Přírodovědecká Fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci

Katedra Experimentální Fyziky

Diplomová práce

Interakce nanočástic oxidů železa s doxorubicinem

Autor	Bc. Jaroslav Kašpar
Vedoucí práce	doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.
Studijní obor	Nanotechnologie
Forma studia	Prezenční
Rok	2015

Bibliografická identifikace

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	2015
Počet stran	96
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 (označeny smCMC-Ar a smbisCOOH-CH) a jejich následné porovnání. Imobilizace chemoterapeutika na povrch nanočástice je podmíněna morfologií a chemickou skladbou, což je znázorněno ve výsledcích experimentů. Poslední částí této diplomové práce jsou výsledky MTT testu cytotoxicity připravených vzorků.
Klíčová slova	doxorubicin, cílená distribuce léčiv, polymer, hypertermie, MTT test

Bibliographical identification

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	2015
Number of pages	96
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 (smCMC-Ar and smbisCOOH-CH) 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. The last part of this thesis are results of MTT cytotoxicity test.
Keywords	doxorubicin, targeted drug delivery, polymer, hypethermia

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 svému vedoucímu diplomové práce panudoc. RNDr. Romanu Kubínkovi, CSc. 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, Ph.D. za její trpělivost, rady, ochotu a obětavost, díky níž jsem mohl tuto práci vypracovat a pochopit různé mechanismy, které využiji v budoucnu. Dále katedře Fyzikální chemie Univerzity Palackého v Olomouci za zpřístupnění laboratoře pro měření DLS a Zeta potenciálu. V neposlední řadě děkuji RNDr. Karolíně Machalové Šiškové, PhD. a doc. Mgr. Jiřímu Tučkovi, Ph.D. za konzultace a pomoc při popisování výsledků. Velmi bych chtěl poděkovat pracovníkům z Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů (RCPTM) – konkrétně z Mössbauerovy spektroskopie, infračervené spektroskopie, rentgenové práškové difrakce, termogravimetrické analýzy, TEM mikroskopie, kteří ochotně změřili svěřené vzorky koloidních roztoků nanočástic, Mgr. Markétě Havrdové za ochotu a pomoc při pokusech na buňkách. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat přednostce ústavu Lékařské biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci paní prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. a paní RNDr. Věře Cenklové, Ph.D., které mi umožnily zpracovat cytotoxické testy na nádorových buněčných liniích a také za jejich cenné rady a velmi bohatou zkušenost.

Cíle Práce

1. Fyzikálně-chemická charakterizace nanočástic
2. Imobilizace doxorubicinu na magnetický nosič
3. Zhotovení cytotoxického MTT testu na nádorových buňkách

Obsah

Úvod 10

1 Strukturní formy oxidů železa 12

1.1 Magnetit 12

1.2 Maghemit 13

1.3 Jednodoménovost 15

1.4 Superparamagnetismus 16

1.5 Superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPION) 19

1.6 Stabilizace nanočástic polymerem 22

2 Doxorubicin 27

3 Metody studia nanočástic 29

3.1 Transmisní elektronová mikroskopie 29

3.2 Rentgenová difrakce (XRD) 30

3.3 Spektroskopie 31

3.3.1 UV/Vis spektroskopie 31

3.3.2 Infračervená spektroskopie 31

3.4 Termogravimetrická analýza 33

3.4.1 Termogravimetrie (TGA) 33

3.4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie 34

4 Transport přes buněčnou membránu (endocytóza) 35

5 Cílená distribuce léčiv 37

6 Hypertermie 40

7 Experimentální část 43

7.1 Materiály a metody 43

7.1.1 Syntéza 43
7.2 Charakterizace superparamagnetických nanočástic 44
7.2.1 Stanovení koncentrace železa 44
7.3 Termogravimetrická analýza 47
7.4 Mössbauerova spektroskopie 47
7.5 Transmisní elektronová mikroskopie 47
7.6 Dynamický rozptyl světla 48
7.7 Zeta potenciál 50
7.8 Rentgenová prášková difrakce 51
7.9 Infračervená spektroskopie 51
7.10 Syntéza komplexu SPION-DOXORUBICIN 52
7.10.1 Spektroskopické stanovení doxorubicinu 52
7.10.2 Imobilizace doxorubicinu na magnetický nosič 54
7.11 MTT test cytotoxicity komplexu nanočástice-doxorubicin 56
8 Výsledky a diskuze 64
8.1 Transmisní elektronová mikroskopie 64
8.2 Termogravimetrická analýza 66
8.3 Mössbauerova spektroskopie 69
8.4 Rentgenová prášková difrakce 73
8.5 Infračervená spektroskopie 75
8.6 Dynamický rozptyl světla 77
8.7 Spektroskopické stanovení imobilizovaného doxorubicinu 79
8.8 Cytotoxické testy 83
Závěr 90

Literatura 92

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 jednodoménové částice. Tyto nanočástice se studují a nalézají hojné 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 oxidu železnato-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 – NH_2, 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

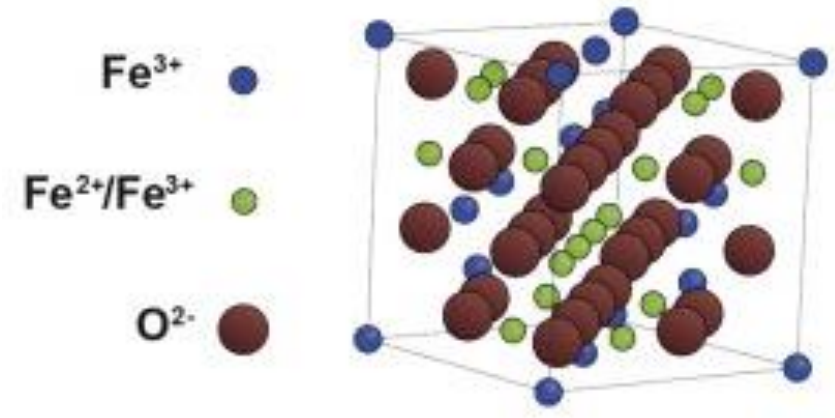
mitochondriální enzym, a tím dochází k oslabení srdeční tkáně. Tento jev zabraňuje regeneraci buněk a dochází k nekróze, nebo k apoptóze. Doxorubicin také zmenšuje kontraktilitu srdečního svalu, protože snižuje syntézu specifického srdečního proteinu. [5]

1 Strukturní formy oxidů železa

1.1 Magnetit

Mezi významné oxidy želena 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, obrázek 1. Uspořádání je někdy uváděno v jiném vzorci pro magnetit $Fe^{3+}[Fe^{2+}\ Fe^{3+}]O_4$ [6].

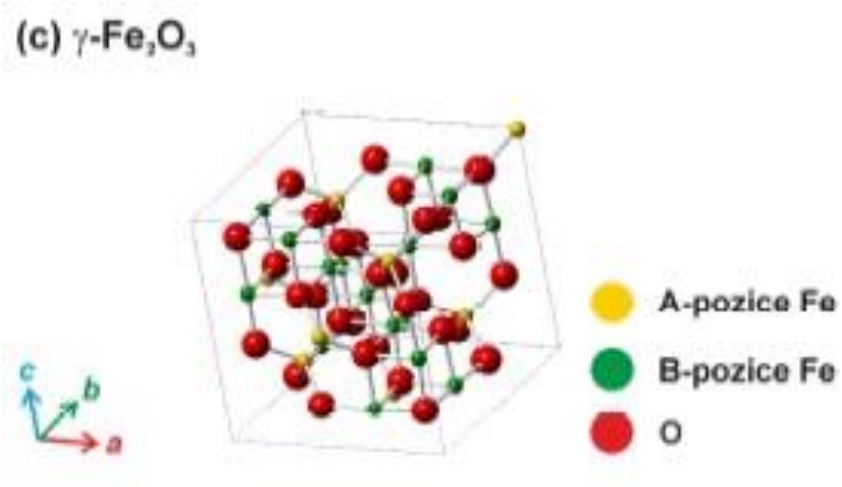


Obrázek 1 představuje grafickou podobu krystalové mřížky magnetitu.

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 (γ-Fe_2O_3). Maghemit je hnědočervený minerál, vykazující magnetické vlastnosti. Je izostrukturní 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 γ-Fe_2O_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.



Obrázek 2 představuje grafickou podobu krystalové mřížky maghemitu.

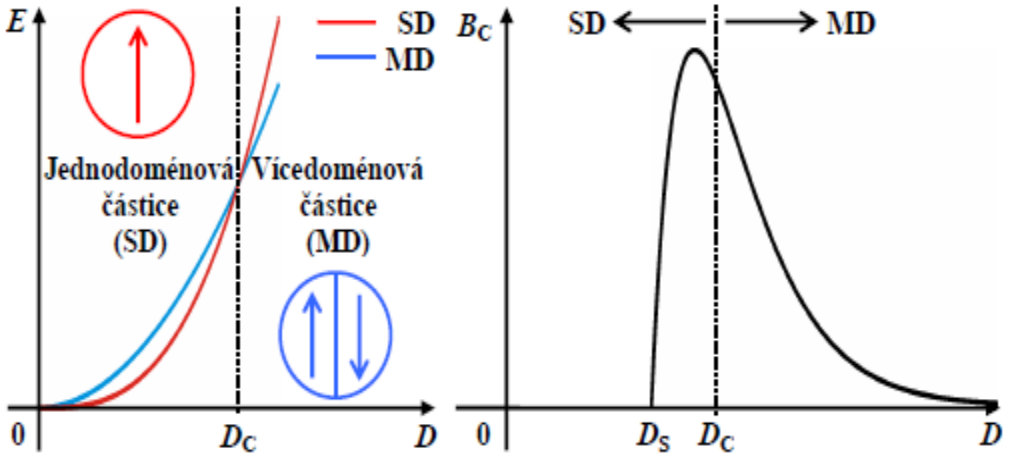
Zdroj: Tuček, J. Nanometrické polymorfy oxidu železitého, jejich magnetické vlastnosti a aplikační potenciál. HABILITAČNÍ PRÁCE, Univerzita Palackého v Olomouc, 2012.

Curieova teplota fáze γ-Fe_2O_3 je v rozmezí mezi 780 K – 980 K, avšak přesné určení této teploty není možné kvůli fázové transformaci na hematit (α-Fe_2O_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 Jednodoménovost

Jednodoménovost je jev spojený s konečným rozměrem částic. Objemový materiál je složen z jednotlivých domén, což jsou spontánně zmagnetované oblasti. Domény dělí energetické bariéry, charakteristické svou šířkou a energií, nazývající 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 zmenšovat velikost částic, bude se redukovat počet doménových stěn. Při neustálém zmenšování dosáhneme kritického rozměru, kdy budou energetické požadavky na existenci domén vyšší, než celkový úbytek energie při rozdělování domény do menších domén. Pod tímto kritickým rozměrem dochází k jevu známému jako jednodoménovost, kdy jsou magnetizační změny charakterizované koherentní rotací magnetických momentů, obrázek 3. Výsledkem jsou vysoké hodnoty koercitivity. Magnetické momenty jednodoménových částic jsou uspořádány ve stejném směru, což má za následek velmi vysoký výsledný magnetický moment. Teoretický kritický rozměr jednodoménových 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]

A) B)



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.

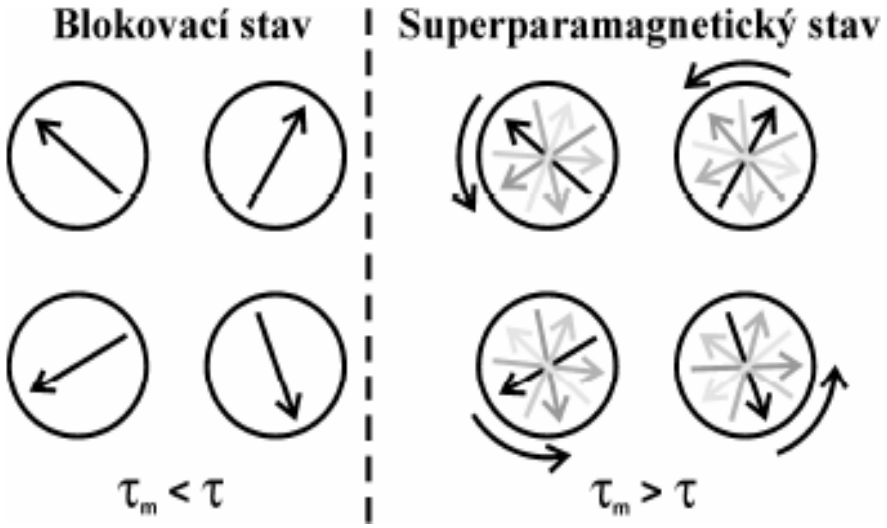
1.4 Superparamagnetismus

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_BT, obrázek 5. Z uvedeného vyplývá, že je možné překonání energetické bariéry, která

udržuje magnetizaci nanočástic ve výhodném energetickém stavu, jestliže platí $k_BT > KV$. Celkový spinový systém, který reprezentuje výsledný superspin (magnetický moment), se samovolně překloní do jiného energeticky výhodného směru magnetizace. Toto magnetické chování, které je teplotně aktivované, je nazýváno jako superparamagnetismus, obrázek 4. K charakterizaci se zavádí pojem relaxační čas [τ], který udává čas setrvání magnetického momentu v jednom význačném směru magnetizace, než se překlopí do směru dalšího. [10]

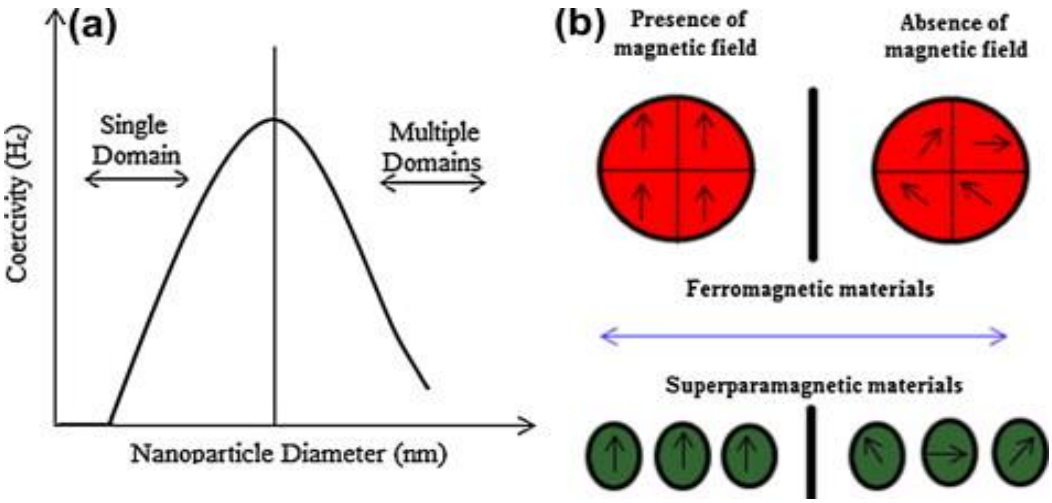
Arrhenius-Néelova rovnice:

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



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.



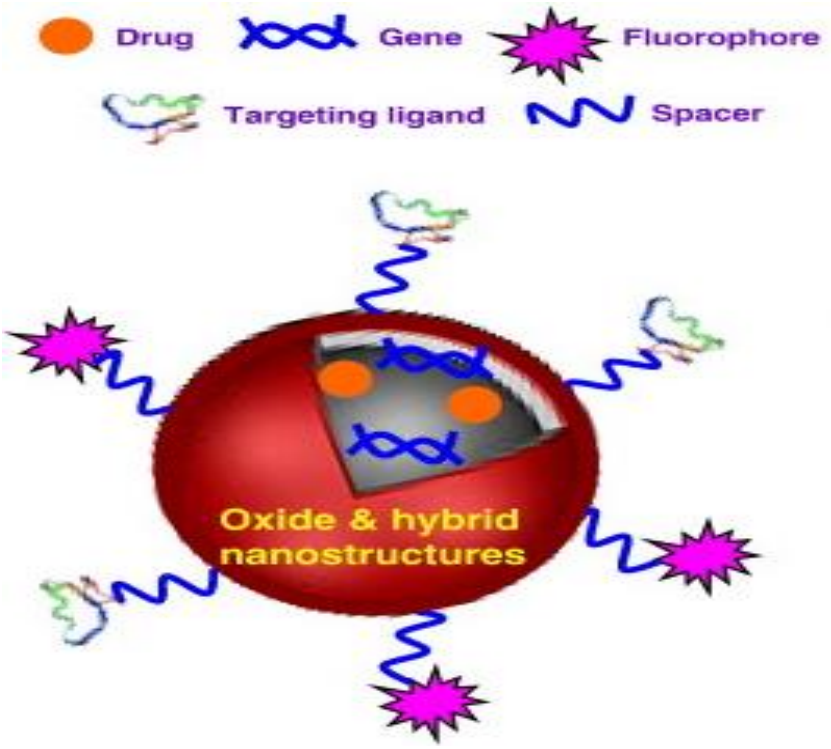
Obrázek 5 graf a) znázorňuje mez dělící jednodoménové a vícedoménové částice, obrázek b) ukazuje rozdíl mezi feromagnetickou multidoménovou, částici v přítomnosti magnetického pole i bez jeho působení a superparamagnetickou, jednodoménovou částici se superspinem.

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. SPIO 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, obrázek 6. 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.

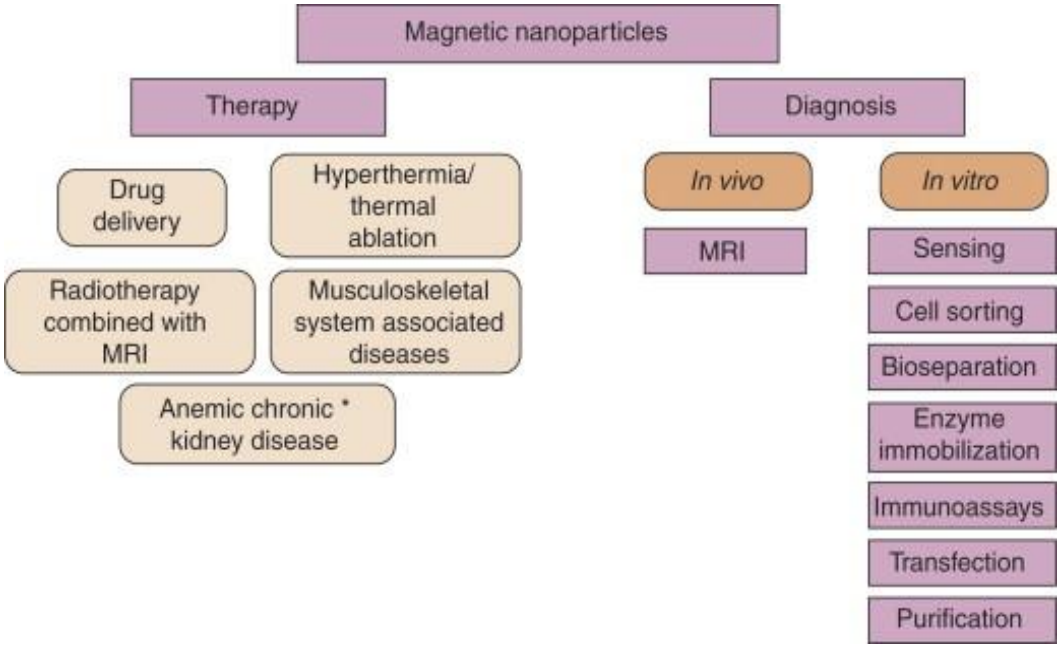
Převzato a upraveno: CHANDRA, S., BARICK, K., BAHADUR, D. Oxide and hybrid nanostructures for therapeutic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, vol. 63, no. 14-15, p. 1267–1281.

Hlavní výhody užití magnetických nanočástic jsou, obrázek 7:

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 ablaci 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]



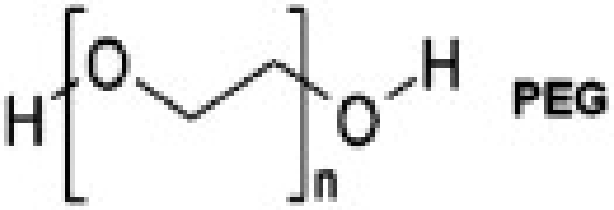
Obrázek 7. Schéma ukazuje možnosti využití magnetických nanočástic v terapii, ale také v diagnostice v nejrůznějších vědních oborech.

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 na rozdíl od částic bez povrchové úpravy. Při použití organického polymeru dochází ke zlepšení chemické stability a snížení toxicity, tabulka 1. [13]

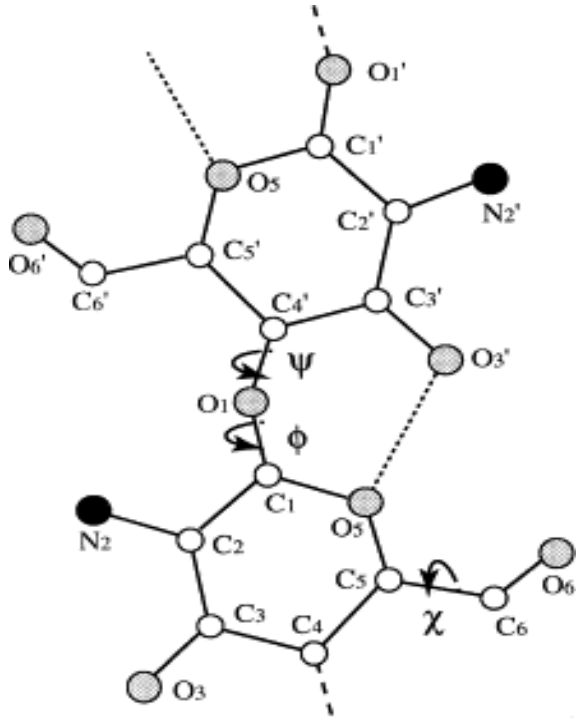
Polyethylenglykol (PEG) je atraktivním materiálem, protože snižuje míru účinnosti fagocytů (opsonizace), díky jeho hydrofilitě a neutrálnímu náboji. Přítomnost řetízku PEG navázaného na povrch nanočástice zajišťuje zvýšení stability ve vodném roztoku, a zároveň prodlužuje životnost komplexu v krevním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



Obrázek 8. Chemický vzorec polymeru polyethylglykol (PEG).

Převzato a upraveno: ILEANA COVALIU, C., JITARU, I., PARASCHIV, G., VASILE, E., BIRIŞ, 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.

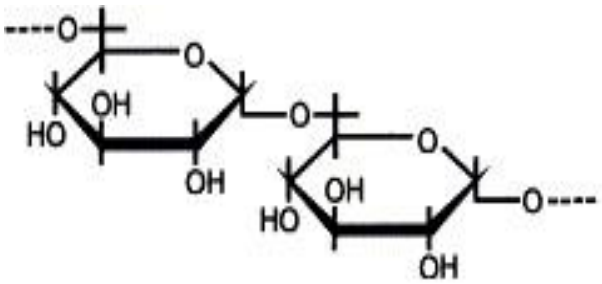
Chitosan je přírodní polymer, vznikající z chitinu. Je hojně využíván u nanočástic vytvořených samoshromážděním. Chitin se vyskytuje ve skeletu bezobratlých živočichů, ale také v exoskeletu, zámotcích a peritrofických membránách. Při hodnotě disociační konstanty kyselosti asi 6,5, je chitosan nerozpustný 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]

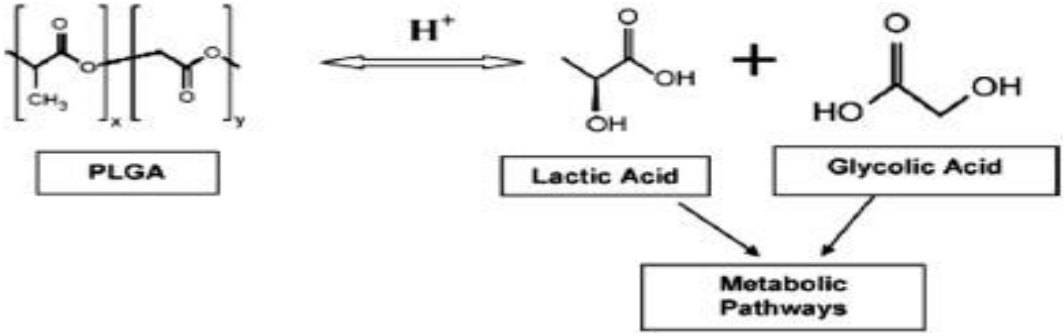


Obrázek 10. Chemický vzorec polymeru dextran.

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 (kopolymer kyseliny mléčné a glykolové, která se označuje 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.

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

Tabulka 1. představuje nejpoužívanější polymery ke stabilizaci povrchu nanočástic.

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

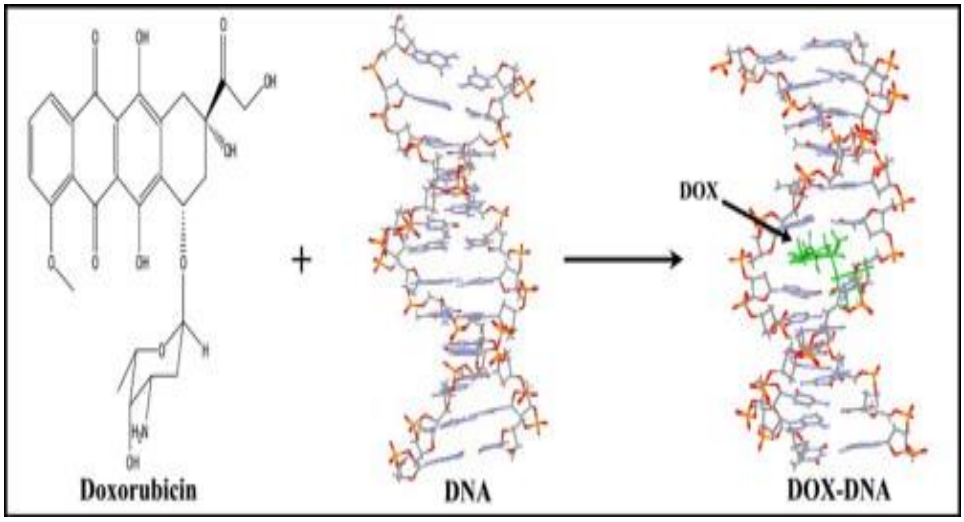
Doxorubicin je sekundárním produktem metabolismu bakterií rodu Streptomyces peucetius, patřící mezi anthracyklická antibiotika, která jsou vysoce efektivní v léčbě nádorů hrudníku, leukémie, lymfomů a solidních nádorů, což jsou nádory, které vznikají zmnožením nádorových buněk a také vytváří kus pevné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

Doxorubicin je podáván intravenózně v dávkách 60 – 90 mg/m^2 v průběhu 21 dní. Léčivo vykazuje kumulativní charakter dávky, což se projevuje v maximální dávce 550 mg/m^2, 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 (cukrovka), hypertenze (vysoký krevní tlak), 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, obrázek 12 . 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.

Převzato a upraveno: 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 soleniody, 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 k 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, která 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 mezirovinná vzdálenost, sinΘ – úhel dopadajícího záření, lambda – 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 absorbci 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, které absorbují záření o vlnové délce 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, která 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}

Pří 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 vtlačením 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.

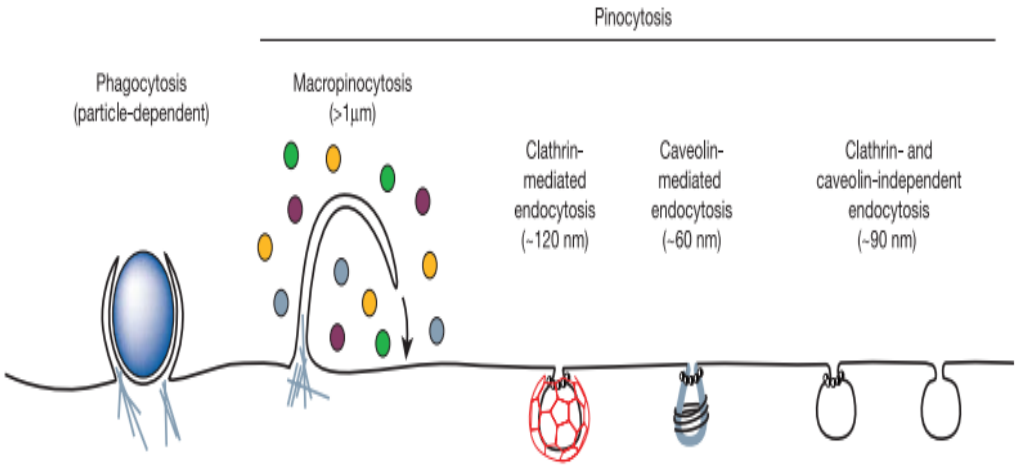
Exotermické děje: krystalizace, pevnofázové reakce, oxidace. [33]

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], obrázek 13. Fagocytóza se označuje také jako „buněčné jezení“ a slouží k pohlcení větších elementů, jako například částic, jejichž rozměr přesahuje 0,5 μm, 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 váčků po nervovém přenose.[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

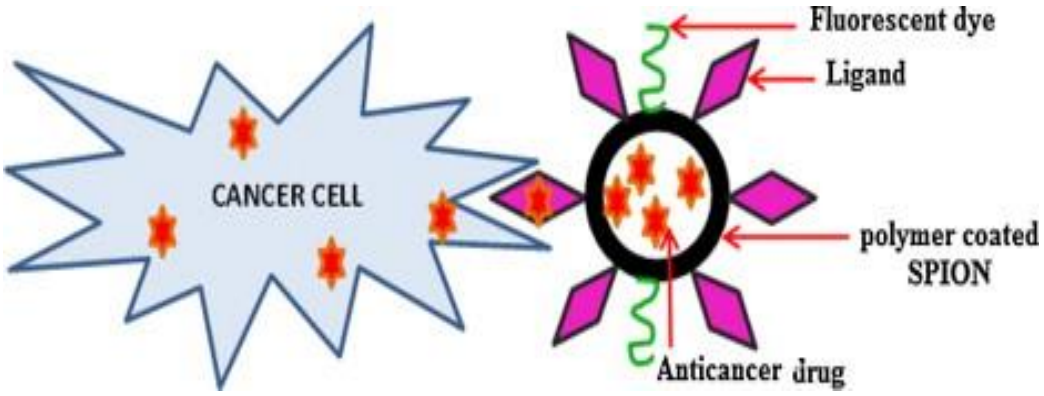
Nevýhodou konvenční chemoterapie je celková nespecifita a nutnost aplikace vysoké dávky léku [7] [9]. Chemoterapeutikum je podáváno intravenózní cestou, tudíž dochází k systémové distribuci po celém těle [12]. Toxicita léčiva je doprovázena četnými a závažnými vedlejšími účinky. Tomuto lze předejít použitím 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), velikost (velikost magnetického jádra, velikostní distribuce, hydrodynamický poloměr). [12] Funkcionalizace nanočástic polymerem, amino skupinami (NH_2) a různými organickými sloučeninami vede ke zlepšení chemických a fyzikálních vlastností. Více funkčních skupin na povrchu nanočástic slouží k zajištění variabilních vlastností, obrázek 14. 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, protože nádorová tkáň roste rychleji, než je doba nezbytná ke genezi neprostupné krevní cévy. Bylo zjištěno, že cévami nádorů mohou prostupovat částice s velikostí až 2μm 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 okysličení. 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]

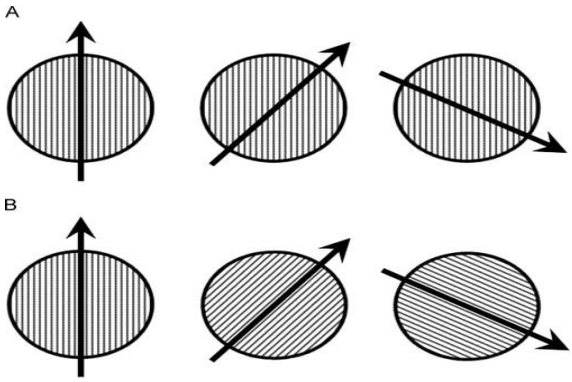


Obrázek 14. Představuje teoretický model ideální theranostické částice, která lze využít při terapii a diagnostice zároveň, díky fluorescenčním značkám, magnetickým vlastnostem, atd.

Převzato a upraveno z publikace [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 energie ze střídavého magnetického pole a přeměňují ji na teplo jako výsledek hysterezních 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.



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 postupu uvedeného v literatuře [32] a smbisCOOH-CH připravila Mgr. Zdeňka Marková, PhD.

7.1.1 Syntéza

Nanočástice smCMC-Ar

Do 10 ml vody (H_2O) bylo přidáno 0,72 g heptahydrátu síranu železnatého ($FeSO_4$ x $7H_2O$) a 100 µl 37% kyseliny chlorovodíkové (HCl). 0.5 g carboxymethyl celulózy (CMC) bylo rozpuštěno ve 30 ml vody (H_2O). Takto vzniklé roztoky byly smíchány při udržování teploty 30°C a neustálého magnetického míchání. Poté bylo přidáno 7 ml 30% hydroxidu amonného (NH_4OH). Po 30 minutách byla teplota zvýšena na 50°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 zchládnout 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 ledničce 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 zdroj záření He-Ne laser, pracující na vlnové délce 633 nm. Postupovali jsme pomocí Ferrozinové metody. Připravili jsme si 2 pufry (lze si představit jako tlumivé roztoky), 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 jsme 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 $FeSO_4$, který vznikl smícháním 27,8 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O 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 $FeSO_4$ v množství dle následující tabulky (tab. 2).

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

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

Do jednotlivých ependorfek bylo postupně přidáno 250 µl redukčního pufru s 15 minutovým „stáním“ a 500 µl ferozzinového pufru s 10 minutovým „stáním“. Nakonec jsme změřili absorbanci 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 (HNO_3) 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 ferrozinového 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 vzorku jsme museli zabezpečit, aby byl vzorek homogenní, měl stejnou velikost částic a nebyl ničím kontaminován. Vysušený vzorek byl rozdrcen v drtící misce a poté vložen do Al_2O_3 kelímku, ve kterém musel být vzorek rovnoměrně rozprostřen (to jsme zajistili poklepáním po kelímku).

7.4 Mössbauerova spektroskopie

Tato metoda byla použita pro identifikování fáze oxidu železa a pro zjištění magnetického stavu nanočástic. Je kladen požadavek, aby povrch vzorku byl hladký a vytvořená vrstva byla homogenní, abychom zamezili přednostní orientace 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).

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.

7.6 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla je fyzikální metodou, 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 (smCMC-Ar a smbisCOOH-CH), celkově tedy 46. K ředění roztoků byl použit roztok NaCl o rozdílných molárních koncentracích, který byl použit z důvodů, viz. následující tabulka (tab. 5).

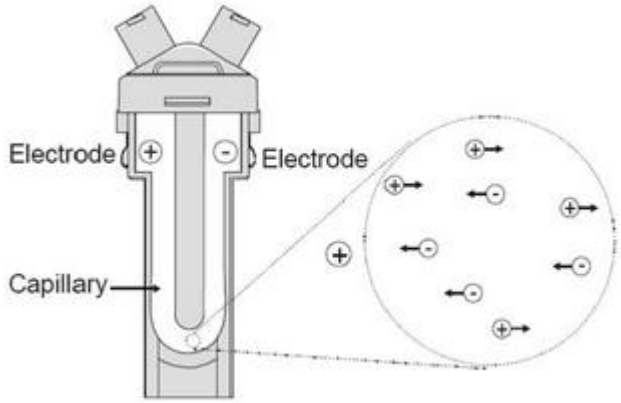
Při zředění koloidního roztoku nanočástic v roztoku NaCl dochází ke změně hodnoty hydrodynamického poloměru. Kolem nanočástic se nachází elektrická dvojvrstva. Při nízké koncentraci vodivých iontů v roztoku bude tato dvojvrstva větší a tím se zvětší i hydrodynamický poloměr nanočástic a naopak při vysoké koncentraci iontů bude elektrická dvojvrstva menší, což způsobí pokles hydrodynamického poloměru nanočástic, které se budou v roztoku pohybovat rychleji.

č. vzorku	molární koncentrace NaCl (M)	množství NaCl (µl)	množství vzorku smbisCOOH-CH (µl)	množství vzorku smCMC-Ar (µl) + ddH_2O (µl)
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

Tabulka 3 popisuje přípravu vzorků, na kterých byl měřen hydrodynamický poloměr.

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 elektrody, které se nachází uvnitř kyvety i na jejím povrchu, 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 (dne 20.dubna 2014) z http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/zetasizer.html

7.8 Rentgenová prášková difrakce

Vzorek na měření pomocí XRD byl připraven rovnoměrným nanesením materiálu na křemíkovou destičku, která nevykazuje difrakci, a následné zarovnání povrchu. Existují obecné požadavky, které musí práškový vzorek splňovat. Musí být plochý s hladkým povrchem, kvůli Bragg-Brentanově geometrii s maximální tloušťkou 3 mm.

7.9 Infračervená spektroskopie

Při měření kapalných vzorků na infračerveném spektrometru je zapotřebí použit speciální kapalinovou kyvetu, vyrobenou z CaF_2, ZnSe, nebo tenký film. Vhodným rozpouštědlem pro kapalné vzorky se lze zaměřit na určitou oblast absorpčního spektra, dle tabulky 4.

Rozpouštědlo	Interval měření (cm^{-1})
CCl_4	4000 – 1600, 1500 - 850
$CHCl_3$	4000 – 1250, 1150 - 850
CS_2	4000 – 1650, 1400 - 500

Tabulka 4. Přehled rozpouštědel pro měření IR spektra.

Převzato a upraveno (dne 29.12.2014): http://web.vscht.cz/~koplikr/IR_4.pdf

7.10 Syntéza komplexu SPION-DOXORUBICIN

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

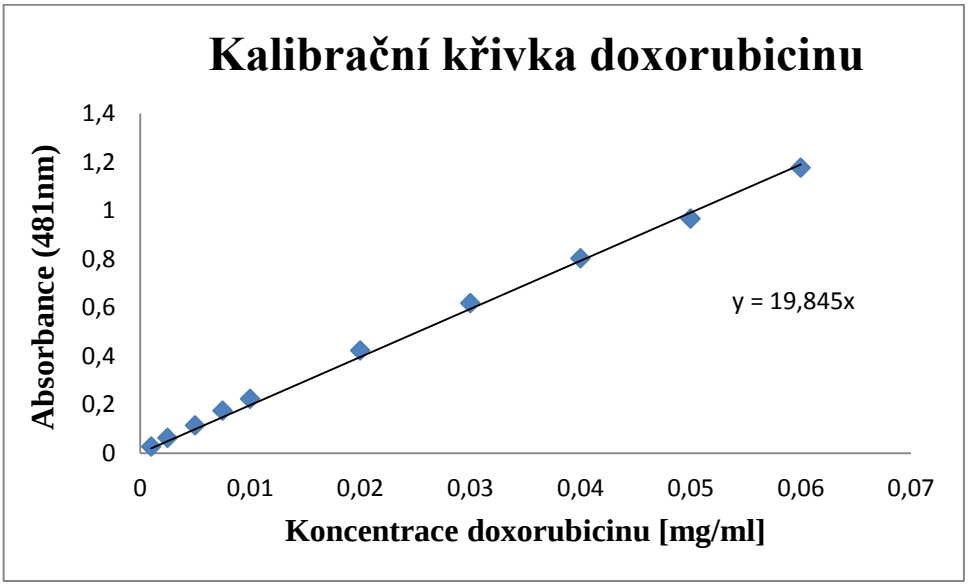
7.10.1 Spektroskopické stanovení doxorubicinu

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 č. 5 a následné změření absorbance pomocí spektrometru, při vlnové délce 481 nm.

Koncentrace (mg/ml)	Absorbance (λ_{481nm})
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

Tabulka 5 popisuje koncentraci doxorubicinu v roztoku a jeho absorbanci, ze které byla vytvořena kalibrační křivka.

Sestavením grafu závislosti koncentrace doxorubicinu na absorbanci získáme přímku, kterou nazýváme kalibrační křivkou, z níž vypočítáme důležitý parametr *k*, tedy směrnici přímky, obrázek 27. 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 uvedeného v literatuře [24]. Vytvořeno bylo několik sérií vzorků s lišícími se poměry přidaných nanočástic a doxorubicinu doplněných vodou na určitý objem, dle následující tabulky 6. Syntéza byla prováděna v ochranných rukavicích a ochrannými brýlemi, protože doxorubicin je chemoterapeutická látka s vysoce cytotoxickými účinky.

Poměr N:D	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

, zobrazuje mísící poměr jednotlivých roztoků. Výsledný objem testovaného roztoku byl 1800 µl.

Koloidní roztok s doxorubicinem se inkuboval 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 resuspendovali v 1 ml H_2O pro pozdější využití. Grafy (č. 3 a 4) představují závislost koncentrace imobilizovaného doxorubicinu vzhledem k původní koncentraci samotného doxorubicinu.

7.11 MTT test cytotoxicity komplexu nanočástice-doxorubicin

Použité chemikálie

DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium) + 10% fetal bovine serum, 1% penicilin, streptomycin a glutamine.

PBS pufr (Phosphate Buffered Saline) – zásobní roztok 10x: 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g $Na_2HPO_4*12H_2O$, 2.6g KH_2PO_4, 1l destilované vody, pH 7,4 (upravení NaOH nebo HCl)

- Zásobní roztok zředěn 10x v destilované vodě (1:9)

MTT roztok – 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide): zásobní roztok připraven z 22,5mg prášku MTT do 9ml 1x PBS, zásobní roztok zředěn v 1x PBS (1:9)

Koloidní roztok I. – roztok nanočástic obalených chitosanem (smbisCOOH-CH, c=2,48 mg/ml) s imobilizovaným doxorubicinem (c=5mg/10ml), poměr smíchání 4:1 (NPs:DOX)

Koloidní roztok II. - roztok nanočástic obalených chitosanem (smbisCOOH-CH, c=2,48 mg/ml) s imobilizovaným doxorubicinem (c=5mg/10ml), poměr smíchání 8:1 (NPs:DOX)

Doxorubicin (roztok III.) (c=5mg/10ml) - chemoterapeutikum

Měření cytotoxicity bylo prováděno na buněčných liniích NIH3T3, což jsou myší embryonální fibroblasty a MCF7, které reprezentují lidské nádorové buňky karcinomu prsu, které připravila RNDr. Věra Cenklová, Ph.D. z ústavu Lékařské Biofyziky, Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Při kultivaci buněčných linií bylo použito kultivační médium DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s medium), které obsahuje antibiotika penicilin, streptomycin a 10% fetálního bovin séra. Kultivace probíhala v inkubátoru, kde jsou zajištěny podmínky 37°C a 5% atmosféra CO_2. Pro zajištění dobrého stavu těchto buněčných linií bylo potřeba buňky pasážovat, což znamená narušit jejich mezibuněčný kontakt a kontakt buněk s povrchem kultivační jamky, abychom zamezili kontaktní inhibice, při které dochází k odumírání buněk. Pasážování probíhá pomocí enzymu trypsin, tzv. trypsinizace buněk. Buňky byly připraveny v 96-ti jamkových deskách. V každé jamce bylo 10 000 buněk.

Před začátkem testů cytotoxicity bylo nutné zkontrolovat stav buněk pomocí optického mikroskopu Olympus IX81 vybaveného CCD kamerou a softwarem Cell od firmy Olympus Doxorubicin vykazuje fluorescenci v zelené části světelného spektra, proto jsme mohli pozorovat, kde se v kultivační jamce, resp. v/na buňce nachází, viz obrázek XXX.

.Stanovení cytotoxicity probíhalo pomocí testu MTT. Testovány byly 3 látky (koloidní roztok nanočástic (smbisCOOH-CH s imobilizovaných doxorubicinem v poměru 4:1 – I., koloidní roztok nanočástic (smbisCOOH-CH) s imobilizovaných doxorubicinem v poměru 8:1 – II. a chemoterapeutikum Doxorubicin – III.). Koncentrační řada byla zvolena 25μM, 10μM, 5μM, 0,5μM a 0,1μM, dle tabulky 7,8,9.

KONCENTRACE (µM)	LÁTKA - I (µl)	DMEN (µl)
0,1	0,4*	99,6
0,5	2,1*	97,9
5	21*	79
10	42*	58
25	10,5	89,5

* koloidní roztok smbisCOOH-CH zředěn 10*

Tabulka 7. Příprava koncentrační řady pro MTT test toxicity vzorku označeného I.

KONCENTRACE (µM)	LÁTKA - II (µl)	DMEN (µl)
0,1	0,4*	99,6
0,5	2,1*	97,9
5	21*	79
10	42*	58
25	10,5	89,5

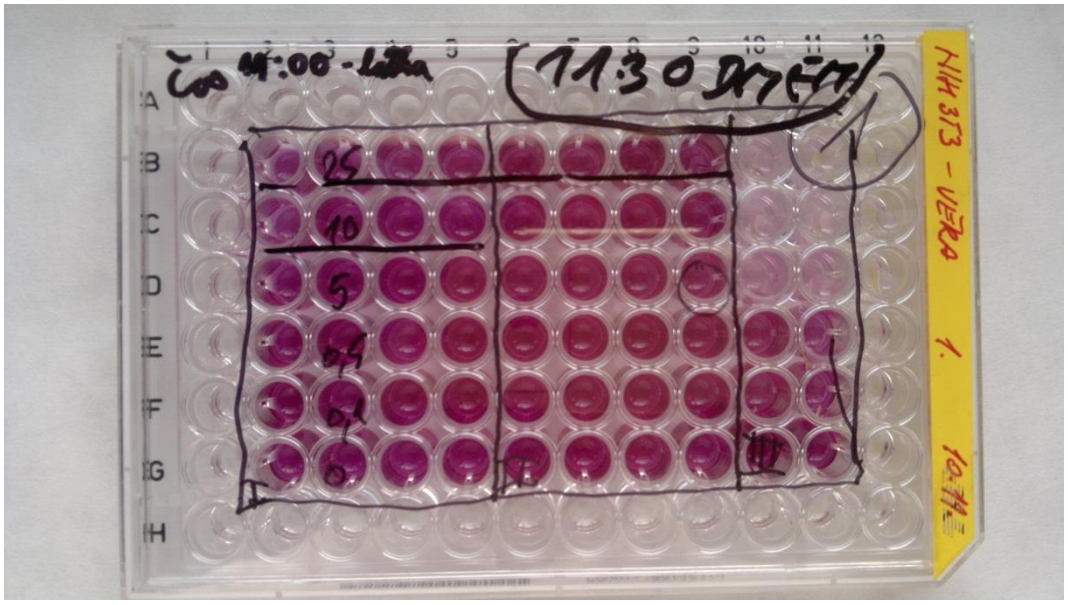
Tabulka 8. Příprava koncentrační řady pro MTT test toxicity vzorku označeného II.

* koloidní roztok smbisCOOH-CH zředěn 10*

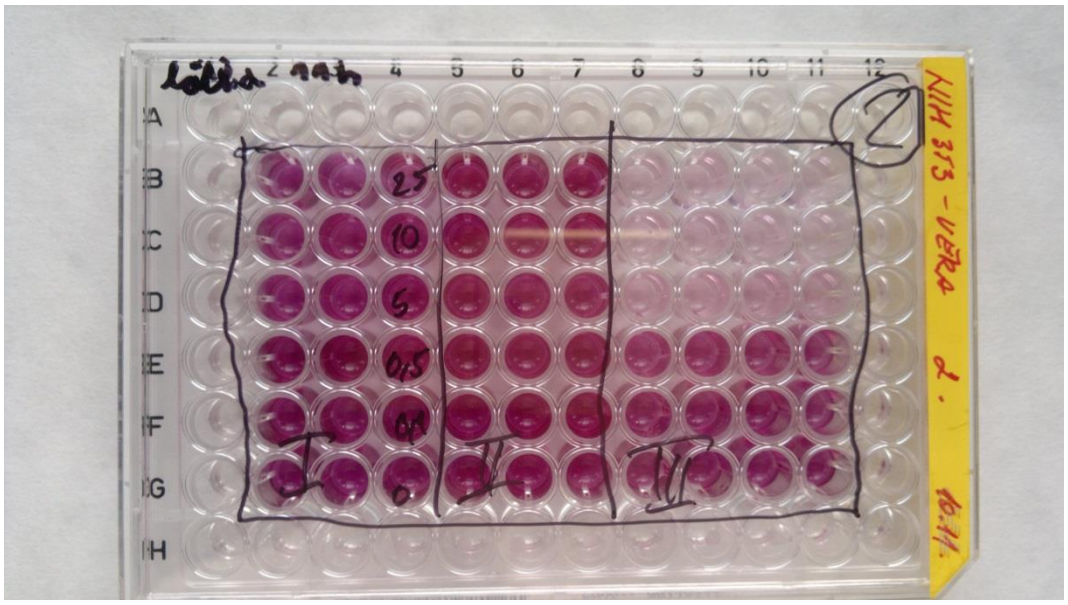
KONCENTRACE (µM)	Doxorubicin - III (µl)	DMEN (µl)
0,1	0,2	99,8
0,5	1,1	98,9
5	10,9	89,1
10	21,8	78,2
25	54,4	45,6

Tabulka 9. Příprava koncentrační řady pro MTT test toxicity chemoterapeutika doxorubicin

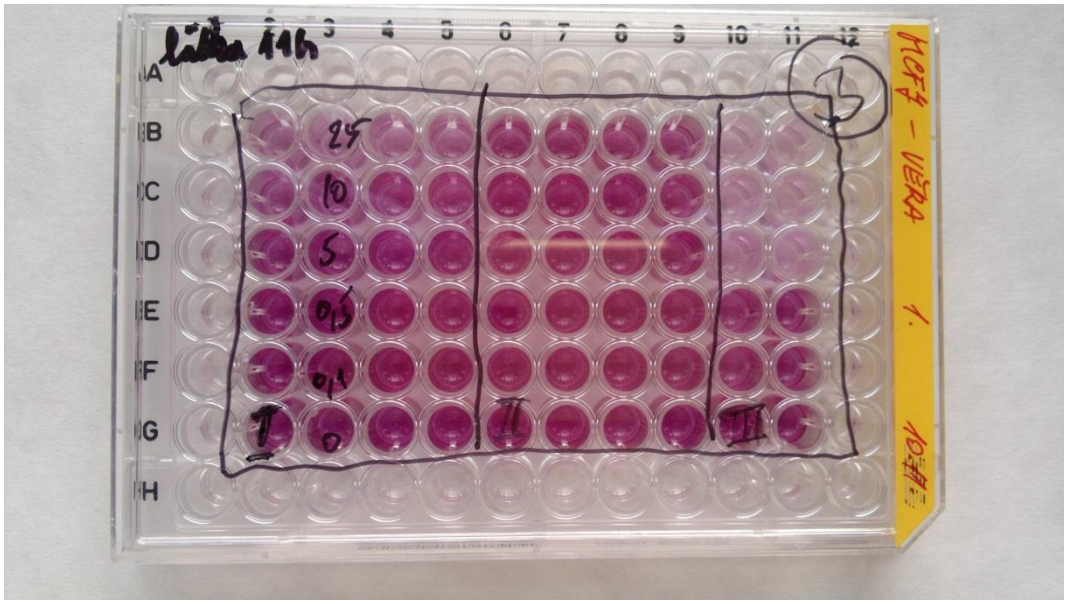
Před začátkem MTT protokolu jsem naředil MTT roztok PBS 1x a propláchl buňky fosfátovým pufrem. První krok spočíval v odstranění kultivačního média z jamek, pomocí osmi kanálové pipety. Dále jsem přidával, v tzv. triplikátu – to znamená, že jsem přidával 3, resp. 4 stejné koncentrace do různých jamek, jednotlivé koncentrace dle obrázků 28,29,30,31.



Obrázek 28. Znázornění aplikace MTT roztoku v tzv. tripletu. Kultivační jamky obsahovaly buňky NIH3T3.

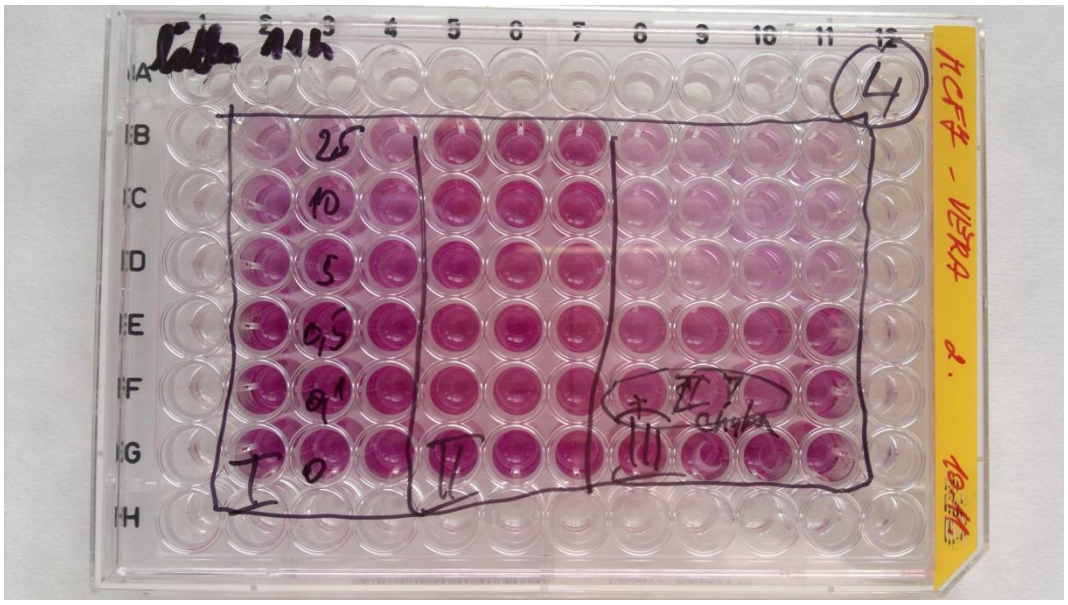


Obrázek 29. Znázornění aplikace MTT roztoku v tzv. tripletu. Kultivační jamky obsahovaly buňky NIH3T3.

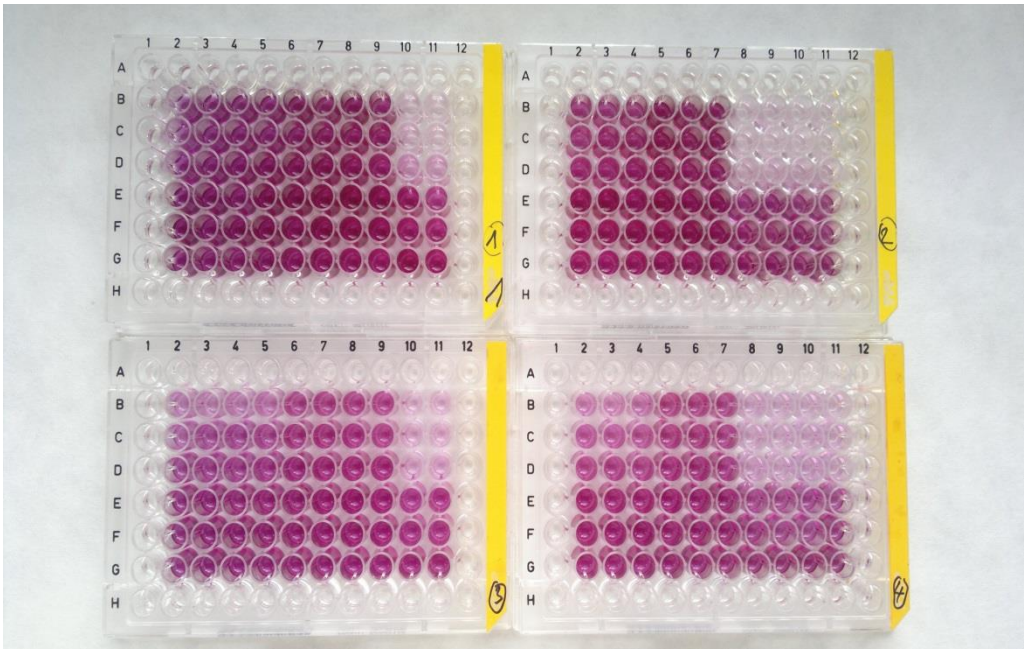


Obrázek 30. Znázornění aplikace MTT roztoku v tzv. tripletu. Kultivační jamky obsahovaly buňky MCF7

.



Obrázek 31. Znázornění aplikace MTT roztoku v tzv. tripletu. Kultivační jamky obsahovaly buňky MCF7.



Obrázek 32. Fotografie 96 jamkových kultivačních destiček s roztokem MTT.

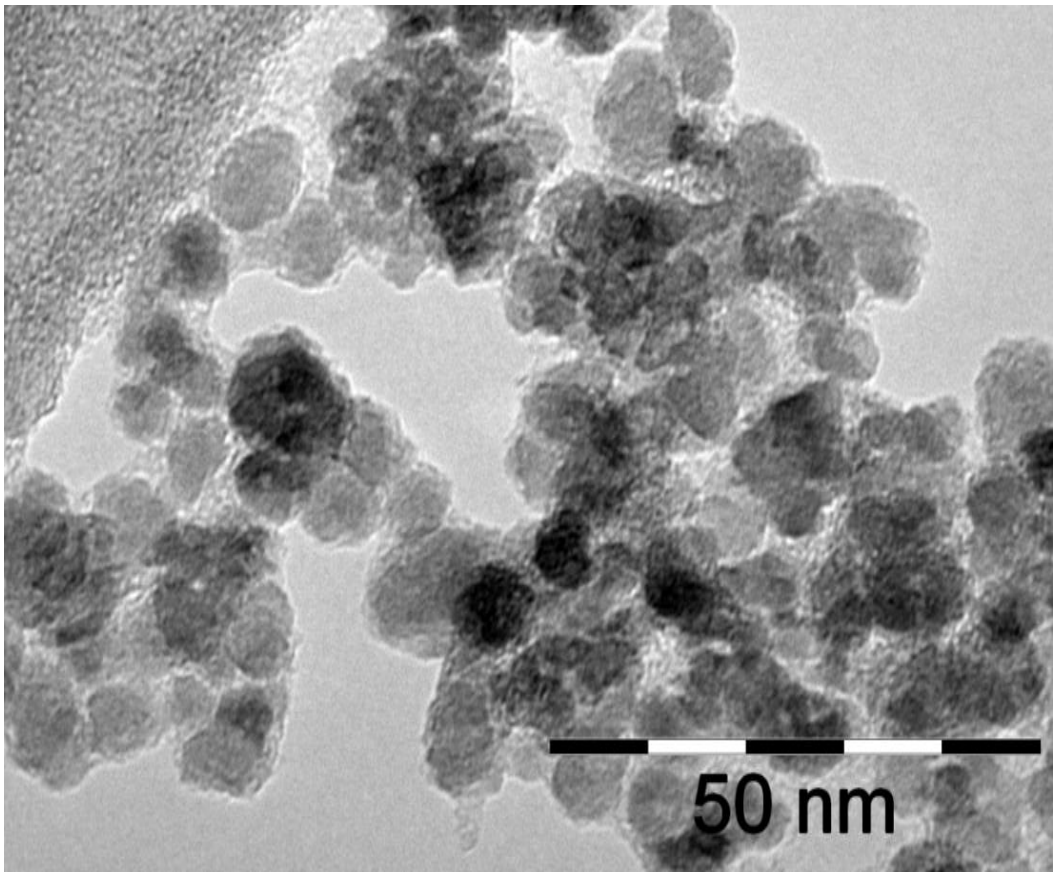
Desky 1,2 obsahují buněčnou linii NIH3T3 a desky 3,4 buněčnou linii MCF7. Dle zbarvení roztoku lze pouhým okem posoudit přežití buněk. Jamka, silně zbarvená do fialova obsahuje velké množství přeživších buněk, zatímco slabě zbarvená jamka je pravým opakem.

Následně byly buňky vloženy do inkubátoru na 24h. Po uplynutí této doby byl odstraněn roztok MTT a buňky opět promyty PBS 1x . Každou kultivační destičku jsme vložili do spektrometru (Synergy HT reader – firma BioTek), kde probíhalo měření na dvouch vlnových délkách. První vlnovou délkou 690nm, byla zjištěna absorbance kultivační destičky. Vlnovou délkou 570nm, jsme získali hodnotu absorbance u přeživších buněk. Vyhodnocení spočívalo v odečtení hodnot absorbancí pro tyto 2 vlnové délky.

Vyhodnocení hodnoty IC50, která ukazuje hodnotu koncentrace, při které dochází k odumření 50% buněčné populace, bylo provedeno pomocí softwaru Phototox.

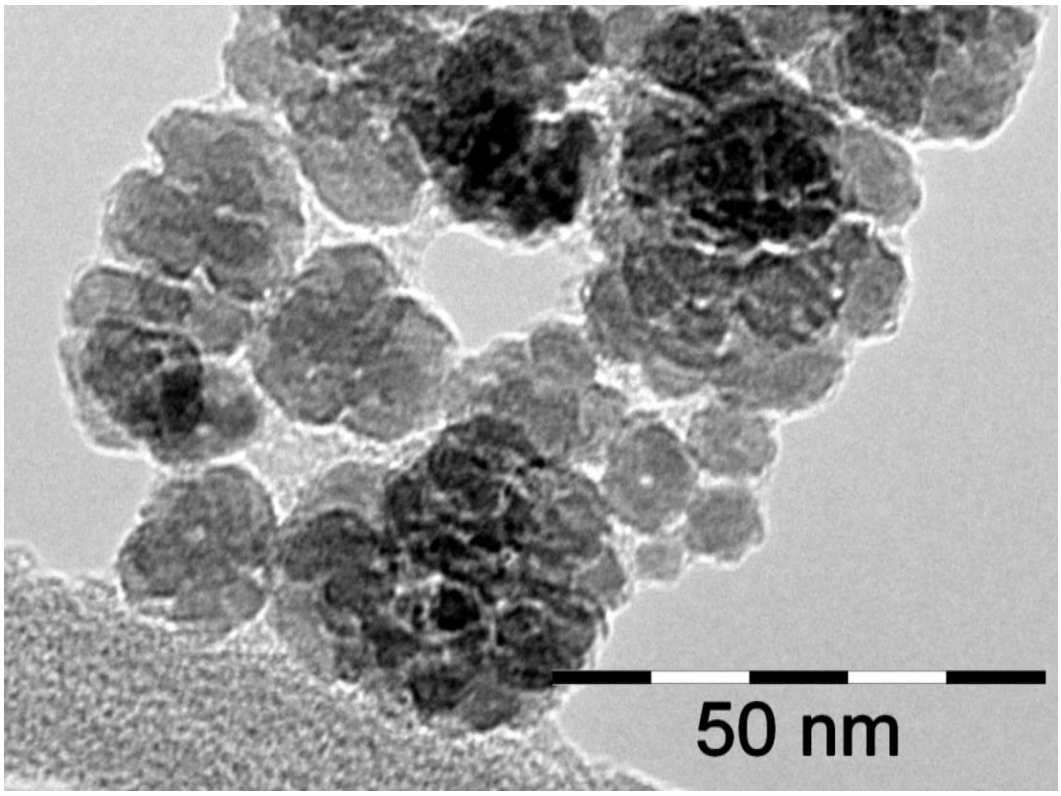
8 Výsledky a diskuze

8.1 Transmisní elektronová mikroskopie



Obrázek 33. Ukazuje snímek z TEM (transmisní elektronové mikroskopie) vzorku smbisCOOH-CH.

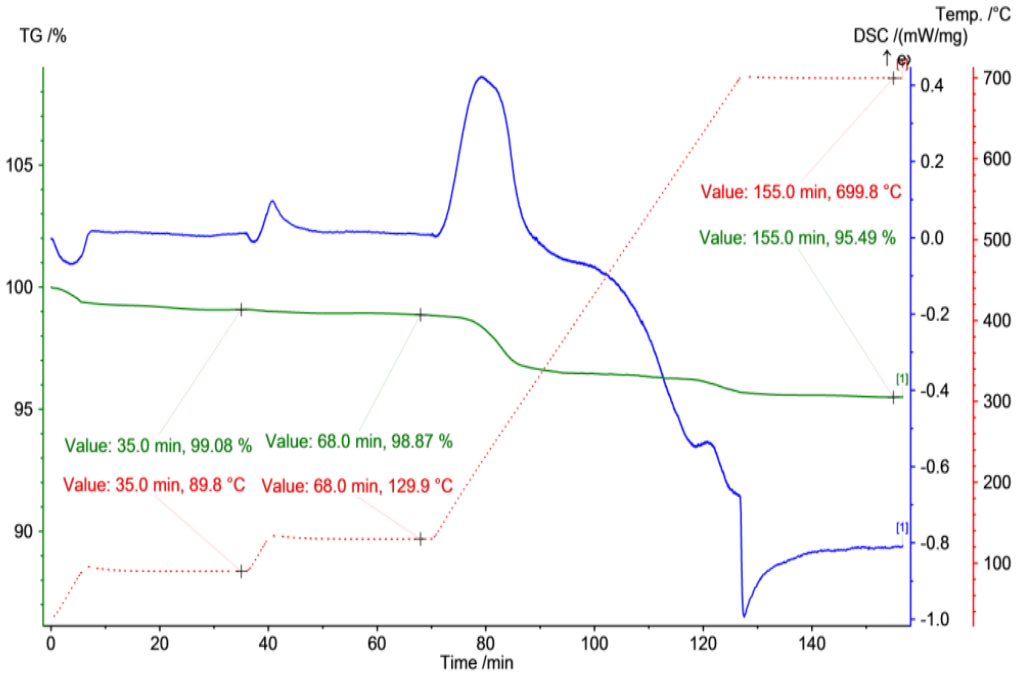
Nanočástice smbisCOOH-CH vykazují sférický charakter s „core-shell“ stukturou. Na snímku lze snáze rozlišit magnetické jádro a polymer (chitosan) obalující celou nanočástici. Velikostní distribuce nanočástic vzorku smbisCOOH-CH se pohybuje od 5 nm do 30 nm.



Obrázek 34. Ukazuje snímek z TEM (transmisní elektronové mikroskopie) vzorku smCMC-Ar.

Nanočástice 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.

8.2 Termogravimetrická analýza

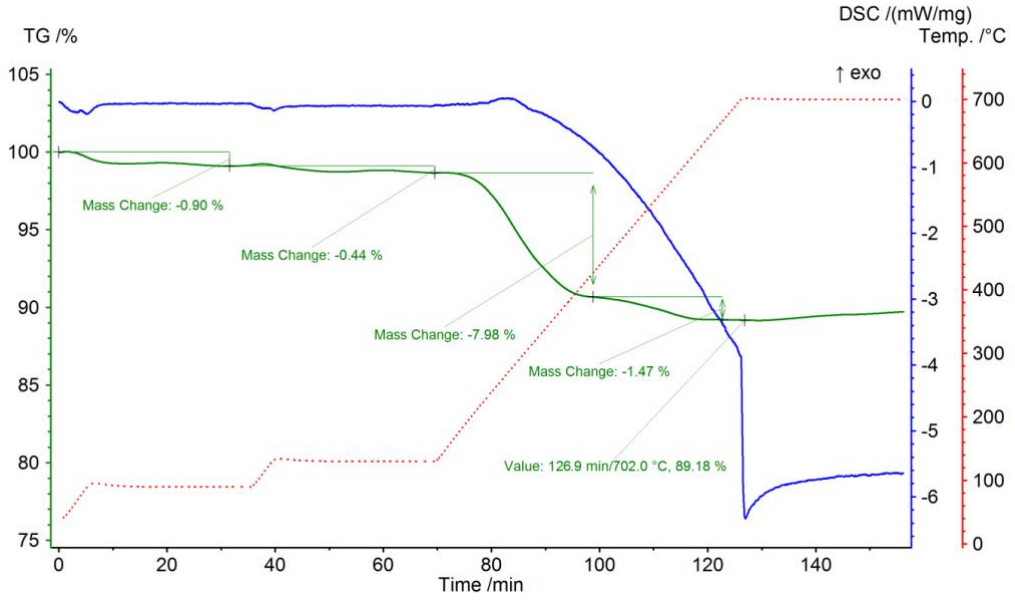


Graf 1. Termogravimetrické křivky (TGA, DSC) vzorku koloidního roztoku nanočástic smCMC-Ar.

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, ke které dochází v rozmezí teplot 360°C – 400°C . Při ztrátě organické fáze dochází u

vzorku ke zmenšení hmotnosti přibližně o 2%.. Celkový úbytek hmotnosti je 4,51%, při konečné teplotě 699,8°C za čas 155 min.

DSC křivka (modrá) popisuje probíhající exotermické a endotermické děje v navážce vzorku. Zřetelný vrchol v časovém intervalu 78 min až 88 min představuje endotermický děj (tání), po kterém dochází ke zrychlení ohřevu vzorku s následným exotermickým dějem (krystalizace) s maximem v čase 128 min.



Graf 2. Termogravimetrické křivky (TGA, DSC) vzorku koloidního roztoku nanočástic smbisCOOH-CH.

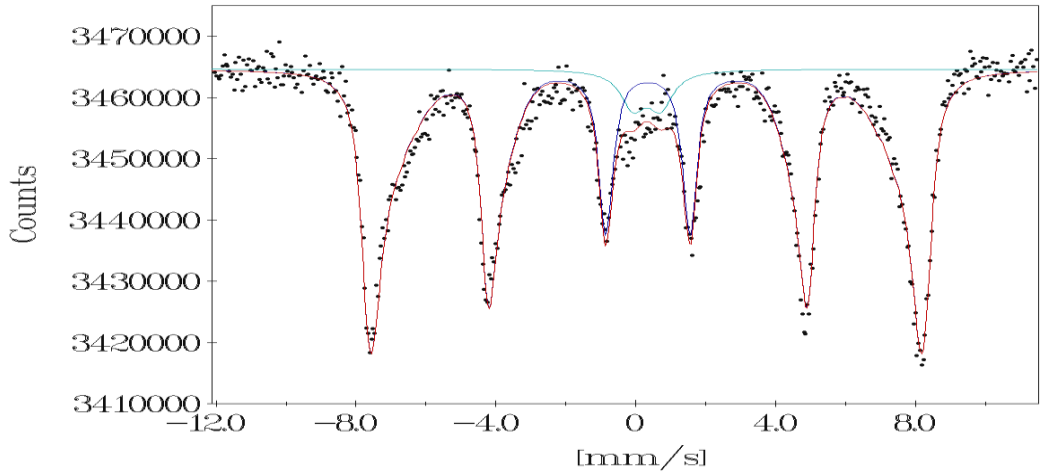
Na TG křivce (zelená) jsou vyznačeny charakteristické body, označující hmotnostní úbytek navážky. Tvar křivky ukazuje na termický rozklad v několika krocích, ohraničený platy, což značí na ztrátu organické fáze. K této ztrátě dochází v rozmezí teplot 380°C – 580°C a úbytek hmotnosti činí přibližně 8% . Celkový úbytek hmotnosti je 10,82%, při konečné teplotě 700°C.

DSC křivka (modrá) popisuje probíhající exotermické a endotermické děje v navážce vzorku. V 85.minutě měření dochází u vzorku k exotermickému ději (krystalizaci).

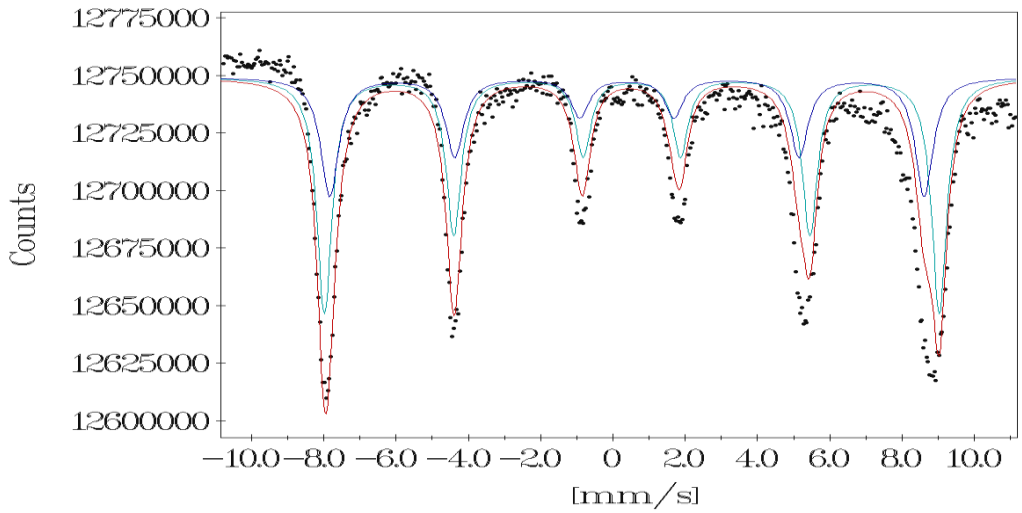
Termogravimetrické měření obou vzorků nanočástic (smCMC-Ar a smbisCOOH-CH) probíhalo v inertní N_2 atmosféře. Teplotní program byl zvolen v rozsahu 40°C – 700°C u nanočástic smbisCOOH-CH, u nanočástic smCMC-Ar 35°C – 700°C, při nárůstu teploty 10 K/min. Vzorky byly vloženy do kelímku z Al_2O_3, které nijak neovlivňují děje, které se ve vzorku, vlivem zvyšování teploty, odehrávají.

8.3 Mössbauerova spektroskopie

Teplota 300 K



Teplota 20 K



Obrázek 35. Představuje Mössbauerovská spektra vzorku smCMC-Ar, při teplotě 300 K a 20 K.

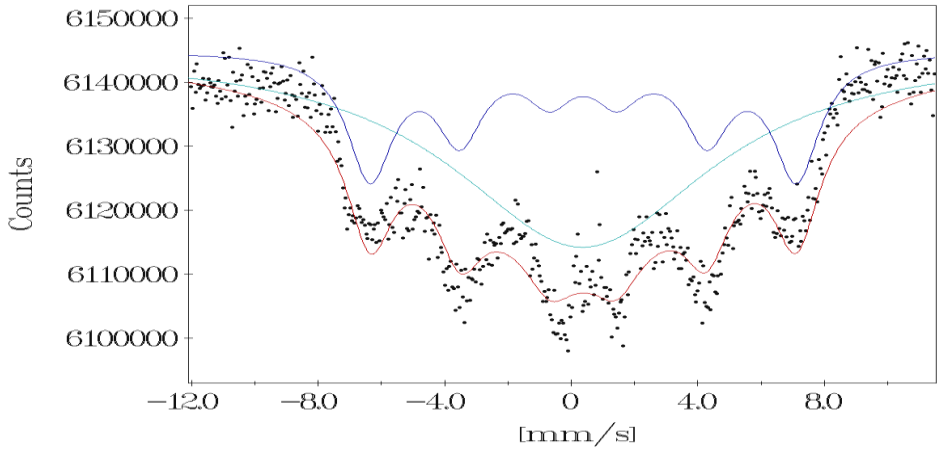
Tabulka 10. Hodnoty mössbauerovských hyperjemných parametrů odvozených z naměřených mössbauerovských spekter vzorku smCMC-Ar, kde T je teplota měření, δ je izomérní posun, ΔE_Q je kvadrupólové štěpení, B_{hf} je hyperjemné pole a RA je relativních spektrální ploch jednotlivých spektrálních komponent.

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_2O_3 – nanočástice v zablokovaném stavu
	Dublet	0.33	0.79	-------	6	γ-Fe_2O_3 – nanočástice v superparamagnetickém stavu
20	Sextet	0.38	0.00	51.1	37	Tetraedrické pozice γ-Fe_2O_3
	Sextet	0.51	0.00	52.9	63	Oktaedrické pozice γ-Fe_2O_3

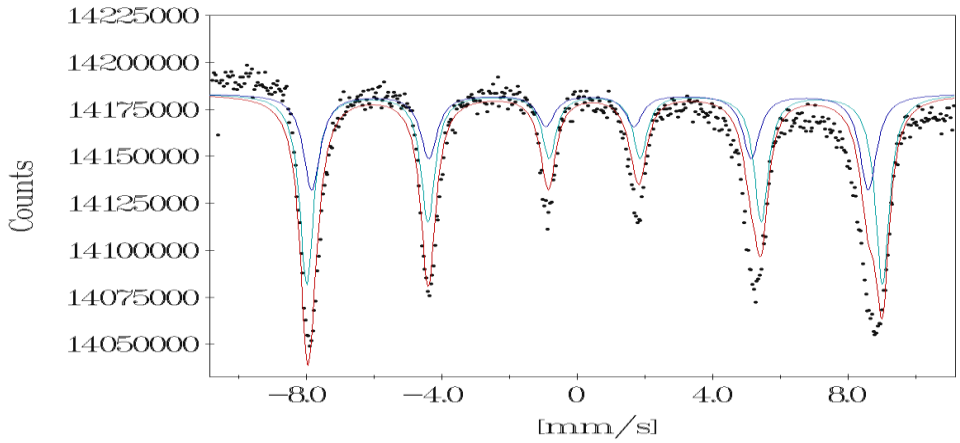
- Při pokojové teplotě se většina částic nachází v magneticky zablokovaném stavu
- Pouze nejmenší nanočástice vykazují superparamagnetismus z pohledu měření Mössbauerovy spektroskopie – nejmenší částice v systému.
- Střední blokovací teplota se nachází pod 300 K (určována jako teplota, kdy spektrální 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 hyperjemného pole sextetu odpovídá hodnotám běžně pozorovaným pro nanočásticové systémy γ-Fe_2O_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 γ-Fe_2O_3.
- Spektrální poměr tetraedrické sextetu ku oktaedrickému sextetu je 1:1,66, což přesně odpovídá stechiometrickému γ-Fe_2O_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 (neukázáno) při nízké teplotě (5K) a ve vnějším magnetickém poli (5T) byly rovněž identifikovány dvě spektrální komponenty (sextety), odpovídající tetraedrickým a oktaedrickým pozicím γ-Fe_2O_3 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.

Teplota 300 K



Teplota 20 K



Obrázek 36. Představuje Mössbauerovská spektra vzorku smbisCOOH-CH, při teplotě 300 K a 20 K.

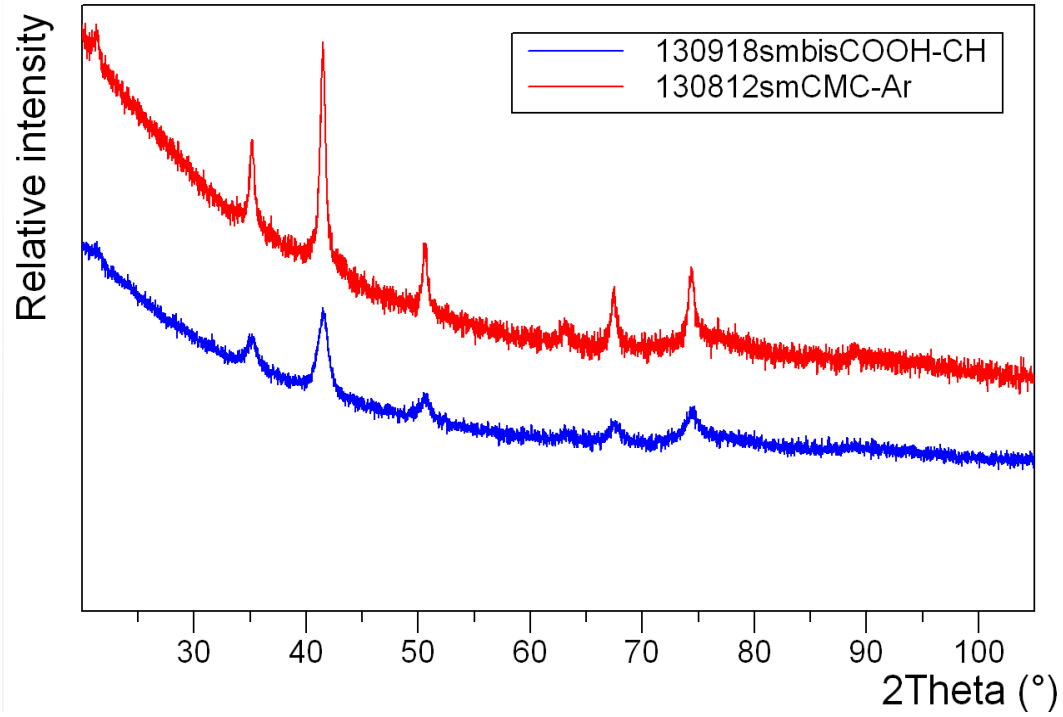
Ve srovnání spekter vzorků nanočástic jsou hlavní tyto rozdíly:

1. Nanočástice smbisCOOH-CH se nacházejí v superparamagnetickém stavu při pokojové teplotě.
2. Střední blokovací teplota se nachází nad teplotou 300K.
3. Z profilu spektra lze usoudit, že většina částic je menší než 15nm.

8.4 Rentgenová prášková difrakce

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)

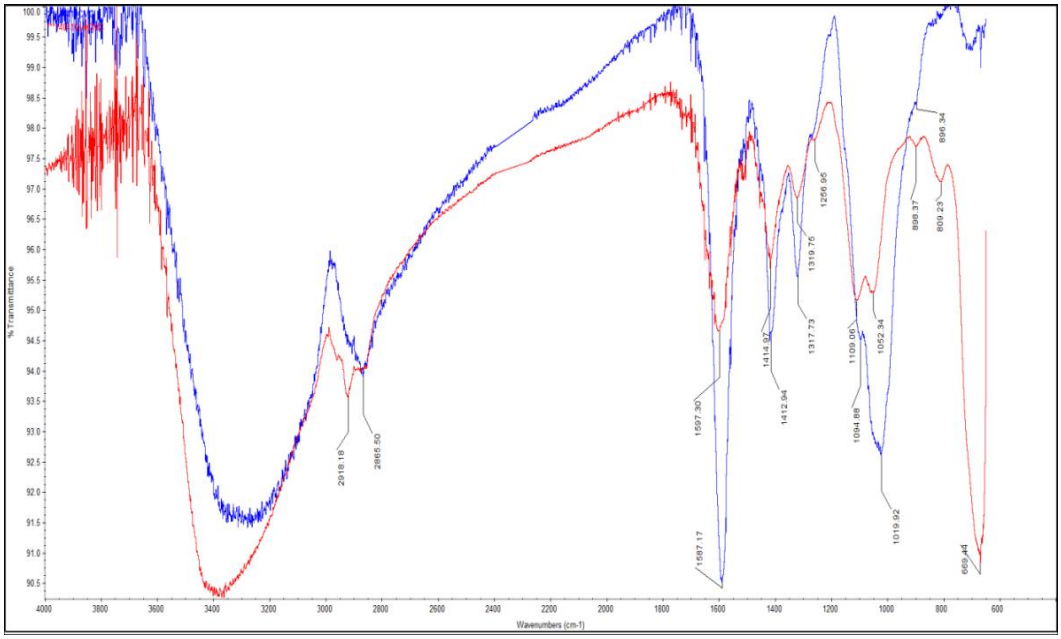
Tabulka 12 ukazuje výstupy z provedeného měření. U jednotlivých vzorků můžeme pozorovat střední velikost koherentních domén (MCL) a mřížkový parametr *a*.



Obrázek 37. Zachycuje difraktogram vzorků smbisCOOH-CH (modrý) a smCMC-Ar (červený).

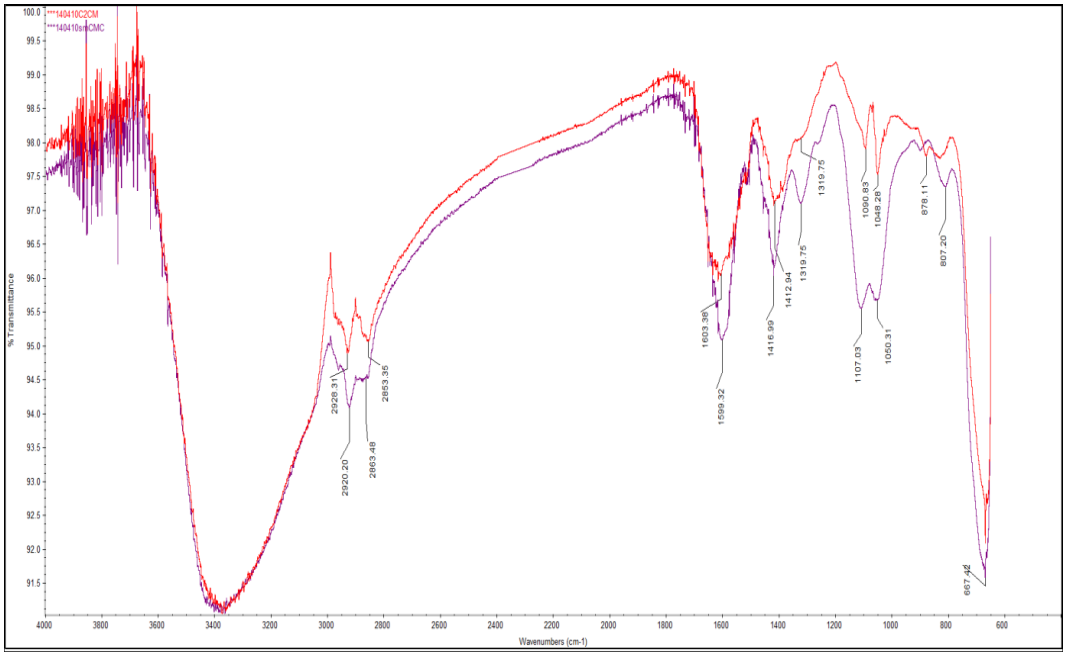
Difrakční záznam nám poukazuje na podíl amorfní a krystalické fáze. Tvar difrakčních maxim je charakteristickým rysem krystalinity. Z vodorovné osy můžeme posoudit velikost parametru d, který udává mezirovinnou vzdálenost v mřížce.

8.5 Infračervená spektroskopie



Obrázek 38. 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}. Charakteristické vibrace v oblasti 670 cm^{-1} náleží magnetitu [34]



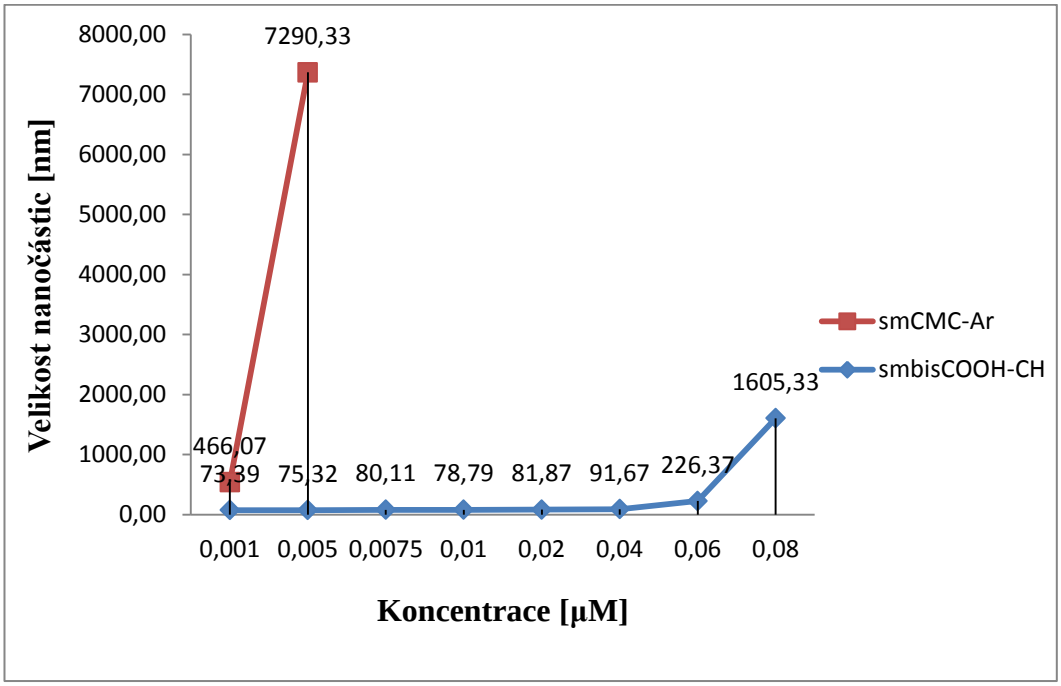
Obrázek 39. Graf představuje 2 IČ spektra. Spektrum označené modře přísluší polymeru bisCOOH-CH (biskarboxychitosan), červené označuje nanočástice smbisCOOH-CH obalené tímto polymerem.

Tato spektra vykazují podobné charakteristické vibrace, jako předchozí vzorek.

8.6 Dynamický rozptyl světla

První měření velikosti koloidních částic bylo provedeno s roztokem ředěným ddH_2O. Vzorek smbisCOOH-CH obsahoval částice s průměrnou velikostí (Z-Average) 103 nm a u vzorku smCMC-Ar byla průměrná velikostní distribuce 122 nm.

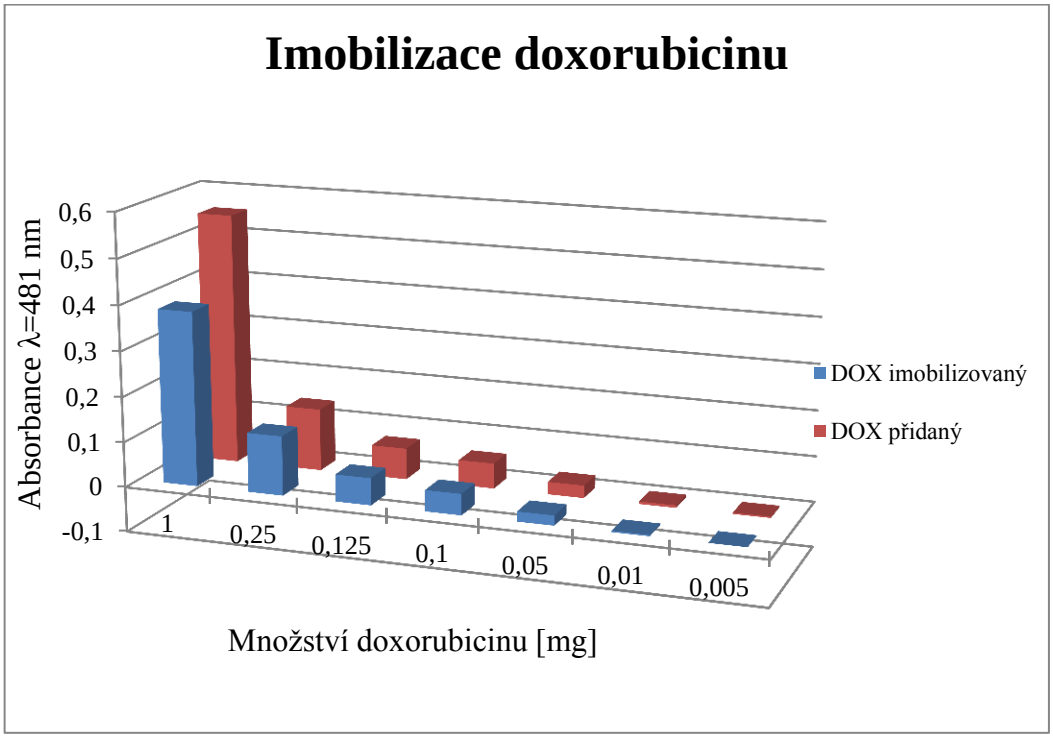
Měření koloidních částic zředěných NaCl se uskutečnilo ve trojím opakování. Z jednotlivých výsledků se vyhotovil aritmetický průměr. Dle křivky lze pozorovat změnu velikosti koloidních částic, vzhledem k různé molární koncentraci roztoku. Z níže uvedeného grafu lze pozorovat pokles hydrodynamického poloměr. 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 40. Graf znázorňuje velikostní distribuci podle hydrodynamického poloměru částic.

Obrázek 40 značí, že vzorek smCMC-Ar vykazuje menší míru stability v koloidním prostředí. O nanočásticích vzorku smbisCOOH-CH lze hovořit do koncentrace 0,06 µM, protože vykazují hydrodynamický poloměr 226 nm. Tak velké nanočástice však nelze použít v medicínských aplikacích, protože by byly za krátkou dobu rozpoznány imunitním systémem. Dalším důvodem nemožnosti použití je i fakt, že koncentrace se neblíží simulaci prostředí v lidském těle.

8.7 Spektroskopické stanovení imobilizovaného doxorubicinu



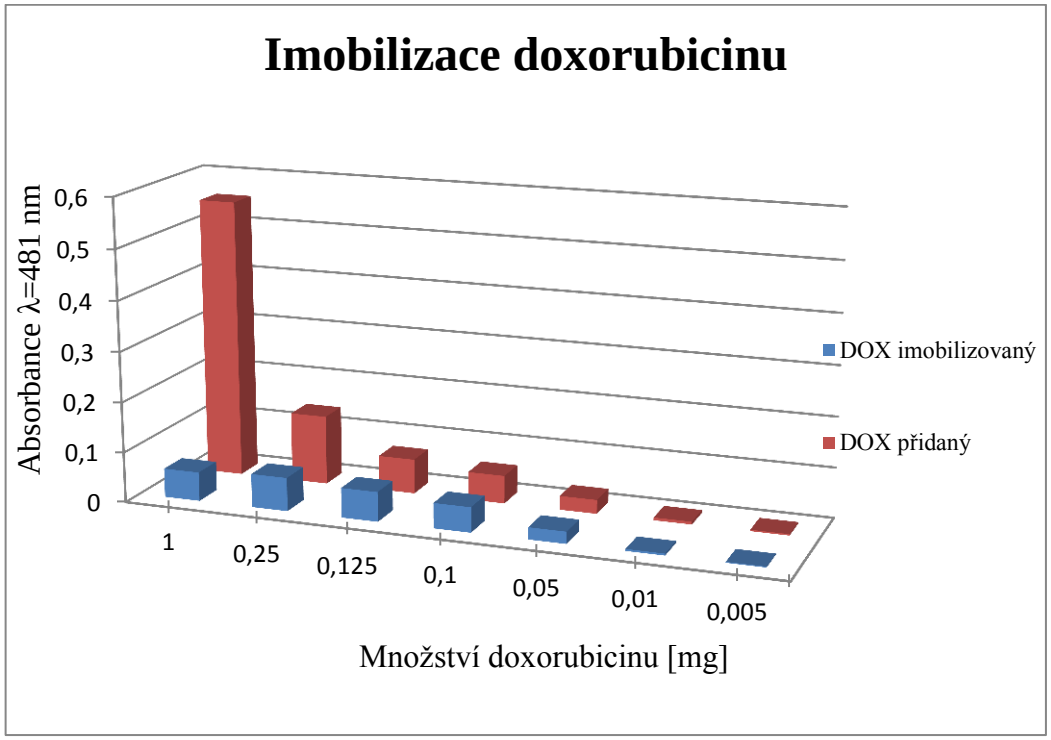
Graf 3 znázorňuje rozdíl v množství doxorubicinu přidaného do reakce (červený sloupec) a doxorubicinu imobilizovaného na povrch smbisCOOH-CH (modrý sloupec).

U koloidního roztoku nanočástic smbisCOOH-CH jsme se u 0,005 mg přidaného doxorubicinu pohybovali v záporných číslech. Tuto chybu jsme přisoudili problému při pipetování roztoku. Nejvyšší míru imobilizace vykazují vzorky č. 2,3,4 (jak je uvedeno v tabulce č. 13). Vůbec nejvyšší procento imobilizace (95%)

se vyskytuje u vzorku č. 2. Při vyšším množství přidaného doxorubicinu paradoxně nedojde k nejvyššímu procentu vyvázání na povrch nanočástice, protože je již obsazena většina karboxylových skupin, tudíž se jich nevyskytuje vazebné místo pro více molekul doxorubicinu

č. vzorku	**mg DOX**	**ředění**	**Absorbance (λ_{481nm})**	**Koncentrace (mg/ml)**	**Koncentrace imobilizovaného doxorubicinu (mg/ml)**	**Původní koncentrace (mg/ml)**	**Kvantifikace (%)**
1	1	10	0,338	0,170	0,385	0,555	69,3
2	0,25	1	0,138	0,007	0,131	0,138	95,0
3	0,125	1	0,185	0,009	0,060	0,069	86,5
4	0,1	1	0,18	0,009	0,047	0,056	83,7
5	0,05	1	0,114	0,006	0,022	0,028	79,3
6	0,01	1	0,058	0,003	0,003	0,006	47,3
7	0,005	1	0,06	0,003	-0,0002	0,003	-8,9

Tabulka 13 představuje jednotlivé série vzorků koloidního roztoku nanočástic smbisCOOH-CH s doxorubicinem



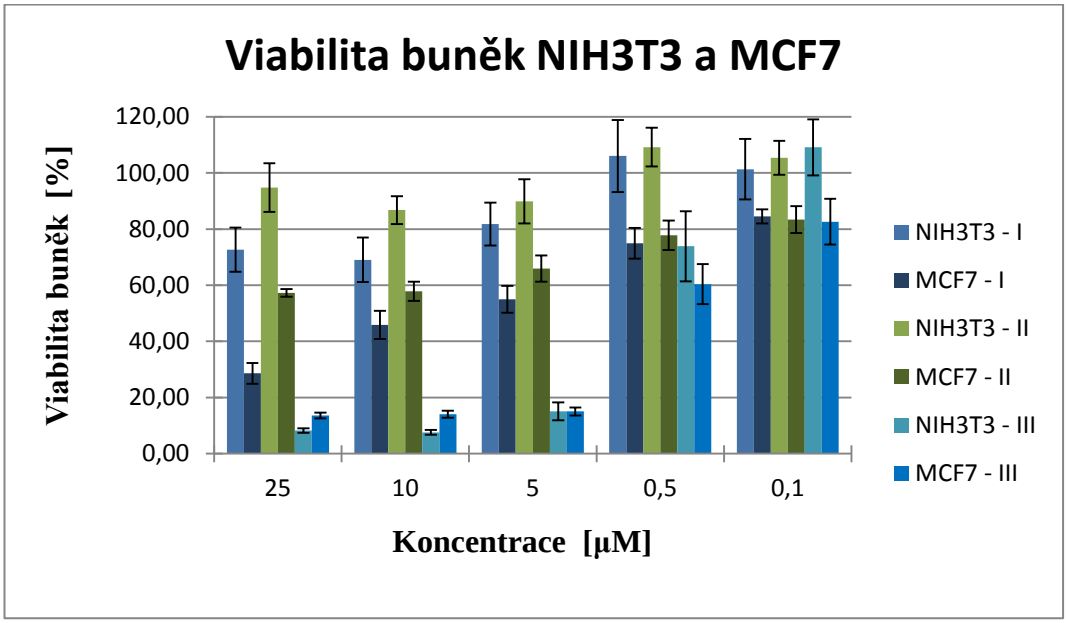
Graf 4 znázorňuje rozdíl v množství doxorubicinu přidaného do reakce (červený sloupec) a doxorubicinu imobilizovaného na povrch smCMC-Ar (modrý sloupec)

Nejvyšší procentuální vyvázání doxorubinu vykazovaly vzorky číslo 3,4,5, a sice v rozmezí 85,5 % - 89,7 %, viz tabulka 14. Tyto vzorky však podlehly celkové agregaci, proto je nebylo možné použít v dalších částech experimentu.

Č. vzorku	mg DOX	ředění	Absorbance (λ_{481nm})	Koncentrace (mg/ml)	Koncentrace imobilizovaného doxorubicinu (mg/ml)	Původní koncentrace (mg/ml)	Kvantifikace (%)
1	1	10	0,987	0,497	0,058	0,555	10,4
2	0,25	1	1,417	0,071	0,067	0,138	48,3
3	0,125	1	0,198	0,001	0,059	0,069	85,5
4	0,1	1	0,114	0,006	0,050	0,056	89,7
5	0,05	1	0,077	0,004	0,024	0,028	86,0
6	0,01	1	0,035	0,002	0,004	0,006	68,2
7	0,005	1	0,022	0,001	0,002	0,003	60,1

Tabulka 14 představuje jednotlivé série vzorků koloidního roztoku nanočástic smCMC-Ar s doxorubicinem

8.8 Cytotoxické testy



Graf 5. Viabilita buněčných linií NIH3T3 a MCF7.

Graf viability buněk srovnává dvě buněčné linie a sice MCF7 a NIH3T3. Z grafu je patrné, že nádorové buňky MCF7 jsou téměř ve všech případech citlivější na aplikovanou látku, než buňky NIH3T3. Největší inhibici růstu vykazuje samostatný doxorubicin při aplikaci vysokých koncentrací a to 25 µM, 10 µM a 5 µM. U roztoku II, což byl koloidní roztok nanočástic smbisCOOH-CH s doxorubicinem v poměru 8:1, lze z grafu vyčíst, že ani v jednom případě viabilita buněk nespadla po 50%, a proto nebylo možné určit inhibiční koncentraci. Pozitivní výsledek jsme zjistili u vzorku I (koloidní roztok nanočástic smbisCOOH-CH s doxorubicinem v poměru 4:1), který sice nevykazoval vysokou míru toxicity, jako samostatný doxorubicin, ale již šla určit hodnota IC50 jak je patrné z následující tabulky č. 15

Buňky + testovaný roztok		IC50 (μM)
1.	I-MCF7	11,978
2.	I-NIH3T3	X
3.	II-MCF7	X
4.	II-NIH3T3	X
5.	III-MCF7	1,1937
6.	III-NIH3T3	1,1214

I – koloidní roztok nanočástic a doxorubicinu v poměru 4:1

II – koloidní roztok nanočástic a doxorubicinu v poměru 8:1

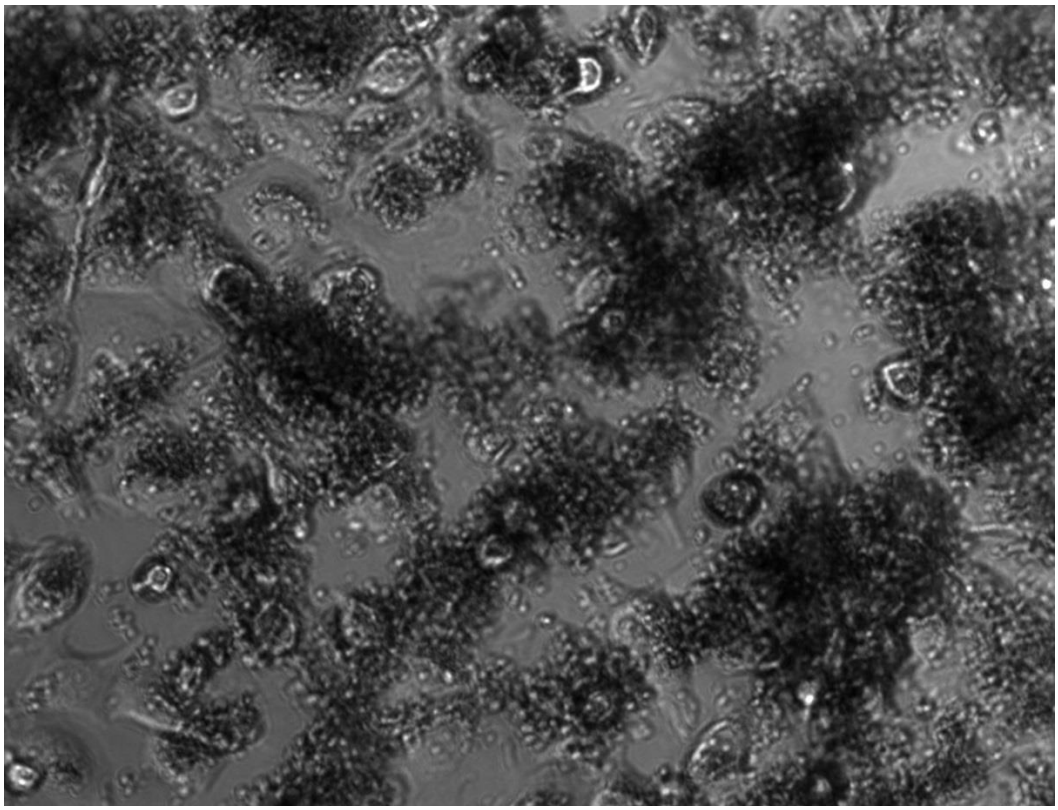
III – chemoterapeutikum doxorubicin

Tabulka 15. Naměřené hodnoty inhibiční koncentrace pro oba typy buněčných linií a se třemi různými roztoky.

Hodnota IC50 šla stanovit pouze ve třech případech. U testů označených 2.,3.4. docházelo k většímu, než 50%, přežití buněk, a proto nešla hodnota IC50 stanovit.

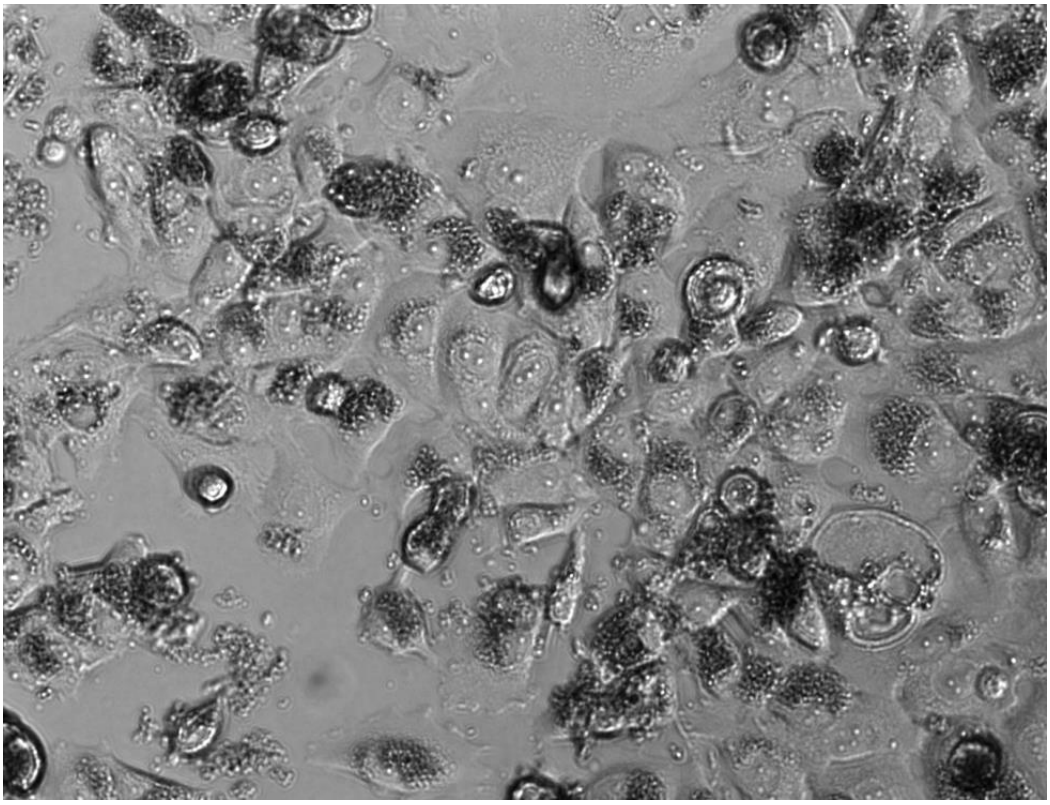
- Ve své studii Antonella Migliettaa spol. [35] uvádí hodnotu IC50 u buněčné linie MCF7 pro samotný doxorubicin 10,9 ng/ml a pro komplex SLN-DOX 1,0 ng/ml. Komplex SLN jsou pevné lipidové nanokuličky. Ve své práci jsem dosáhl

hodnoty inhibiční koncentrace u buněk MCF7 (koloidní roztok I – koncentrace 25 μM) 11,978 μM a hodnota IC50 pro samostatný doxorubicin byla 1,1937 μM. Při této vysoké koncentraci však docházelo k velkému shlukování nanočástic (agregaci), jak lze vidět na obrázku 41 42:



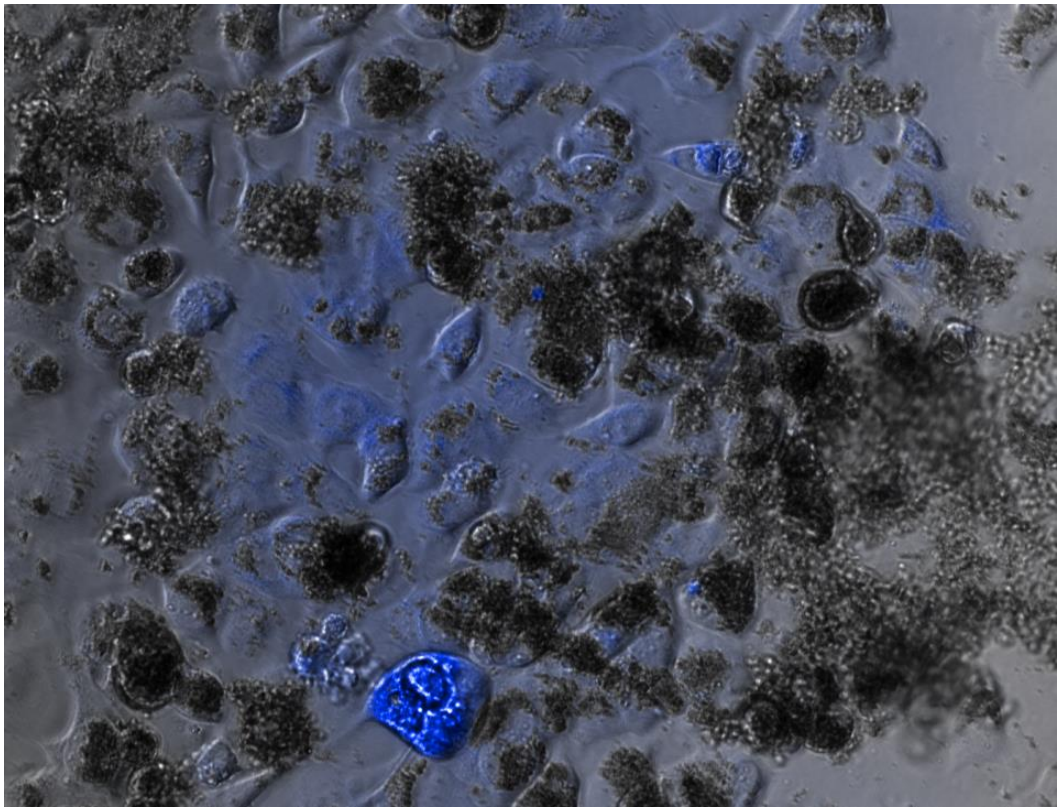
Obrázek 41. Fotografie ze světelného mikroskopu buněk MCF7 s koloidním roztokem nanočástic (č. I, koncentrace 25μM) po 24 hodinové inkubaci

Na snímku lze pozorovat vzniklé velké agregáty nanočástic spolu s nádorovými buňkami. Vidíme, že zde dochází k indukci apoptóze/nekrózy buněk, ale stále se objevuje větší množství buněk přeživších.



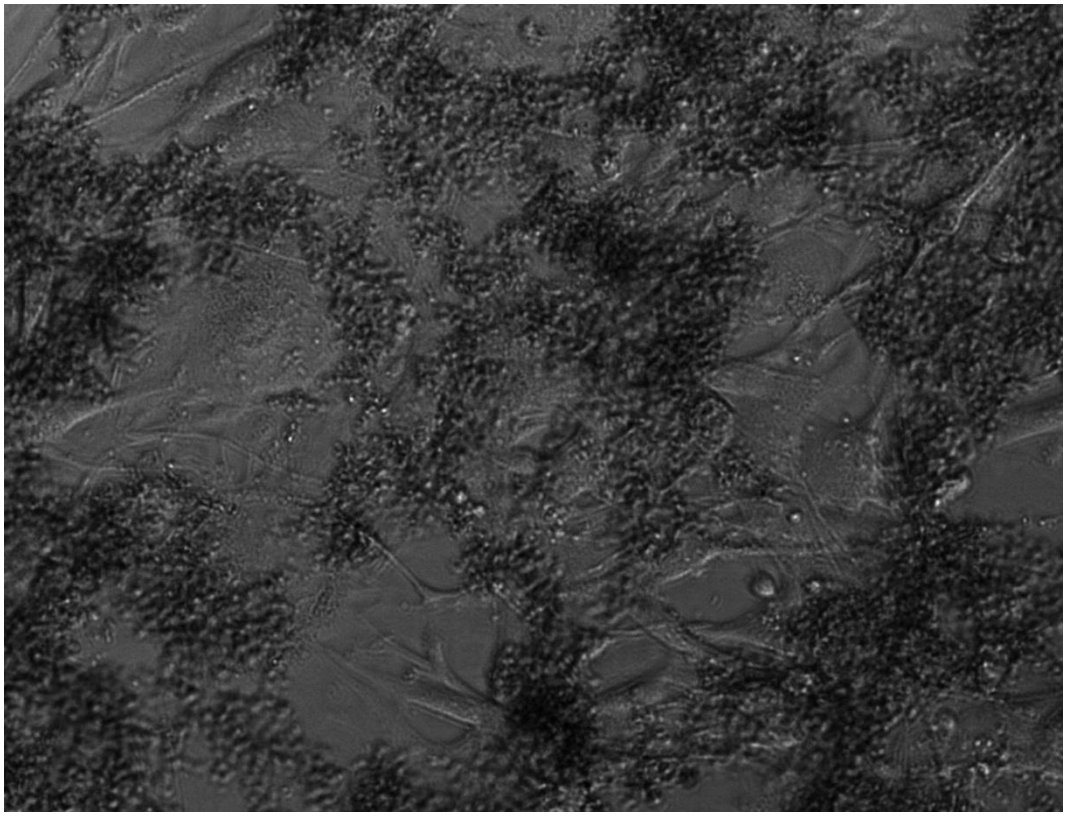
Obrázek 42. Fotografie ze světelného mikroskopu buněk MCF7 s koloidním roztokem nanočástic (č. I, koncentrace 25μM) po 24 hodinové inkubaci

Ze snímku z optického mikroskopu je patrné, že velká koncentrace testovaného roztoku způsobuje agregaci nanočástic a tím i k menším cytotoxickým účinkům. Na povrchu buněčných membrán lze pozorovat nanočástice, které na ně adherují. Z výše uvedeného obrázku nelze s jistotou určit, zda nanočástice prostupují buněčnou membránou.



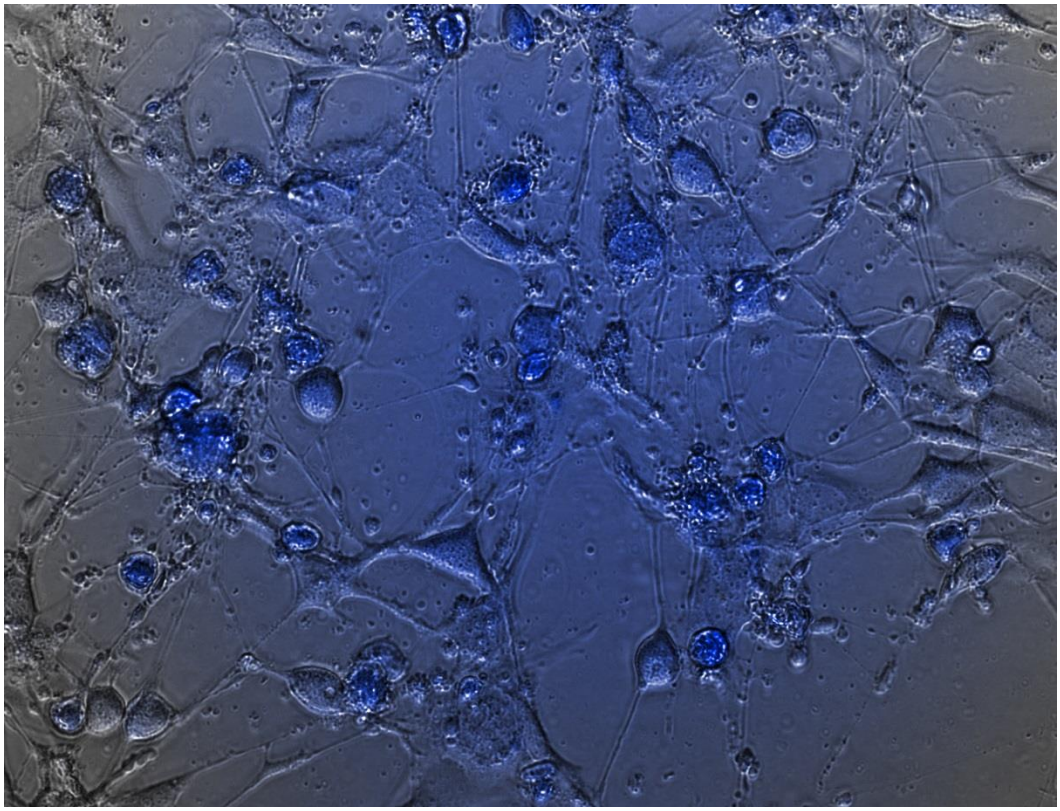
Obrázek 43. Fúze fotografií ze světelného mikroskopu ukazující fluorescenci doxorubicinu, při koncentraci 25μM, po 24 hodinové inkubaci s buňkami MCF7.

Z fúze lze posoudit částečný prostup nanočástic skrz buněčnou membránu (modrá barva). Dále lze vidět částečnou a velmi malou fluorescenci doxorubicinu. To může být způsobeno nedostatečným uvolněním imobilizovaného doxorubicinu z povrchu nanočástic a také z faktu, že nanočástice podléhají silné agregaci.



Obrázek 44. Fotografie ze světelného mikroskopu buněk NIH3T3 s koloidním roztokem nanočástic (č. I, koncentrace 25μM) po 24 hodinové inkubaci

Snímek představuje pohled na buňky NIH3T3 s vysokou koncentrací testovaného roztoku (viz nadpis fotografie). Stejně jako na předchozích obrázcích je patrná silná agregace nanočástic. Silná agregace může být jedna z příčin nižší cytotoxicity.



Obrázek 45. Fúze fotografií ze světelného mikroskopu ukazující fluorescenci doxorubicinu, při koncentraci 25μM, po 24 hodinové inkubaci s buňkami NIH3T3.

Na obrázku lze pozorovat buňky NIH3T3 s roztokem nanočástic a doxorubicinu, který díky své fluorescenci přispívá k lepší orientaci, kde se tento komplex nachází.

Závěr

Syntetizované nanočástice podstoupily kompletní fyzikálně-chemickou charakterizaci, při které bylo zjištěno mnoho důležitých parametrů, jakými je velikost částic a jejich morfologie, chemické složení nanočástic a jejich polymerního obalu. Pomocí metody na zjištění hydrodynamického poloměru nanočástic (DLS) jsem mohl posoudit míru použitelnosti těchto částic v simulovaném prostředí lidského těla, pomocí fyziologického roztoku NaCl. Výsledkem byla poměrně velká agregace částic.

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 dvojité COOH skupině na povrchu nanočástic vzorku smbisCOOH-CH, na které se doxorubicinu váže pomocí NH2 (amino) skupin.

Testem cytotoxicity byl zvolen MTT test, díky kterému jsem mohl zjistit účinnost syntetizovaného komplexu nanočástice-doxorubicin. Test byl prováděn na dvou buněčných liniích a sice NIH3T3 (myší embryonální fibroblasty) a MCF7 (lidský karcinom prsu). Po sérii pokusů jsem získal hodnotu IC50, což je hodnota inhibiční koncentrace při které uhyne 50% buněk. Tato hodnota byla pro vzorek označený I (koloidní roztok nanočástic s doxorubicinem v poměru 4:1) 11,978 μM. Pro samostatný doxorubicin byla hodnota IC50 znatelně menší, a sice u buněk NIH3T3 1,121 μM a u buněk MCF7 1,194 μM. V průběhu testu bylo možné pozorovat vyšší citlivost buněk MCF7 na chemoterapeutikum.

Výsledky cytotoxických testů nejsou uspokojivé, a proto bych chtěl ve svém dalším studiu detailněji pochopit mechanismus prostupu nanočástic přes buněčnou

membránu. Dále bych rád zapracoval na stabilizaci nanočástic, hlavně zamezení velké agregace, kterou jsem mohl pozorovat při práci. V nových publikacích se objevují velmi vysoké hodnoty imobilizované doxorubicinu (cca 98%), a proto je pro mě výzvou se dostat k podobné procentuální hodnotě imobilizace, při zachování vysoké stability částic a také jejich malého poloměru.

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-RIAHI, 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

[35] MIGLIETTA, A., CAVALLI, R., BOCCA, C., GABRIEL, L., ROSA GASCO, M. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, vol. 210, no. 1-2, p. 61–67.