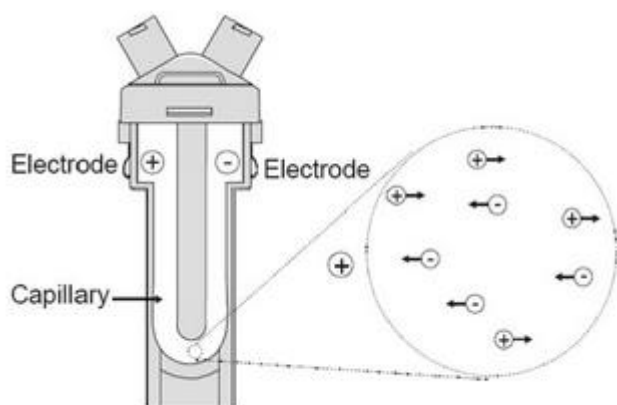
Při vložení koloidních částic do roztoku NaCl dojde ke zmenšení hydrodynamického poloměru, protože dojde ke smrštění nanočástic v důsledku vnějšího prostředí.

7.7 Zeta potenciál

Zeta potenciál popisuje povrchový náboj částic v roztoku. Pro měření je použit stejný přístroj, jako u dynamického rozptylu světla, tedy Zeta Nanosizer. Rozdíl

je pouze v použité kyvetě, která obsahuje na svém povrchu elektrody, viz. obrázek (č.23). Hodnota náboje na povrchu vzorku smbisCOOH-CH byla -43,9 mV, u vzorku smCMC-Ar -43,3 mV.

Obrázek 23. Kyveta používaná při měření Zeta potenciálu



Zdroj: Převzato a upraveno z
<http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/zetasizer.html>

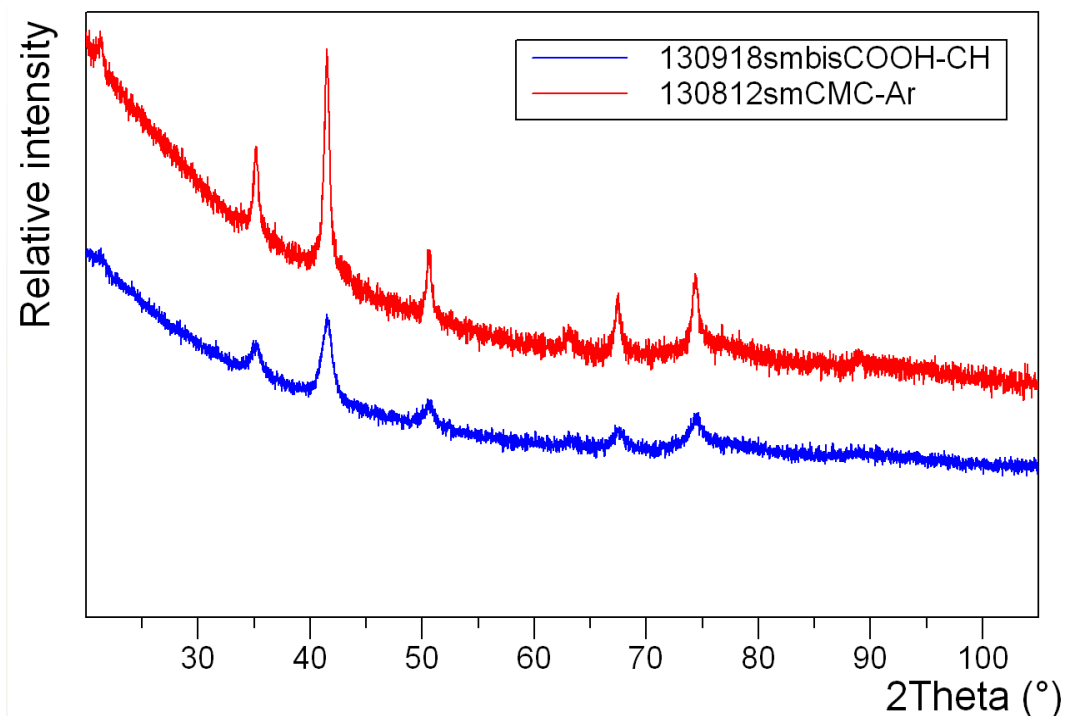
7.8 Rentgenová prášková difrakce

Vzorek na měření pomocí XRD byl připraven následujícím procesem. Na podložní sklíčka se nakápl 300 μ l vzorku, který byl vložen do nádoby, kde jsme vytvořili vakuum a za tohoto stavu vzorky vysušili. Existují obecné požadavky, které musí práškový vzorek splňovat. Musí být plochý s hladkým povrchem, kvůli Bragg-Brentanově geometrii s maximální tloušťkou 3 mm.

Tabulka 6 ukazuje výstupy z provedeného měření. U jednotlivých vzorků můžeme pozorovat střední velikost koherentních domén (MCL) a mřížkový parametr a .

Navez vzorku	Datum mereni	Datum fitu	Magnetit/maghemit		
			Zast. (hm.%)	MCL (nm)	a (Å)
130918SmbisCOOH_CH	1.9.	2.9.	100	10	8,355(magh)
130812SmCMC_Ar	1.9.	2.9.	100	23	8,372(mezi)

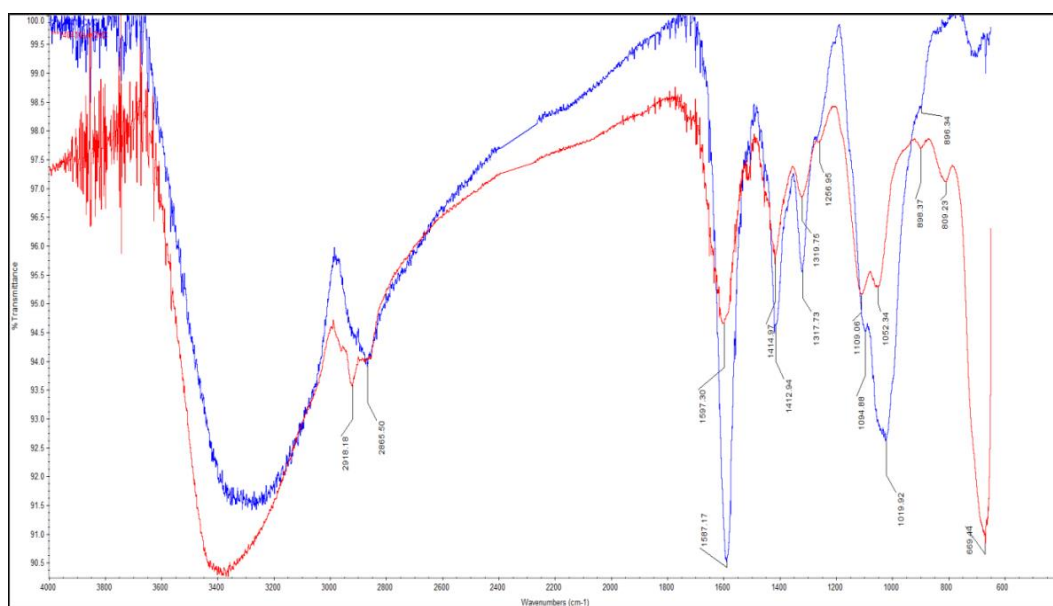
Obrázek 24. Zachycuje difraktogram vzorků smbisCOOH-CH (modrý) a smCMC-Ar (červený).



Difrakční záznam nám poukazuje na podíl amorfní a krystalické fáze. Tvar difrakčních píků je charakteristickým rysem krystalinity. Z vodorovné osy můžeme posoudit velikost parametru d , který udává mezivrstevnou vzdálenost v mřížce..

7.9 Infračervená spektroskopie

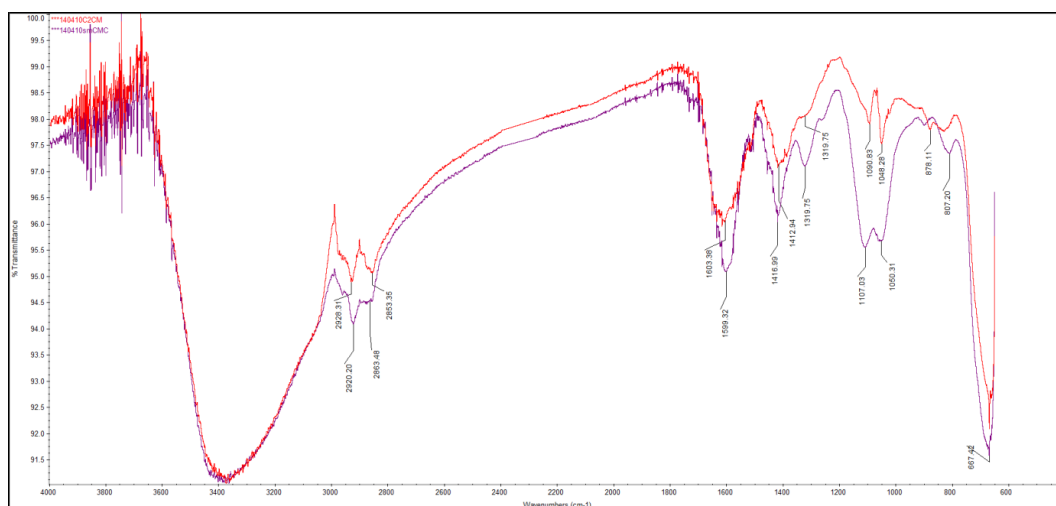
Obrázek 25. Graf představuje 2 IČ spektra. Spektrum označené modře přísluší polymeru CMC (karboxymethyl celulóza), červené označuje nanočástice smCMC-Ar obalené tímto polymerem.



V infračerveném spektru jsou dva záznamy (viz. nadpis grafu). Ze spektra lze vyčíst charakteristické vibrace pro určité chemické skupiny. V oblasti 3400 cm^{-1} se vyskytují vibrace typické pro skupinu O-H, v oblasti kolem 2900 cm^{-1} C-H skupina, C=O sk. v oblasti 1600 cm^{-1} a stejné skupiny, tedy C=O, se vyskytují

i okolo 1400 cm^{-1} , nakonec C-O skupiny můžeme pozorovat okolo 1100 cm^{-1} . Z červené křivky můžeme sledovat posunutí transmittance v důsledku vazby polymeru na povrch nanočástic. [34]

Obrázek 26. Graf představuje 2 IČ spektra. Spektrum označené modře přísluší polymeru bisCOOH-CH (biskarboxychitosan), červené označuje nanočástice smbisCOOH-CH obalené tímto polymerem.



Tato spektra vykazují podobné charakteristické vibrace, jako předchozí vzorek.

7.10 Syntéza komplexu SPION-DOXORUBICIN

Důležitou součástí řady experimentů bylo vytvoření kalibrační křivky, pro pozdější výpočet koncentrací imobilizovaného doxorubicinu.

7.10.1 Spektroskopické stanovení doxorubicinu

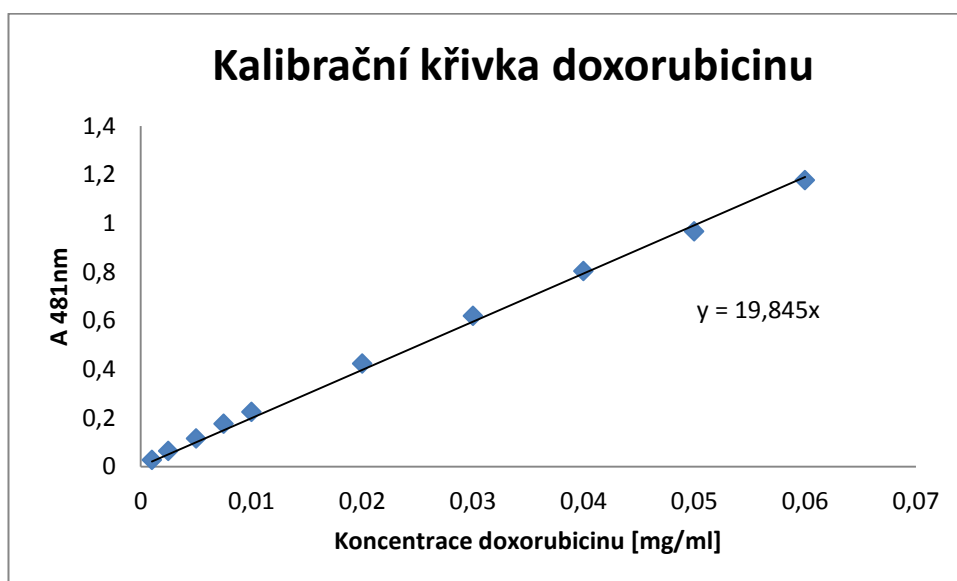
Doxorubicin Adriblastina s koncentrací 10 mg / 5 ml dodalo cytostatické oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Určení maxima absorbance probíhalo v rozmezí vlnových délek 450 nm – 550 nm. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána při vlnové délce 481 nm [24]. Následujícím bodem bylo vyhotovení kalibrační křivky, pomocí ředění doxorubicinu ve vodě, dle následující tabulky, a následné změření absorbance pomocí spektrometru, při vlnové délce 481 nm.

Tabulka 6 popisuje koncentraci doxorubicinu v roztoku a jeho absorbanci, ze které byla vytvořena kalibrační křivka

Koncentrace (mg/ml)	Absorbance ($\lambda_{481\text{nm}}$)
0,001	0,027
0,0025	0,063
0,005	0,114
0,0075	0,175
0,01	0,224
0,02	0,423
0,03	0,618
0,04	0,803
0,05	0,966
0,06	1,177

Sestavením grafu závislosti koncentrace doxorubicinu na absorbanci získáme přímku, kterou nazýváme kalibrační křivkou, z níž vypočítáme důležitý parametr k , tedy směrnici přímky. Hodnota směrnice přímky je využita pro výpočet koncentrace imobilizovaného doxorubicinu v pozdějších stádiích experimentu.

Obrázek 27. Graf představuje vzniklou kalibrační křivku včetně její směrnice



7.10.2 Imobilizace doxorubicinu na magnetický nosič

Syntéza se prováděla dle postupu [24]. Vytvořeno bylo několik sad roztoků s lišícími se poměry přidávaných nanočástic a doxorubicinu doplněných o vodu, dle následující tabulky.

Tabulka 7 zobrazuje mísící poměr jednotlivých roztoků

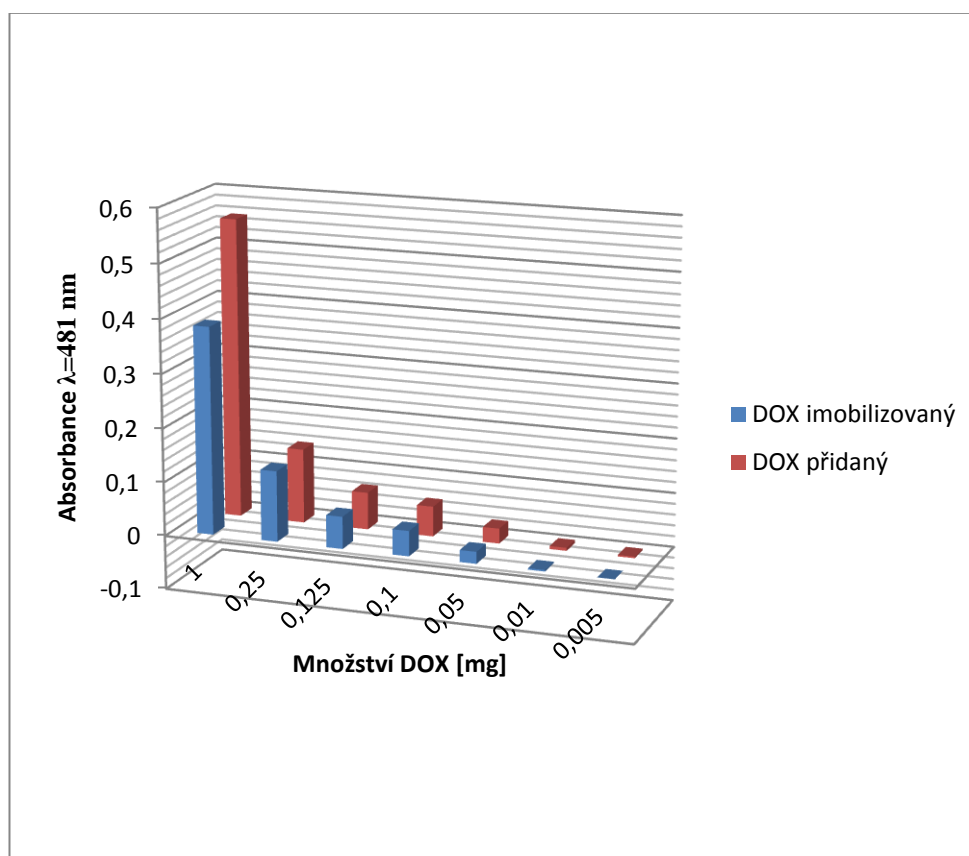
Poměr	Nanočástice (μl)	Doxorubicin (μl)	Voda (μl)	Nanočástice (μl)	Doxorubicin (μl)	Voda (μl)
	smCMC-AR			smbisCOOH-CH		
1:1	429	500	871	403	500	897
4:1	429	125	1246	403	125	1272
8:1	429	62,5	1308,5	403	62,5	1334,5
10:1	429	50	1321	403	50	1347
20:1	429	25	1346	403	25	1372
100:1	429	5	1366	403	5	1392
200:1	429	2,5	1368,5	403	2,5	1394,5

Směs se inkubovala na třepačce, při pokojové teplotě (25°C), po dobu 24 hodin. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 2 hodin, při 20 000 g. Při tomto procesu vznikl supernatant, který jsme pomocí pipety oddělili od zbytku vzorku. Ze supernatantu jsme spektroskopicky určili množství imobilizovaného doxorubicinu na povrchu nanočástic. Nanočástice s vyvázaných doxorubicinem jsme resuspendovaly v 1 ml H₂O pro pozdější využití. Následné grafy představují závislost koncentrace imobilizovaného doxorubicinu vzhledem k původní koncentraci samotného doxorubicinu.

Tabulka 8 představuje jednotlivé roztoky vzorku *smbisCOOH-CH* s Doxorubicinem.

č. vzorku	mg DOX	ředění	Absorbance (λ 481nm)	Koncentrace (mg/ml)	Imobil. koncentrace (mg/ml)	původní koncentrace (mg/ml)	Kvantiﬁkace (%)
1	1	10	0,338	0,17032	0,38468002	0,555	69,3
2	0,25	1	0,138	0,0069539	0,13104611	0,138	95,0
3	0,125	1	0,185	0,0093222	0,05967775	0,069	86,5
4	0,1	1	0,18	0,0090703	0,04662971	0,0557	83,7
5	0,05	1	0,114	0,0057445	0,02195548	0,0277	79,3
6	0,01	1	0,058	0,0029227	0,00262735	0,00555	47,3
7	0,005	1	0,06	0,0030234	-0,0002464	0,002777	-8,9

Obrázek 28. Graf znázorňuje rozdíl v množství doxorubicinu připadaného do reakce (červený sloupec) a doxorubicinu imobilizovaného na povrch smbisCOOH-CH (modrý sloupec).

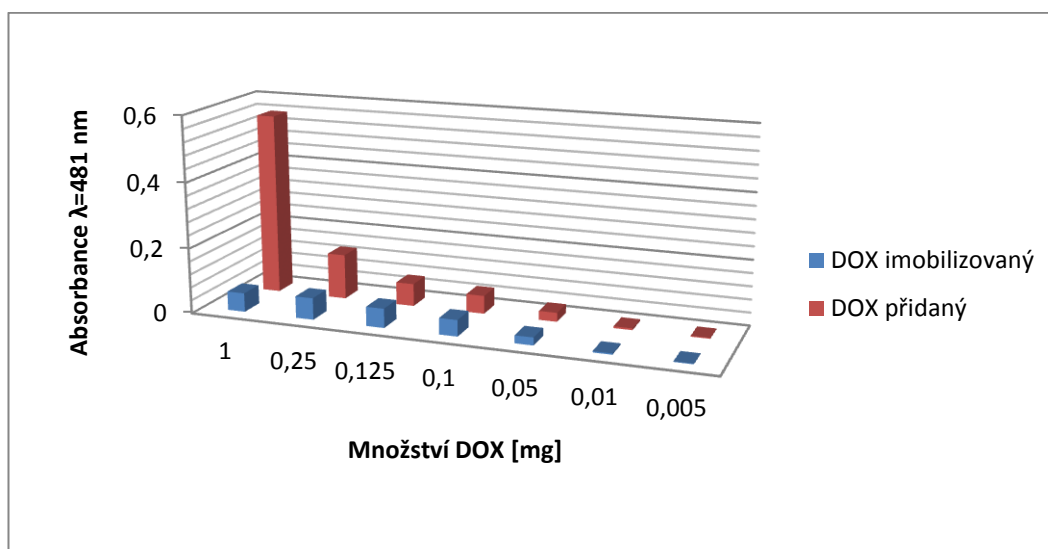


U vzorku smbisCOOH-CH jsme se u 0,005 mg přidáného doxorubicinu pohybovali v záporných číslech. Tuto chybu jsme přisoudili problému při pipetování roztoku. Pro další pokusy byly vybrány vzorky číslo 2,3,4, které vykazovaly nejvyšší procento vyvázaného doxorubicinu.

Tabulka 9 představuje jednotlivé roztoky vzorku smCMC-Ar s Doxorubicinem

č. vzorku	mg DOX	řadě ní	Absorbance (λ 481nm)	Koncentrace (mg/ml)	Imobil. koncentrace (mg/ml)	původní koncentrace (mg/ml)	Kvanti fikace (%)
1	1	10	0,987	0,4973545	0,0576455	0,555	10,4
2	0,25	1	1,417	0,0714034	0,06659662	0,138	48,3
3	0,125	1	0,198	0,0099773	0,05902268	0,069	85,5
4	0,1	1	0,114	0,0057445	0,04995548	0,0557	89,7
5	0,05	1	0,077	0,0038801	0,02381993	0,0277	86,0
6	0,01	1	0,035	0,0017637	0,00378633	0,00555	68,2
7	0,005	1	0,022	0,0011086	0,00166841	0,002777	60,1

Obrázek 29. Graf znázorňuje rozdíl v množství doxorubicinu připadaného do reakce (červený sloupec) a doxorubicinu imobilizovaného na povrch smCMC-Ar (modrý sloupec)



Nejvyšší procentuální vyvázání doxorubinu vykazovaly vzorky číslo 3,4,5, a sice v rozmezí 85,5 % - 89,7 %. Tyto vzorky však podlely celkové agregaci, proto je nebylo možné použít v dalších částech experimentu.

8 Testy na buňkách

8.1 Značení buněk

Myší fibroblasty poskytl a pro značení připravila Mgr. Markéta Havrdová. Značení probíhalo v sterilních podmínkách flow boxu, abychom zamezili kontaminaci vzorku mikroorganismy, či jinými vnějšími nečistotami. Vzorky byly připraveny do kultivační destičky. Pro účel našeho experimentu bylo obsazeno 12 kultivačních jamek. Roztok, který vznikl při předchozí práci byl naředěn do koncentrací 5 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$. Před podáním roztoků buňkám, jsme nejprve odebrali kultivační roztok z kultivačních jamek. Celkový objem tohoto roztoku jsme zvolili 500 μl a dle vzorce $c_1V_1 = c_2V_2$ určili poměr roztoku a růstového média. Takto označené buňky jsme vložili do inkubátoru a nechali 24 hodin kultivovat. Poté jsme vzorek vložili do flowboxu, čímž jsme zamezili kontaminaci vzorku cizorodým materiálem či mikroorganismy.

Obrázek 30. Zachycuje připravené roztoky různého složení a různých koncentrací. SPIO+DOX je roztok superparamagnetických nanočástic s doxorubicinem, SPIO+DOX (dialyzované) je roztok, který podstoupil tuto proceduru oddělující větší agregáty od samotných nanočástic s lékem na povrchu. SPIO jsou samotné superparamagnetické nanočástice.



Závěr

Kvantifikace výsledků imobilizace doxorubicinu na povrch nanočástic, byla významným výsledkem. Nejvyšší procento imobilizace (95,5%) bylo zjištěno u roztoku s poměrem NPs:Dox 4:1 vzorku smbisCOOH-CH. Vzorek smCMC-Ar vykazoval 89,7% imobilizace přidaného doxorubicinu u roztoku s poměrem NPs:Dox 10:1. Tento rozdíl jsme přisoudili dvojitě COOH skupině na povrchu nanočástic vzorku smbisCOOH-CH, na které se doxorubicinu váže pomocí NH₂ (amino) skupin.

Měření hydrodynamického poloměru pomocí metody DLS (obrázek 22.) ukazuje, že vzorek smCMC-Ar vykazuje menší míru stability v koloidním prostředí a tudíž se nanočástice mají tendenci shlukovat. Naneštěstí se nám nepodařilo přiblížit stabilitě u koncentrace, která se nachází v lidském těle.

Značení buněk nanočásticemi vzorku smbisCOOH-CH s imobilizovaným doxorubicinem na povrchu úspěšné nebylo. První značení bylo provedeno s chybně vypočítanými koncentracemi použitých roztoků, a proto došlo k masivní apoptóze a zkreslení výsledků. Druhé značení buněk nebylo úspěšné z blíže nepochopeného důvodu, protože došlo k vymření všech buněk, které byly vystaveny našemu roztoku i kontrolní skupiny, která byla umístěna na opačné straně kultivační destičky. Neúspěch těchto experimentů přisuzuji své nezkušenosti při manipulaci s buněčnými kulturami. Ve značení buněk bych chtěl pokračovat v dalším studiu, stejně jako v provedení testů toxicity koloidního roztoku s komplexem nanočástice-doxorubicin. V neposlední řadě bych velmi rád zjistil příčinu uhynutí veškerých buněk (tedy i kontrolní skupiny), kdy, dle optického mikroskopu s filtrem, nedošlo ke kontaminaci kontrolní skupiny buněk.

Literatura

- [1] DROFENIK, M., FERK, G., KRISTL, M., MAKOVEC, D. Synthesis and characterization of maghemite nanosheets. *Materials Letters*, 2011 (15 February), vol. 65, no. 3, p. 439–441.
- [2] KALSKA-SZOSTKO, B., WYKOWSKA, U., PIEKUT, K., SATUŁA, D. Stability of Fe₃O₄ nanoparticles in various model solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014 (20 May), vol. 450, p. 15–24.
- [3] TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in Cardiovascular Diseases* **2007**, 49 (5), 330–352.
- [4] KULBACKA, J., DACZEWSKA, M., DUBIŃSKA-MAGIERA, M., CHOROMAŃSKA, A., REMBIAŁKOWSKA, N., SUROWIAK, P., KULBACKI, M., KOTULSKA, M., SACZKO, J. Doxorubicin delivery enhanced by electroporation to gastrointestinal adenocarcinoma cells with P-gp overexpression. *Bioelectrochemistry*, 2014, 4. April.
- [5] NITIN K. SWARNAKAR, PHARM, M., THANKI, K., JAIN, S. Enhanced antitumor efficacy and counterfeited cardiotoxicity of combinatorial oral therapy using Doxorubicin- and Coenzyme Q10-liquid crystalline nanoparticles in comparison with intravenous Adriamycin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2014, vol. 10, no. 6, p. 1231–1241.
- [6] Gossuin, Y.; Gillis, P.; Hocq, A.; L Vuong, Q.; Roch, A. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2009 (May/June), 1 (3), 299–310.

- [7] VŮJTEK, M., KUBÍNEK, R., MAŠLÁŇ, M. *Nanoskopie*. 1.st ed. Olomouc: Univerzita Palackého, 2012.
- [8] Tuček, J. Nanometrické polymorfy oxidu železitého, jejich magnetické vlastnosti a aplikační potenciál. HABILITAČNÍ PRÁCE, Univerzita Palackého v Olomouc, 2012.
- [9] BUDIME SANTHOSH, P., POKLAR ULRIH, N. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Letters*, 2013 (August), vol. 336, no. 1, p. 8–17.
- [10] TUČEK, J. *Magnetismus nanočástic oxidů železa a dvojného perovskitu typu Sr₂FeRuO₆: PhD Thesis*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2008.
- [11] LEE, Ch., JEONG, H., KIM, S., KIM, E., WOOK KIM, D., TAE LIM, S., YOON JANG, K., YEON JEONG, Y., NAH, J., SOHN, M. SPION-loaded chitosan–linoleic acid nanoparticles to target hepatocytes. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009 (17 April), vol. 371, no. 1-2, p. 163–169.
- [12] ARRUEBO, M., FERNÁNDEZ-PACHECO, R., RICARDO IBARRA, M., SANTAMARÍA, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2007 (June), vol. 2, no. 3, p. 22–32.
- [13] DELIGÖZ, H., BAYKAL, A., ŞENEL, M., SÖZERI, H., KARAOĞLU, E., TOPRAK, M. Synthesis and characterization of poly(1-vinyltriazole)-grafted superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Synthetic Metals*, 2012 (May), vol. 162, no. 7-8, p. 590–597.
- [14] ALLARD-VANNIER, E., COHEN-JONATHAN, S., GAUTIER, J., HERVÉ-AUBERT, K., MUNNIER, E., SOUCÉ, M., LEGRAS, P., PASSIRANI, C., CHOURPA, I. Pegylated magnetic nanocarriers for doxorubicin delivery: A quantitative determination of stealthiness in vitro and in vivo. *European Journal*

of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012 (August), vol. 81, no. 3, p. 498–505.

[15] AGRAWAL, P., J. STRIJKERS, G., NICOLAY, K. Chitosan-based systems for molecular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010 (31 January), vol. 62, no. 1, p. 42–58.

[16] SARASWATHY, A., S. NAZEER, S., NIMI, N., ARUMUGAM, S., J. SHENOY, S., S. JAYASREE, R. Synthesis and characterization of dextran stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo MR imaging of liver fibrosis. *Carbohydrate Polymers*, 2014 (30 January), vol. 101, p. 760–768.

[17] DANHIER, F., ANSORENA, E., M. SILVA, J., COCO, R., LE BRETON, A., PRÉATA, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 2012 (July), vol. 161, no. 2, p. 505–522.

[18] AGUDELO, D., BOURASSA, P., BÉRUBÉ, G., ALI TAJMIR-RIAH, H. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014 (May), vol. 66, p. 144–150.

[19] KULBACKA, J., DACZEWSKA, M., DUBIŃSKA-MAGIERA, M., CHOROMAŃSKA, A., REMBIAŁKOWSKA, N., SUROWIAK, P., KULBACKI, M., KOTULSKA, M., SACZKO, J. Doxorubicin delivery enhanced by electroporation to gastrointestinal adenocarcinoma cells with P-gp overexpression. *Bioelectrochemistry*, 2014(4 April), p. 9.

[20] OCTAVIA, Y., G. TOCCHETTI, C., L. GABRIELSON, K., JANSSENS, S., J. CRIJNS, H., L. MOENS, A. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012 (March), vol. 52, p. 1213–1225.

- [21] LINCE, F., BOLOGNESI, S., STELLA, B., L. MARCHISIO, D., DOSIO, F. Preparation of polymer nanoparticles loaded with doxorubicin for controlled drug delivery. *Chemical Engineering Research and Design*, 2011 (November), vol. 89, no. 11, p. 2410–2419.
- [22] MAREK, J., TRÁVNÍČEK, Z. *Monokrystalová rentgenová strukturní analýza*. 1st ed. 2002. ISBN 8024405512.
- [23] NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ, L., RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody*. 2nd ed. 2004. ISBN 802460776X.
- [24] S. D. CONNER, S. L. SCHMID, Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 2003 (6 March), vol. 422, p. 37–44.
- [25] FILIPOVÁ, Z., KUKUTSCHOVÁ, J., MAŠLÁŇ, M. *Rizika nanomateriálů*. 1st ed. 2012. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [26] CHOMOUCKA, J., DRBOHLAVOVA, J., HUSKA, D., ADAM, V., KIZEK, R., HUBALEK, J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*, 2010 (August), vol. 62, no. 2, p. 144–149
- [27] CHATTERJEE, K., SARKAR, S., JAGAJJANANI RAO, K., PARIA, S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface, Science*, 2014 (14 January),
 [ONLINE:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868613001899>]
- [28] MURASE, K., TAKATA, H., TAKEUCHI, Y., SAITO, S. Control of the temperature rise in magnetic hyperthermia with use of an external static magnetic field. *Physica Medica*, 2013 (November), vol. 29, no. 6, p. 624–630.
- [29] E. DEATSCH, A., A. EVANS, B. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2014 (March), vol. 354, p. 163–172.

- [30] ZAMORA-MORA, V., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, M., SAN ROMÁN, J., GOYA, G., HERNÁNDEZ, R., MIJANGOS, C. Magnetic core–shell chitosan nanoparticles: Rheological characterization and hyperthermia application. *Carbohydrate Polymers*, 2014 (15 February), vol. 102, p. 691–698
- [31] ZHENG-GUO CUI, JIN-LAN PIAO, U.R. REHMAN, M., OGAWA, R., PENG LI, QING-LI ZHAO, KONDO, T., INADERA, H. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by withaferin A. *European Journal of Pharmacology*, 2014 (15 January), vol. 723, p. 99–107.
- [32] BAKANDRITSOS, A., MATTHEOLABAKIS, G., CHATZIKYRIAKOS, G., SZABO, T., TZITZIOS, V., KOUZOUDIS, D., COURIS, S., AVGOUSTAKIS, K. Doxorubicin Nanocarriers Based on Magnetic Colloids with a Bio-polyelectrolyte Corona and High Non-linear Optical Response: Synthesis, Characterization, and Properties. *Advanced Functional Materials*, 2011 (22 April), vol. 21, no. 8, p. 1465–1475.
- [33] ŠTARHA, P., TRÁVNÍČEK, Z. *Termická analýza*. Olomouc, 2011.
- [34] MARKOVÁ, Z., ŠIŠKOVÁ, Š., FILIP, J., ŠAFÁŘOVÁ, K., PRUCEK, R., PANÁČEK, A., KOLÁŘ, M., ZBOŘIL, R. Chitosan-based synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity. *Green Chemistry*, 2012, vol. 14, no. 9, p. 2550–2558

Seznam zkratek

SPION	superparamagnetic iron oxide nanoparticles
DNA	deoxyribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
Θ	théta, úhel dopadajícího RTG z.
Λ	lambda, vlnová délka
UV	ultrafialová oblast elmag. spektra
IČ	infračervená spektroskopie
cm^{-1}	reciproký centimetr
NPs	nanoparticles
RES	retikuloendoteliální systém
EPR	enhanced permeability and retention effect
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí
He-Ne laser	helium-neonový laser
M	molarita roztoku
A	absorbance
K	Kelvin, termodynamická teplota
T	Tesla, intenzita mag.pole,
mV	milivolt
$c_1V_1 = c_2V_2$	rovnice k ředění roztoků