

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



**Príprava a charakterizácia bimodálnej fluorescenčnej
kontrastnej látky obsahujúcej superparamagnetické
nanočastice oxidov železa**

Bakalárska práca

Autor:	Lucia Živčicová
Štúdijný program:	B1407 Chemie
Štúdijný odbor:	Bioorganická chemie
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.
Rok:	2016

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne, s použitím všetkých uvedených informačných zdrojov a literatúry. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

Súhlasím s tým, aby moja práca bola sprístupnená v knižnici Katedry organickej chémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci , 9. 5. 2016

.....

Podpis

Pod'akovanie:

Predovšetkým by som sa chcela poďakovať vedúcej tejto bakalárskej práce Mgr. Kateřine Polákovej, Ph.D. nie len za jej odborné vedenie, nápady, postrehy a konzultácie ale aj za pomoc pri fluorescenčnom mikroskopovaní a pri aplikácii vzorky na bunky.

Za cenné rady, pripomienky a za poskytnutie SPIO nanočastíc a materiálov ďakujem Mgr. Zdenke Medříkovej, Ph.D.

Moja vďaka patrí i Ing. Ondřejovi Kozákovi, Ph.D. za meranie fluorescenčných spektier a prínosné konzultácie.

V neposlednom rade by som chcela poďakovať celému Regionálnemu centru pokročilých technológií a materiálov v Olomouci za poskytnutie priestorov, zariadení, prístrojov a materiálov pre praktickú časť tejto práce a všetkým pracovníkom RCPTM za ochotu a akúkoľvek pomoc.

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora: Lucia Živčicová

Názov práce: Príprava a charakterizácia bimodálnej fluorescejšnej kontrastnej látky obsahujúcej superparamagnetické nanočastice oxidov železa

Typ práce: Bakalárska

Pracovisko: RCPTM

Školiteľ: Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt:

Predložená bakalárska práca je zameraná na prípravu a charakterizáciu bimodálnej fluorescenčnej kontrastnej látky, ktorá obsahuje superparamagnetické nanočastice oxidov železa.

V teoretickom úvode sú popísané základné vlastnosti a znaky SPIO nanočastíc, konkrétne magnetitu a maghemitu, ich úprava pre biotechnologické využitie a príklady ich medicínskych aplikácií. V ďalšej časti teoretického úvodu je opísaná konjugácia SPIO nanočastíc s fluorescenčnými látkami, princíp fluorescencie, základné vlastnosti fluorescenčných značiek a výhodnosť využitia duálneho systému SPIO nanočastica + fluorescenčné farbivo pre optické zobrazovanie.

Praktická časť sa zaoberá naviazaním fluorescenčnej látky na povrch SPIO nanočastíc a overením väzby „častica – fluorescenčná látka“ metódou fluorescenčnej mikroskopie, spektrofluorimetrie, využitím merania zeta potenciálu a DLS.

Kľúčové slová: SPIO nanočastice, magnetit, fluorescencia, fluoresceín

Počet strán: 45

Počet príloh: 0

Jazyk: slovenčina

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Lucia Živčicová

Title: Preparation and characterization of dual fluorescent contrast agent containing superparamagnetic iron oxide nanoparticles.

Type of thesis: Bachelor

Department: RCPTM

Advisor: Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract:

This bachelor thesis is focused on preparation and characterization of dual fluorescent contrast agent containing superparamagnetic iron oxide nanoparticles.

The theoretical part deals with the basic characteristics and features of SPIO nanoparticles, namely magnetite and maghemite, their modification for biotechnological use and examples of their medical applications. The next part of theoretical introduction describes conjugation of SPIO nanoparticles with fluorescent labels, principle of fluorescence, basic characteristics of fluorescent labels and advantages of dual system - SPIO nanoparticle+fluorescent dye for optical imaging.

The practical part is focused on binding of fluorescent substance on the surface of the nanoparticles and verification of conjugation "nanoparticle - fluorescent dye" through fluorescence microscopy, spectrofluorimetry, the measurement of zeta potential and DLS.

Keywords: SPIO nanoparticles, magnetite, fluorescence, fluoresceine

Number of pages: 45

Number of appendixes: 0

Language: Slovak

Zoznam použitých skratiek:

CT – počítačová tomografia (**C**omputed **T**omography)

Cy5, Cy7 – kyanín5, kyanín7

DMF - dimetylformamid

DMSO - dimetylsulfoxid

DTAF – dichlorotriazinyl aminofluoresceín

DLS – dynamický rozptyl svetla (**D**ynamic **L**ight **S**cattering)

EGFP – zdokonalené zelené fluorescenčné proteíny (**E**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**roteins)

FITC – fluoresceín izotiokyanát

FT-IR – infračervená spektroskopia (**F**ourier **T**ransform – **I**nfra**R**ed)

GFP – zelené fluorescenčné proteíny (**G**reen **F**luorescent **P**roteins)

MIONs – magnetické nanočastice oxidov železa (**M**agnetic **I**ron **O**xide **N**anoparticles)

MRI – magnetická rezonancia (**M**agnetic **R**esonance **I**maging)

NIRF – (**N**ear **I**nfra**R**ed **F**luorescence)

PBS – fosfátový pufor (Phosphate Buffered Saline)

PET – **P**ozitrónová **E**misná **T**omografia

QDs – kvantové bodky (**Q**uantum **D**ots)

SEM - **S**kenovacia **E**lektrónová **M**ikroskopia

SPECT - jednofotónová emisná tomografia (**S**ingle **P**hoton **E**mission **C**omputed **T**omography)

SPIO – superparamagnetické nanočastice oxidov železa (**S**uper**p**aramagnetic **I**ron **O**xide)

SQUID – supravodivé kvantové interferenčné zariadenie (**S**uperconducting **Q**uantum **I**nterference **D**evice)

TEM – **T**ransmisná **E**lektrónová **M**ikroskopia

Obsah

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1	Nanotechnológie a Nanočastice	10
2.1.1	Jednodoménošnosť a Superparamagnetizmus.....	10
2.2	SPIO nanočastice v bioaplikáciách a biotechnológiách.....	11
2.2.1	Magnetit (Fe_3O_4).....	12
2.2.2	Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).....	14
2.3	Využitie SPIO nanočastíc v medicíne.....	14
2.3.1	Kontrastné látky v MRI.....	15
2.3.2	Nosiče liečiv	17
2.3.3	Hypertermia.....	17
2.3.4	Magnetické separácie.....	19
2.4	Konjugácia SPIO nanočastíc s fluorescenčnými značkami	19
2.4.1	Fluorescencia.....	21
2.4.2	Základné vlastnosti fluorescenčných značiek.....	22
2.4.3	Molekulové zobrazovanie a optical imaging.....	23
3	CIELE PRÁCE	26
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
4.1	Použitie experimentálne metódy na určenie fyzikálno – chemických vlastností nanočastíc	27
4.1.1	Transmisná elektrónová mikroskopia (TEM).....	27
4.1.2	Dynamický rozptyl svetla (DLS).....	27
4.1.3	Zeta potenciál (ζ)	28
4.1.4	Fluorescenčná mikroskopia	29
4.1.5	Spektrofluorimetria	29
4.2	Používané SPIO častice	30
4.2.1	Príprava a charakterizácia častíc.....	30
4.3	Fluoresceín	33
4.4	Naviazanie fluoresceínu na SPIO nanočastice	34
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	36
5.1	Meranie DLS po naviazaní fluoresceínu.....	36
5.2	Meranie Zeta potenciálu po naviazaní fluoresceínu	36

5.3	Fluorescenčná spektroskopia.....	37
5.4	Aplikácia vzorky na bunky	38
5.4.1	Postup aplikácie	38
5.4.2	Fluorescenčná mikroskopia	39
6	ZÁVER.....	40
7	LITERATÚRA	42

1 ÚVOD

Nanotechnológie patria v súčasnosti k najskloňovanejšiemu pojmu v oblasti výskumu a mnohými vedcami sú pokladané za jedno z najperspektívnejších odvetví 21. storočia.

Sú využiteľné v širokom rozsahu odborov - napríklad v textilnom priemysle, kde sa využívajú na výrobu nekrčivých nezmáčateľných odevov. Práve vďaka nezmáčateľnému povrchu sú využiteľné aj v automobilovom priemysle na tvorbu filtrov čelných skiel. V potravinárstve sa uplatňujú na značkovanie potravín a odstraňovanie nečistôt, v strojárstve na výrobu supertvrdých povrchov s nízkym trením.

Ďalšími odvetviami kde sa s nimi môžeme stretnúť je elektronika, chemický, optický, kozmický, vojenský či elektrotechnický priemysel.

V medicíne sa nanomateriály využívajú na prípravu dezinfekčných roztokov novej generácie, ako analyzátory, súčasti umelých kĺbov a chlopní, ako náhrada tkanív, pri cielenom transporte liečiv, ako kontrastné látky pri zobrazovaní magnetickou rezonanciou, na bunkové či molekulové zobrazovanie, na biologické separácie a tiež pri hypertermii.

Na povrch nanočastice, ktorá je obalená bioaktívnou látkou, môže byť naviazané fluorescenčné farbivo a k charakterizácii a lokalizácii bimodálnej látky môže byť využité nie len zobrazovanie magnetickou rezonanciou, ale aj rada optických metód, akými je napríklad spektrofluorimetria a fluorescenčná mikroskopia.

Preto je cieľom tejto práce pripraviť bimodálnu fluorescenčnú kontrastnú látku a pomocou fluorescenčnej mikroskopie a spektroskopie ju charakterizovať.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Nanotechnológie a Nanočastice

Nanotechnológie sú vedná oblasť zaoberajúca sa návrhom, výrobou a aplikáciami nanomateriálov. Skúma základné vzťahy medzi fyzikálnymi vlastnosťami a javmi materiálov v závislosti od ich rozmerov. ^[1] Tento interdisciplinárny odbor sa stal fenoménom od konca 90. rokov. Týka sa objektov, ktorých veľkosť aspoň v jednom „smere“ je od 1 do 100 nm – nanočastíc. ^[2]

Keď častice dosiahnu rozmer pod 100 nm, výrazne sa tým líšia ich fyzikálno-chemické vlastnosti- napríklad optické, elektrické, magnetické či katalytické. Ich veľmi zaujímavou vlastnosťou je aj nárast pomeru plochy povrchu k objemu, čo ovplyvňuje väčšinu fyzikálnych a chemických väzieb na hraniciach zŕn v materiále. ^[3]

2.1.1 Jednodoménovosť a Superparamagnetizmus

V dôsledku zmenšovania veľkosti častíc dochádza v magneticky usporiadaných materiáloch zároveň aj k ubúdaniu magnetických domén, až kým nenastane stav, že je častica tvorená len jednou doménou. Avšak aj takéto jednodoménové častice môžu navonok vykazovať obrovský magnetický moment (tzv. superspin), ktorého veľkosť je v rozmedzí tisícov až desiatok tisícov Bórových magnetónov. Takto vytvorený jednodoménový materiál nadobúda jedinečnosť v spojení so superparamagnetizmom. ^[4]

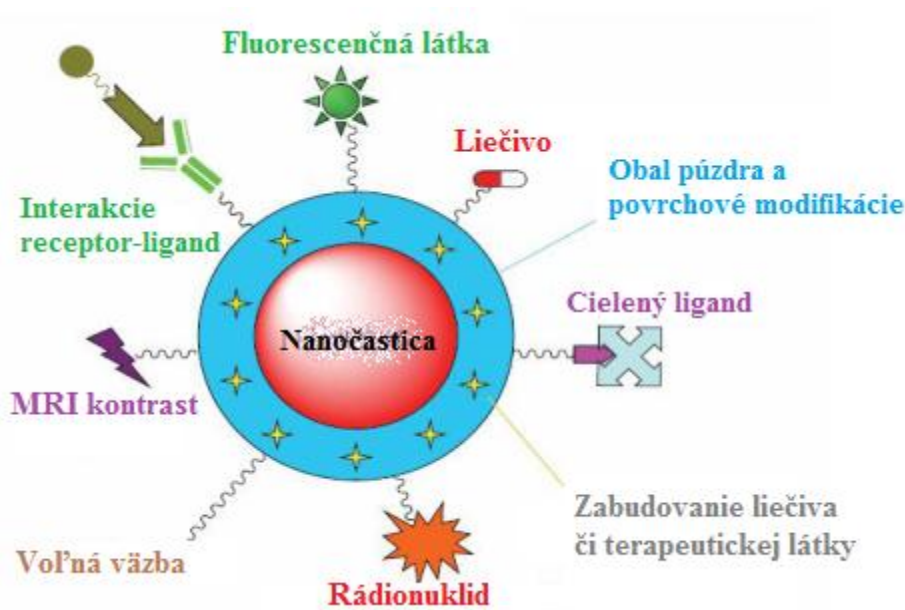
Superparamagnetizmus je jav, ktorý môžeme pozorovať vo feromagnetických alebo ferimagnetických nanočasticiach, kde môže magnetizácia pod vplyvom teploty náhodne zmeniť svoj smer. Čas medzi dvoma zmenami sa nazýva relaxačná doba (τ). Je závislá na teplote a veľkosti častice. So zmenšujúcim sa rozmerom častíc sa znižuje aj teplotná energia potrebná na preklopenie magnetického momentu cez magnetickú anizotropnú bariéru, čo zabezpečuje superparamagnetickým nanočasticiam veľmi rýchlu odozvu na vonkajšie magnetické pole. Vďaka týmto unikátnym magnetickým vlastnostiam sú SPIO nanočastice vhodné pre biomedicínske aplikácie. ^[5]

2.2 SPIO nanočastice v bioaplikáciách a biotechnológiách

Pre bioaplikácie sa používajú nanočastice oxidov železa, ktoré sa na základe veľkosti častíc delia do troch kategórií na: a) VSOP (very small superparamagnetic iron oxide particles), s aspoň jedným rozmerom menším ako 10nm, b) USPIO (ultra small superparamagnetic iron oxide particles) s rozmerom približne 20 nm, c) SPIO (superparamagnetic iron oxide), ktorých veľkosť je nad 30 nm.^[6]

Vďaka vhodnému rozmeru, veľkej ploche povrchu (stovky m^2/g), biokompatibilite, netoxicity a hlavne vďaka nadštandardným magnetickým vlastnostiam je najčastejšie využívaný superparamagnetický materiál vo forme magnetitu alebo maghemitu.^[7]

Aby mohli byť SPIO nanočastice použité pre bioaplikácie, musí najskôr dôjsť k úprave ich povrchu pomocou funkcionalizujúcej fázy, ktorá musí byť netoxická a biokompatibilná. Táto fáza by mala tiež zabezpečovať stabilitu, ochranu častíc pred agregáciou a zabraňovať reakciám nanočastíc s krvnou plazmou.^[8,9] Takto upravené nanočastice sa teda skladajú z magnetického jadra (core) a povrchovej obalujúcej vrstvy (shell), bez ktorej by boli toxické. Veľkou výhodou funkcionalizačného obalu je aj to, že jeho povrch môže byť chemicky modifikovaný (vid' Obr. 1).^[10] Najčastejšie sa na obalovanie magnetického jadra využíva škrob, albumín, polyetylén glykol, silikón či dextrán.^[6]



Obr. 1: Na obrázku je znázornená nanočastica obalená biokompatibilnou povrchovou vrstvou a možnosti imobilizácie rôznych látok na túto povrchovú vrstvu. Upravené podľa ^[11]

Medzi najviac skúmané a používané SPIO nanočastice v biomedicíne patria dve štruktúrne formy oxidov železa a to magnetit a maghemit. ^[3]

2.2.1 Magnetit (Fe_3O_4)

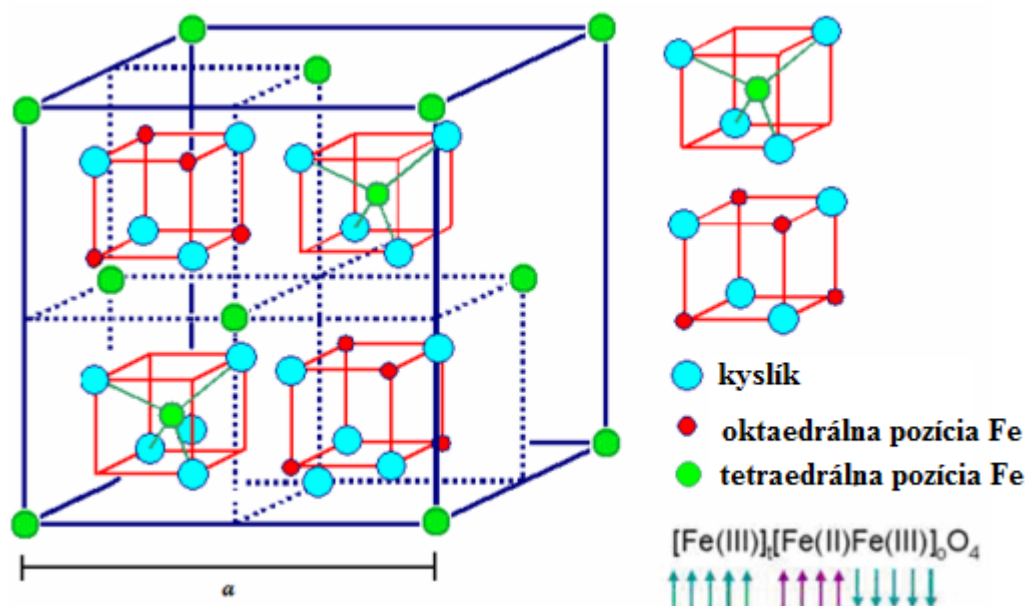
Magnetit, inak známy aj pod názvom magnetovec je ferimagnetický materiál čiernej farby, ktorý obsahuje Fe^{2+} a Fe^{3+} ióny, bežne sa vyskytujúci v prírode vo forme minerálov. Je to najstaršia známa železná ruda s magnetickými vlastnosťami, vyskytujúca sa v prírode ako kryštalický zrnitý nerast. Jeho prítomnosť bola potvrdená aj v meteoritoch pochádzajúcich z Marsu, v telách včiel, holubov a iných živých organizmov. Je pravdepodobné, že kvôli obsahu malých magnetických kryštálikov v ich telách sa dokážu orientovať pomocou magnetického poľa Zeme. ^[3,4] Zmenšovaním častíc pod úroveň 10-30 nm vykazuje magnetit superparamagnetické vlastnosti. ^[12]

Prirodzene syntetizované nanočastice magnetitu o veľkosti 50-100 nm obalené fosfolipidovou membránou poskytujú *magnetotaktické baktérie*, ktoré ich vytvárajú

biomineralizáciou. Častice, ktoré vznikli touto cestou sa nazývajú *magnetozómy*. Vďaka vhodným magnetickým vlastnostiam, stálej veľkosti, biokompatibilite a ich neinteragujúcemu systému sa javia ako vhodný materiál pre bioaplikácie, kde môžu nájsť uplatnenie ako nosiče liečiv, protilátok alebo enzýmov. ^[13]

Molekula Fe_3O_4 sa vyskytuje v inverznej kubickej spinelovej štruktúre s vyváženou koncentráciou Fe^{3+} a Fe^{2+} iónov, ktoré sa nachádzajú v oktaédrických pozíciách spoločne so zvyšným počtom Fe^{3+} iónov, ktoré sú usporiadané tetraédricky. ^[12] Do plošne centrovanej kubickej mriežky sú usporiadané anióny kyslíka obklopené iónmi železa v oktaédrickom alebo tetraedrálom usporiadaní, a tak vytvárajú dve submriežky (viď Obr. 2). Stechiometricky môžeme usporiadanie iónov zapísať aj ako $\text{Fe}^{3+} [\text{Fe}^{2+} \text{Fe}^{3+}] \text{O}_4$. ^[14]

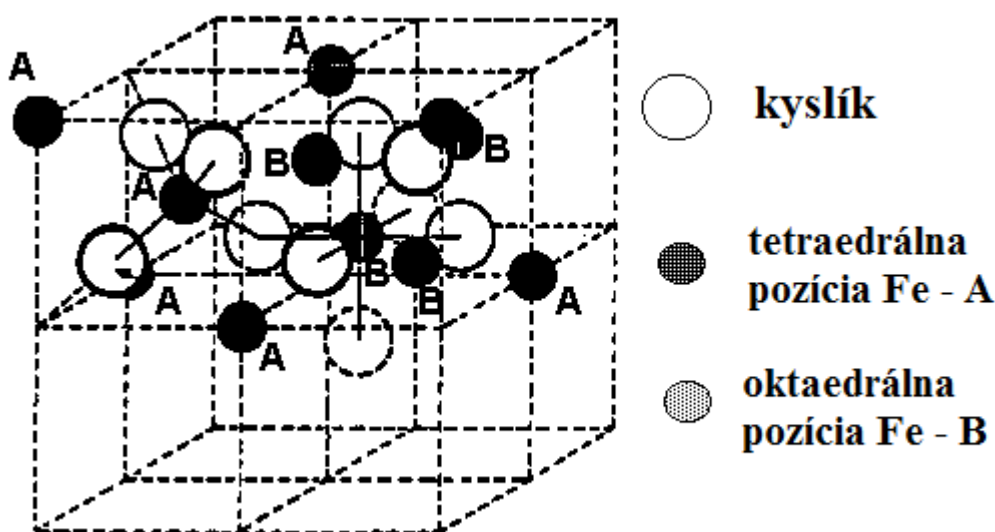
Magnetické momenty sú orientované antiparalalne, a preto má magnetit ferimagnetický charakter. Magnetizmus vzájomne opačne orientovaných iónov Fe^{3+} sa vyruší, čiže magnetické vlastnosti zabezpečujú ióny Fe^{2+} . ^[3,14]



Obr. 2: Na obrázku je znázornená štruktúra magnetitu. Upravené podľa ^[15]

2.2.2 Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

Maghemit je červenohnedý minerál, ktorý sa rovnako ako magnetit vyskytuje v inverznej kubickej spinelovej štruktúre (s dvoma podmriežkami) a pri poklese veľkosti pod 30 nm vykazuje superparamagnetické vlastnosti. ^[16] Je to modifikácia oxidu železitého, ktorá vzniká úplnou oxidáciou magnetitu, čiže je tvorený len trojmocnými iónmi železa. ^[17] Vo svojej štruktúre má katióny železa umiestnené v tetraedrických a oktaedrických pozíciách, pričom vakencie v oktaedrických pozíciách kompenzujú vzrast kladného náboja (viď Obr. 3). Je termicky málo stabilný a pri vyšších teplotách z neho vzniká hematit. ^[14,18]



Obr. 3: Obrázok znázorňuje štruktúru maghemitu. Upravené podľa ^[19]

2.3 Využitie SPIO nanočastíc v medicíne

V medicíne sa SPIO nanočastice najčastejšie využívajú pre cieleň transport liečiv, ako kontrastné látky v MRI, pri liečbe nádorových ochorení metódou hypertermie, ako náhrada tkanív či pre biomagnetické separácie. ^[20]

2.3.1 Kontrastné látky v MRI

To, že častice majú superparamagnetické chovanie zaisťuje kontrastné vlastnosti v MRI (Magnetic Resonance Imaging) v zobrazovanej oblasti, v ktorej sa SPIO nanočastice nachádzajú. Dnes je komerčne dostupných niekoľko desiatok druhov SPIO nanočastíc, ktoré môžu byť podané per-orálne alebo intravenózne. Najčastejšie sa však uplatňuje práve intravenózne zavedenie častíc do organizmu, kde môžu byť využité nielen ako kontrastné látky v MRI, ale tiež ako nosiče liečiv navádzané pomocou vonkajšieho magnetického poľa až na požadované miesto (napríklad k nádoru).^[21]

Jednou z možností je aj aplikácia nanočastíc na bunky *in vitro* a ich následná transplantácia do predurčeného organizmu, kde ich môžeme metódou magnetickej rezonancie pozorovať. Veľkou výhodou monitorovania buniek magnetickej rezonanciou je to, že poskytuje anatomické aj patologické informácie, pričom organizmus nezaťažuje ionizujúcim žiarením.^[22]

MRI je teda neinvazívna technika s nulovou radiačnou záťažou používaná v zdravotníctve na získanie obrazu rezov určitej oblasti tela, ktoré môžu slúžiť k vytvoreniu 3D obrazu požadovaného orgánu.^[22,23] Farebné odlíšenie jednotlivých tkanív je spôsobené ich rozdielnym chovaním pri pôsobení rovnakého vonkajšieho magnetického poľa na daný orgán zložený z veľkého počtu protónov.^[23,3]

Pacient je najskôr vystavený vysoko homogénnemu magnetickému poľu B_0 . Toto pole nasmeruje magnetické momenty protónov orgánu takmer súbežne v smere B_0 a tie začnú konať precesný pohyb s charakteristickou Larmorovou frekvenciou. Následne je vložené v smere kolmom na B_0 striedavé rádiovfrekvenčné magnetické pole. Po jeho vypnutí sa jadro z vyššej energetickej hladiny vráti späť do základného stavu a pritom emituje rovnako veľkú energiu (s rovnakou frekvenciou) ako absorbovalo. K zisteniu výsledku je meraná relaxačná koherézná odozva.^[24]

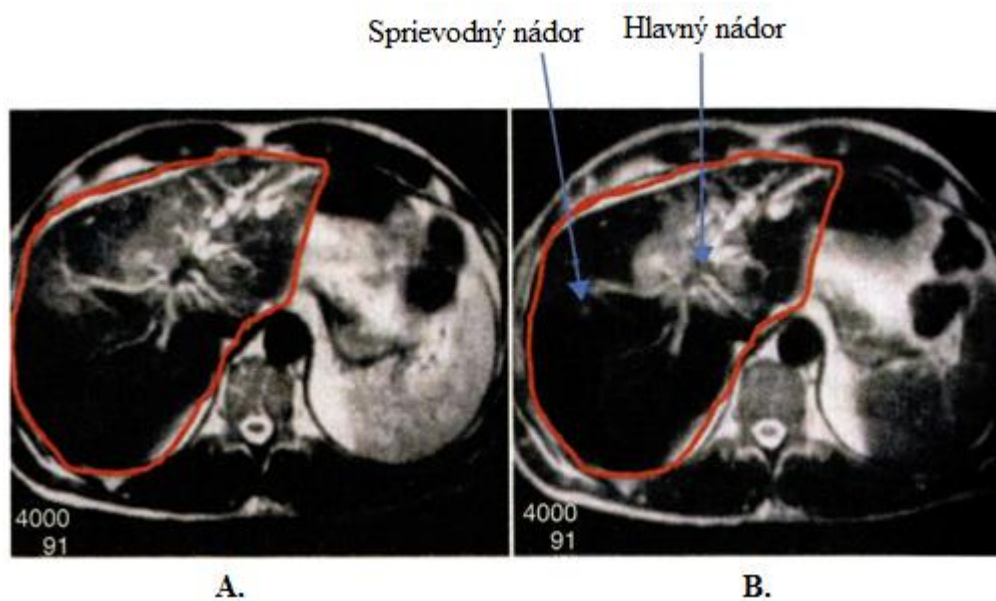
Relaxáciu rozdeľujeme na longitudiálnu (T_1) – relaxačný čas popisujúci stratu energie vo forme tepla a transverzálnu (T_2) – relaxačný čas ovplyvňovaný stratou fázovej koherencie v dôsledku vzájomných magnetických interakcií protónov s inými magnetickými momentmi okolitého tkaniva.^[25]

Úlohou kontrastných látok využívaných v MRI je skracovať T_1 lebo T_2 relaxačné časy a v dôsledku toho zintenzívňovať kontrast (vid' Obr.4)^[26]. Medzi kontrastné látky, ktoré skracujú čas T_1 patria v súčasnosti najviac používané

paramagnetické gadolíniové iónové komplexy. Látky na báze SPIO nanočastíc – predovšetkým $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a Fe_3O_4 skracujú časy T_2 .^[3,9]

Intenzita signálu po použití SPIO kontrastných látok závisí na veľkosti častíc, na ich chemickom a fázovom zložení, koncentrácii a na parametroch prístroja.^[26]

Spočiatku boli kontrastné látky na báze SPIO nanočastíc používané na zobrazovanie pečene, no v dnešnej dobe umožňujú napríklad aj zobrazovanie lymfatických uzlín, obličiek či čriev. Prvá SPIO kontrastná látka – Feridex (Endorem) bola uvedená na trh v roku 1996.^[22]



Obr.4: Zlepšenie kontrastu v MRI použitím SPIO nanočastíc

Červenou farbou je vyznačený nádor pečene.

Rozdiel medzi obrázkom A. a B. je v tom, že obrázok A. je výsledkom MRI bez aplikácie SPIO nanočastíc, zatiaľ čo obrázok B. znázorňuje výsledok magnetickej rezonancie s ich použitím.

Po aplikácii boli nanočastice rýchlo odobrané Kupfferovými bunkami, čím zdravé tkanivo stmavlo úmerne nádoru a hlavný nádor bol oveľa lepšie definovateľný.

Naviac bol pozorovateľný aj sprievodný nádor, ktorý na obrázku A. nebol viditeľný. Upravené podľa^[26]

2.3.2 Nosiče liečiv

Veľkou nevýhodou protinádorovej chemoterapie, čo je najviac využívaná forma terapie rakoviny súčasnosti, je to, že použité cytostatiká nie sú presne zacielené do nádorovej oblasti a zasahujú aj zdravé bunky. ^[27]

Ako už bolo uvedené v predchádzajúcich kapitolách, SPIO nanočastice sú biokompatibilné, netoxické a hlavne ovládateľné vonkajším magnetickým poľom. ^[7] Taktiež bolo zmienené, že obal (shell) častíc, používaných pre biotechnologické účely je možné chemicky modifikovať. ^[10] Jednou z možností modifikácie je upevnenie cytotoxickej látky na povrchovú vrstvu nanočastíc. Takto pripravený komplex je intravenózne zavedený do krvného riečiska a vonkajším magnetickým poľom transportovaný do miesta nádoru. Zmenou fyziologických podmienok alebo enzymatickej aktivity je následne liek na špecifickom mieste uvoľnený a odobraný nádorovou bunkou. ^[28] Prvé objavy magnetických nosičov boli v 70. rokoch 20. storočia. ^[18]

2.3.3 Hypertermia

Pojem hypertermia označuje nefyziologické stúpanie teploty za účelom štrukturálnych zmien alebo zničenia buniek. Zvýšenie teploty nad niekoľko stupňov oproti normálnej teplote ľudského tela (36-37°C) môže spôsobiť biochemické poruchy bunky, prípadne bunkovú smrť. ^[26]

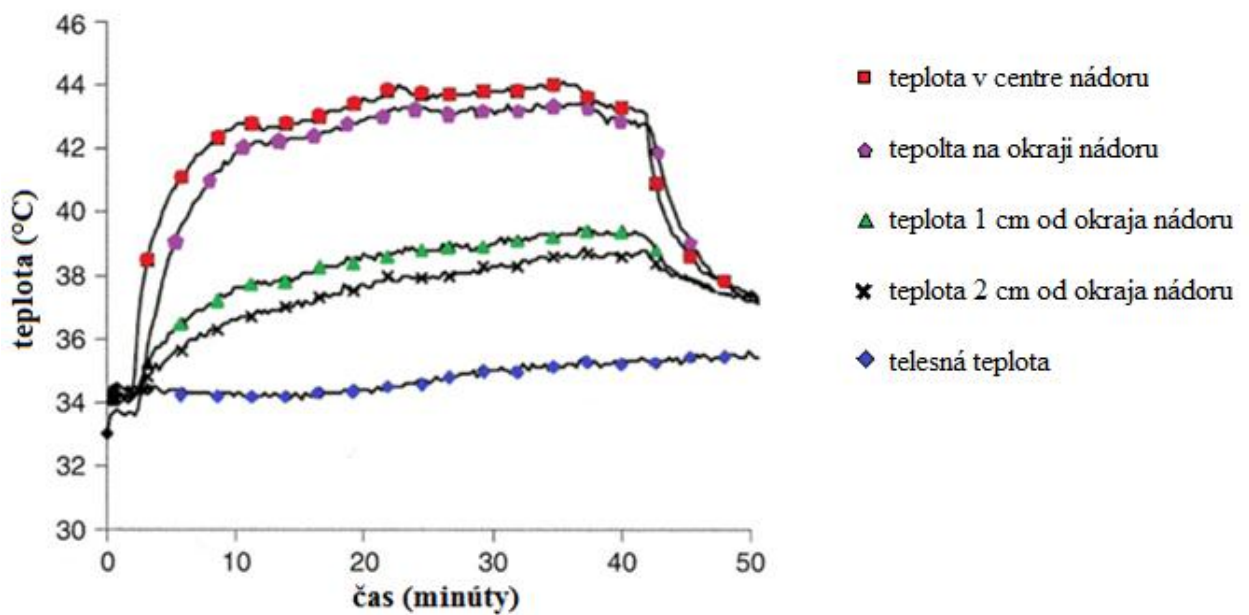
Rozoznávame dve formy bunkovej smrti – apoptózu a nekrózu. Zatiaľ čo apoptóza je pre bunku prirodzený proces a je nevyhnutná k udržiavaniu zdravia živého organizmu, nekróza označuje nesamovoľnú smrť bunky vplyvom vonkajších podmienok. Napríklad mechanickým pôsobením, chemickými či tepelnými zmenami. ^[29]

Nádorové bunky sú viac náchylnejšie na zvýšenú teplotu (42-45°C) ako zdravé. ^[26] Pri liečbe rakoviny pracuje na princípe ožarovania aj rádioterapia, avšak pod vplyvom ionizačného žiarenia sú poškodzované i zdravé bunky. ^[30]

Nový rozmer liečenia nádorových ochorení prinieslo využitie opticky alebo magneticky aktívnych nanočastíc, ktoré sú cielene vpravené do organizmu a zahrievané

zvonku tela žiarením vhodnej vlnovej dĺžky alebo oscilačným magnetickým poľom, čo nepoškodzuje zdravé tkanivá. [31]

Obr.5 popisuje experiment využitia hypertermie pri značení nádorových buniek pomocou magnetických nanočastíc aplikovaný na pečeň zajacov. Kým v nádore bola udržiavaná stabilná terapeutická teplota 43°C, 1-2 cm od nádorovej oblasti bola teplota okolo 38 °C, čiže okolité tkanivá neboli poškodzované. [26]



Obr.5: Graf znázorňuje údaje z hypertermickej liečby pečene králikov s využitím magnetických nanočastíc. Zachytáva teplotu tkaniva v závislosti od času s ohľadom na vzdialenosť od centra zahrievania. Upravené podľa [26].

Veľmi dôležitým aspektom tejto metódy je aj fakt, že tie isté magnetické nanočastice, ktoré boli použité na hypertermiu môžu byť využité aj ako kontrastné látky v MRI. [31]

2.3.4 Magnetické separácie

Magnetická separácia je metóda využívaná najmä v bunkovej biológii, mikrobiológii, lekárstve, molekulárnej biológii, biotechnológiách, biochémií a ekológii.^[32]

Podstatou tejto metódy je označenie biologickej oblasti magnetickými časticami a následná separácia takéhoto komplexu pomocou magnetického separátora.^[33]

Magnetická separácia môže byť pozitívna a negatívna. Pri pozitívnej separácii sú magneticky označené a izolované priamo žiadané bunky alebo zlúčeniny. V prípade negatívnej separácie sa zo systému odstraňujú nežiaduce komponenty a dochádza k zvýšeniu počtu žiaducich zložiek.

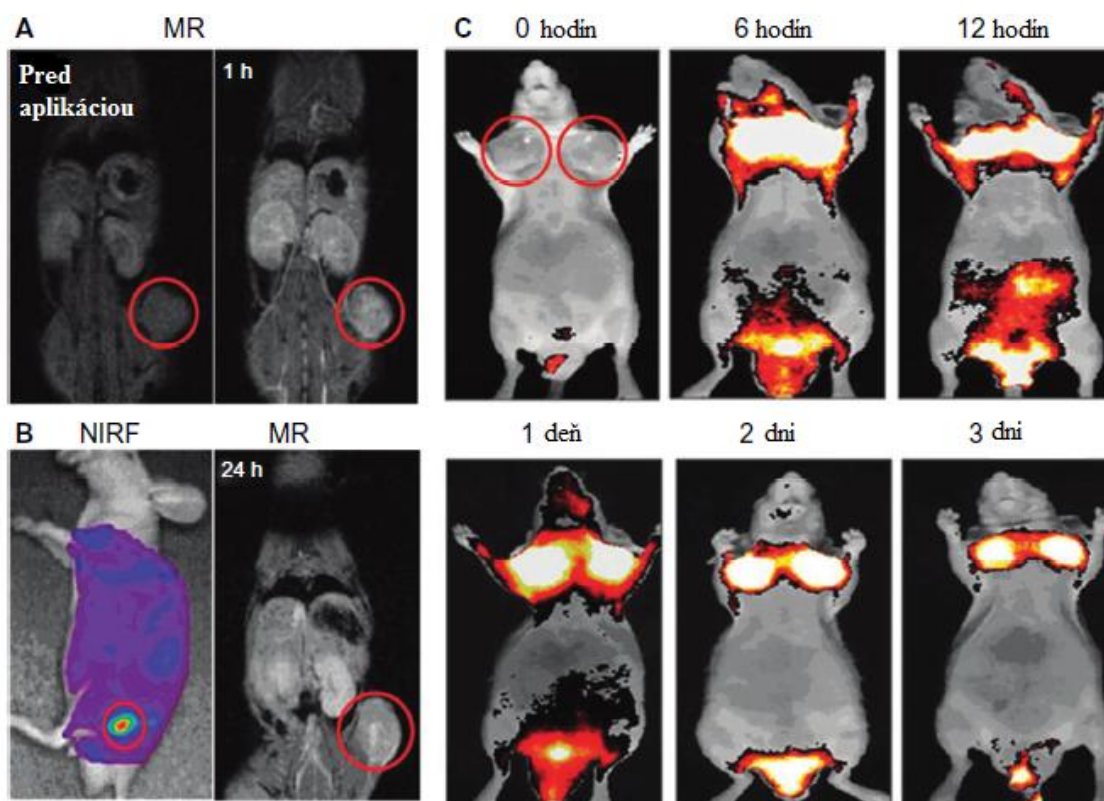
Použitím tejto metódy sa dá dosiahnuť urýchlenie alebo uľahčenie niektorých separačných metód. Najčastejšie používané látky na prípravu magnetických nosičov sú magnetit, maghemit, oxid chromičitý a ferity.^[32]

2.4 Konjugácia SPIO nanočastíc s fluorescenčnými značkami

Prvý, kto fluorescenciu spozoroval, bol anglický matematik a astronóm Sir John Frederic Herschel. Bolo to pravdepodobne okolo roku 1825, keď si všimol modré svetlo emitované z roztoku chinínu.^[34]

Za posledných 25 rokov došlo k pozoruhodnému nárastu využívania fluorescencie pre biotechnologické účely, diagnostiku v medicíne, sekvenčné spracovanie DNA, genetické analýzy a mnohé iné.^[35]

Zobrazovanie optickými fluorescenčnými metódami je citlivejšie ako využívanie metódy MRI. Nevýhodou optických metód je ale hĺbka preniknutia do tkaniva, ktorá je limitovaná na centimetre kvôli refrakčným a absorpčným vlastnostiam svetla v živých organizmoch. Na druhej strane, využitím MRI môžeme pozorovať tkanivá v neobmedzenej hĺbke a práve preto je výhodnejšie využiť kombináciu molekulových zobrazovacích techník (vid' Obr. 6). Aj Jennings a Long vo svojom článku „*Two is better than one-probes for dual-modality molecular imaging*“ vyzdvihujú dôležitosť použitia dvojitého molekulového zobrazovania pre dnešné klinické aplikácie.^[36]



Obr.6 (A-C): Myši postihnutej nádorom boli aplikované gadolíniové nanočastice obalené chytozánom, na ktoré bol naviazaný kyanín5.5 (Cy5.5-chitosan nanoparticle-Gd(III)) ako kontrastná látka pre optické zobrazovanie. Následne bola myš pozorovaná využitím MR-NIRF systému. Červenými krúžkami sú označené miesta nádoru.

Obrázok A: výsledok in vivo MRI pred aplikáciou kontrastnej látky (vľavo) a výsledok po jednej hodine od jej aplikácie (vpravo).

Obrázok B: in vivo NIRF zobrazenie zachytáva jasnejšie intenzitu v oblasti nádoru (vľavo) a obraz magnetickej rezonancie po 24 hodinách od aplikácie je číry (vpravo).

Obrázok C: in vivo NIRF zobrazenie akumulácie nanočasticového komplexu na miestach tumoru v priebehu troch dní. Upravené podľa ^[37].

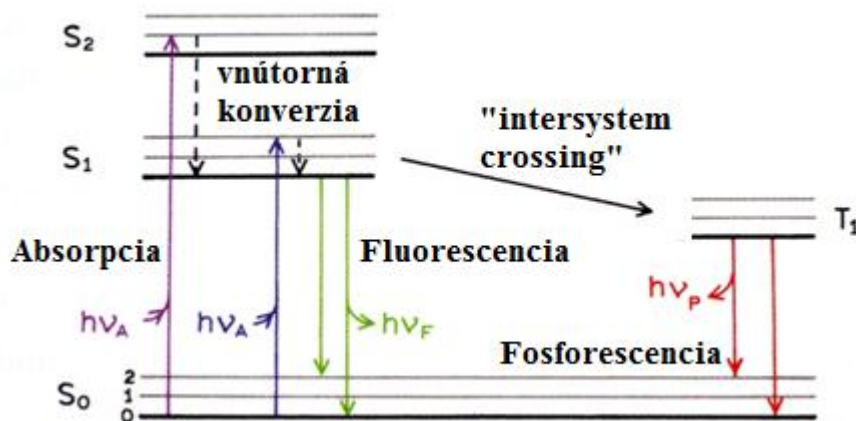
Autori J. Key a J.F. Leary poukazujú aj na možnosť využitia SPIO nanočastíc ako kontrastných látok pre duálne zobrazenie prostredníctvom MR-NIRF.

2.4.1 Fluorescencia

Fluorescencia je spolu s fosforescenciou druhom luminiscencie, konkrétne fotoluminiscencie. Fotoluminiscencia je jav, pri ktorom žiarenie s kratšou vlnovou dĺžkou vyvolá v látke vznik žiarenia s dlhšou vlnovou dĺžkou. Základný rozdiel medzi fluorescenciou a fosforescenciou spočíva v rýchlosti emisie a „lifetime“ (τ), čo je priemerný čas medzi excitáciou a navrátením fluoroforu do základného stavu. Zatiaľ čo pre fluorescenciu je typická rýchlosť emisie poväčšine 10^8 s^{-1} a charakteristický „lifetime“ je asi 10 ns, pre fosforescenciu je typická pomalšia rýchlosť emisie – 10^3 až 10^0 s^{-1} a „lifetime“ zodpovedá rádovo milisekundám až sekundám. Práve vďaka dlhším „lifetimom“ je možné pozorovanie fosforescencie v tme. Pretože časové rozmedzie fluorescencie je veľmi malé, musia byť na meranie použité sofistikované techniky. ^[38]

Fluorescencia je vlastne sekundárne žiarenie vznikajúce vyžiarením energie atómom, ktorý energiu pohltí, čiže sa jedná o prechod zo stavu S_1 do stavu S_0 . Látky schopné tohto prechodu spojeného s vyžiarením svetla nazývame fluorofory. ^[39]

Proces, ktorý nastáva medzi absorpciou a emisiou svetla popisuje Jablonského diagram (viď. Obr.7), pomenovaný podľa zakladateľa fluorescencnej spektroskopie Profesora Alexandra Jablonského. ^[38]



Obr.7: Schéma znázorňuje Jablonského diagram ktorý zobrazuje energetické prechody pri vzniku fluorescencie a fosforescencie. Upravené podľa ^[38].

Singletový, prvý a druhý elektrónový stav sú označené ako S_0 , S_1 a S_2 . Na všetkých týchto energetických úrovniach môžu fluorofory existovať na vibračných hladinách, ktoré sú označené ako 0, 1, 2 atď.

Keď látka absorbuje svetlo nastáva niekoľko procesov. Fluorofor je zvyčajne excitovaný na niektorý z vibračných stavov – buď S_1 alebo S_2 . Molekuly v kondenzovanej fáze rýchlo relaxujú na nižšiu vibračnú hladinu S_1 . Tento proces je nazývaný vnútorná konverzia a trvá asi 10^{-12} . Keďže je to menej ako je fluorescenčný lifetime, proces vnútornej konverzie je spravidla dokončený pred emisiou. Preto emisia fluorescence väčšinou nastáva z tepelne rovnovážneho excitovaného stavu - čiže z najnižšej energetickej vibračnej hladiny S_1 .

Vyžiarenie prostredníctvom fluorescence emisie väčšinou nastáva v časovom rozmedzí 0,1 – 100 ns. Excitované molekuly môžu však aj relaxovať prostredníctvom vnútrosystémovému prechodu (intersystem crossing) na najnižší tripletový stav T_1 . Návrat do základného stavu prostredníctvom fosforescencie je oveľa pomalší – 10^{-6} - 1s. Absorpcia najdlhších vlnových dĺžok zodpovedá excitácii z najnižších vibračných stavov v S_0 na najnižšiu vibračnú hladinu v S_1 . Rozdiel v polohe píku vlnovej dĺžky absorpcie a emisie je nazývaný *Stokesov posun*.^[38]

2.4.2 Základné vlastnosti fluorescenčných značiek

Pri vyberaní fluoroforu vhodného pre fluorescenčné zobrazovanie máme na výber z viacerých možností (viď. Tabuľka 1). Môžu to byť napríklad malé organické farbivá, nanočastice, ktorých fyzikálno-chemické vlastnosti sú ovplyvnené ich veľkosťou, nanočastice zlata alebo geneticky kódované fluorescenčné proteíny. Musíme však zohľadniť ich veľkosť, chemickú podstatu, biokompatibilitu, optické vlastnosti a vzájomné pôsobenie farbiva a biologickej jednotky.^[40]

Trieda	Príklad	Jas	Foto-stabilita	Bio-kompatibilita	Citivosť k životnému prostrediu
AlexaFluor	AlexaFluor 488	xxxx	xxxx	xxxx	xx
Atto	Atto 488	xxxx	xxxxx	xxxx	xx
BODIPY	BODIPY TMR	xxx	xx	xxxx	xxx
Kumarín	Kumarín 6	x	x	xxx	xxxx
Kyaníny	Cy5, Cy7	xxx	xxxx	xxx	xx
Fluoresceín	FITC	xxx	x	xxx	xxxx
Rodamíny	Rodamín 6G	xxx	xxxx	xx	xxx
Kvantové bodky		xxxxx	xxxxx	x	x
GFP proteíny	EGFP, EosFP	xx	xx	xxxxx	xx

Tabuľka 1: V tabuľke sú porovnané vlastnosti jednotlivých fluorescenčných značiek používaných pre fluorescenčné zobrazovanie (x- najmenej, xxxxx- najviac). Upravené podľa ^[40]

Vo všeobecnosti platí, že používané značky by mali byť dostatočne (foto)stabilné a ľahko excitovateľné dostupnými zdrojmi svetla, pričom nesmú byť ovplyvňované fluorescenčným pozadím biologickej matrice. Taktiež by mali vykazovať dostatočný jas, aby sme mohli ich vlastnosti pozorovať bežnými inštrumentálnymi technikami. Na využitie pre biologické aplikácie je nutná ich rozpustnosť v bunkovom prostredí. V závislosti na type aplikácie sú zohľadňované aj nasledujúce faktory – závislosť emisných vlastností na pH, možnosti, ako dopraviť fluorescenčnú značku do bunky, jej toxicita a vhodnosť značky. ^[40,41]

2.4.3 Molekulové zobrazovanie a optical imaging

V dnešnej dobe je vo výskume pre in vivo zobrazovanie dostupných niekoľko zobrazovacích techník, napríklad nukleárne zobrazovanie (PET, SPECT), optické zobrazovanie (fluorescencia a bioluminiscencia), zobrazovanie ultrazvukom či magnetickou rezonanciou. ^[41]

Každá z týchto metód má svoje výhody aj nevýhody (viď Tabuľka 2). V prípade PET ide o zlé priestorové rozlíšenie, metóda MRI vykazuje síce dobré anatomické rozlíšenie, ale má malú citlivosť. ^[37]

Spomedzi týchto metód sa v biomedicínskom výskume najviac používa optické zobrazovanie (optical imaging) hlavne kvôli nízkej cene, dobrej dostupnosti či vysokej citlivosti prístrojov. Optické zobrazovacie metódy majú aj svoje nevýhody. Napríklad pri zobrazovaní in vivo je nevýhodou nízka schopnosť získať kvantitatívne údaje či zlé priestorové rozlíšenie.

Pojem optical imaging zahŕňa fluorescenčné a bioluminiscenčné in vivo zobrazovanie. Tieto typy zobrazovacích metód majú široké využitie pri vizualizácii v biomedicínskom výskume, najmä pri molekulovom zobrazovaní. ^[41,37]

Fluorescenčné zobrazovanie môže byť vykonávané pri rôznom rozlíšení a pri rôznej hĺbke preniknutia (od mikrometrov po centimetre). Jeho podstatou je excitácia atómov organických farbív alebo fluorescenčných proteínov pomocou externých svetelných zdrojov, čo vedie k emisii svetla s určitou vlnovou dĺžkou. ^[41, 40]

Prvý, kto využili značenie biologických vzoriek farbou boli Camillo Golgi (taliansky lekár) a Santiago Ramon y Cajal (španielsky patológ). ^[40]

Fluorescenčná mikroskopia patrí do skupiny optických metód a priniesla nový rozmer chemicko-biologickým vedám. Predovšetkým je nevyhnutná pre bunecnú biológiu. ^[40,42]

Fluorescencia je najpopulárnejšou kontrastnou technikou súčasnosti. Využíva fluorofory alebo fluorochromy, čo sú látky absorbujúce žiarenie určitého rozsahu vlnových dĺžok, ktoré spätne emitujú s nižšou energiou. To spôsobí posun k dlhším vlnovým dĺžkam, čo sa prejaví vyžiaréním svetla inej farby. Medzi základné výhody využitia fluorescencie pre zobrazovanie (tkanív, buniek atď.) patrí veľmi vysoká citlivosť, selektivita, špecifickosť a vysoký kontrast, ktorý poskytujú fluorescenčné farbivá. ^[50]

Metóda	Zdroj	Typické "sondy"	Rozlíšenie	Hĺbka	Citlivosť	Čas	Informácie	Cena (US\$)	Klinické využitie
MRI	rádiové vlny	paramagnetické (Gd ³⁺⁺), superparamagnetické (Fe ₃ O ₄)	10-100 μm	Bez limitu	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁶	minúty až hodiny	anatomické, fyziologické, molekulárne	> \$300,000	Áno
CT	röntgenové lúče	zlato, síran brnatý	50-200 μm	Bez limitu	10 ⁻⁶	minúty	anatomické, fyziologické	\$100,000–\$300,000	Áno
PET	γ-lúče	rádioizotopy (napr. ¹⁸ F, ¹¹ C, ¹³ N, ¹⁵ O, ⁶⁴ Cu, ¹²⁴ I)	1-2 mm	Bez limitu	10 ⁻¹⁵	minúty až hodiny	fyziologické, molekulárne	> \$300,000	Áno
Optické zobrazovanie	svetlo	QDs, NIRF farbivá	> 0,3 μm	< 10 cm	10 ⁻¹²	subsekundy až minúty	fyziologické, molekulárne	\$100,000–\$300,000	Vo výskume

Tabuľka 2: Porovnanie rozličných zobrazovacích metód. Upravené podľa ^[37]

3 CIELE PRÁCE

Cieľom práce bolo v teoretickom úvode pomocou citovaných materiálov a zdrojov popísať základné znaky nanočastíc, predovšetkým magnetitu a maghemitu. Tieto dva typy superparamagnetických nanočastíc sú často používané v medicíne, preto bolo ďalším z cieľov zhrnúť ich konkrétne aplikácie a poukázať na vhodnosť ich konjugácie s fluorescenčnými látkami.

Prioritou praktickej časti bolo pripraviť bimodálnu fluorescenčnú kontrastnú látku (magnetit + fluoresceín) a pomocou dostupných laboratórnych metód charakterizovať jej fyzikálno-chemické vlastnosti a aplikovať vzorku na bunky.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité experimentálne metódy na určenie fyzikálno – chemických vlastností nanočastíc

Pre vyhodnotenie vlastností nanočastíc pred a po konjugácii s fluorescenčnou značkou bola použitá rada špeciálnych techník určených k charakterizácii nanomateriálov a obzvlášť ich povrchových a v našom prípade i optických vlastností.

4.1.1 Transmisná elektrónová mikroskopia (TEM)

Transmisná elektrónová mikroskopia je využívaná na určovanie veľkosti častíc a na pozorovanie ich tvaru. Pri TEM oproti SEM elektrónový zväzok na vzorku nie len dopadá, ale ňou i prechádza. ^[43]

Základné časti transmisného elektrónového mikroskopu sú kondenzor, objektív a projektív. Kondenzor fokusuje elektrónové lúče na vzorku a zabezpečuje jej intenzívne a homogénne ožiarenie. Objektív je tvorený jednou elektromagnetickou šošovkou a slúži k tvorbe obrazu. Na premietnutie obrazu na tienidlo je využívaný projektív, tvorený štyrmi elektromagnetickými šošovkami. Týmto mikroskopom môžeme dosiahnuť maximálne užitočné zväčšenie 10^6 . Aby elektróny vzorkou prechádzali, musí byť vzorka dostatočne tenká – jej optimálna hrúbka je 10 – 200 nm. Taktiež je pred meraním dôležité, aby vzorka dostatočne vyschla a bola tak zbavená vody. ^[44] Na mikroskopovanie bol použitý transmisný elektrónový mikroskop JEM2010 (pri 200kV).

4.1.2 Dynamický rozptyl svetla (DLS)

Táto metóda stanovenia veľkosti častíc inak nazývaná aj fotónová korelačná spektroskopia (PCS) alebo kvazielastický rozptyl svetla (QELS) je vhodná najmä pre suspenzné roztoky, ktorých veľkosť častíc sa pohybuje v submikrórovej oblasti. ^[45]

Pre molekuly v roztoku je charakteristický Brownov pohyb, ktorý je ovplyvňovaný teplotou, viskozitou rozpúšťadla a veľkosťou častíc. Vzhľadom

k meraniu DLS je dôležitý fakt, že malé častice sa v roztoku pohybujú rýchlejšie ako veľké. Závislosť rýchlosti pohybu častice od jej veľkosti popisuje Stokes – Einsteinova rovnica (viď Schéma 1).^[46]

$$D = k.T / 6. \eta . \pi . a , \text{ kde}$$

D = koeficient – funkcia rozmeru častice

k = Boltzmanova konštanta

T = termodynamická teplota

η = koeficient viskozity [$\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$]

π = Ludolfovo číslo

a = polomer častice

Schéma 1: Stokes- Einsteinova rovnica^[47]

Princíp metódy spočíva v sledovaní zmeny intenzity rozptýleného svetla časticami v závislosti od času. Najskôr je prístrojom určený difúzny koeficient častíc. Jeho hodnota závisí na veľkosti častíc, viskozite kvapaliny a na jej teplote. Ak tieto veličiny poznáme, veľkosť častíc vieme zo Stokes – Einsteinovej rovnice vypočítať.^[48]

4.1.3 Zeta potenciál (ζ)

V roztoku elektrolytu sa okolo povrchu pevnej častice vytvára elektrická dvojvrstva. Tento jav je popísaný rôznymi modelmi - napríklad Sternovým alebo Helmholtzovým modelom.

Sternov model opisuje, že v roztoku sa tesne pri povrchu pevnej častice nachádza vrstva opačne nabitých častíc, ktoré sa pohybujú rovnakou rýchlosťou ako koloidná častica. Táto vrstva sa nazýva Sternova vrstva. Vo väčšej vzdialenosti ako je Sternova vrstva sa nachádza difúzna vrstva a ióny, ktoré sú jej súčasťou sa pohybujú nezávisle na pohybe pevnej častice. Zeta potenciál, inak nazývaný aj elektrokinetický potenciál, je potenciál existujúci na hranici medzi Sternovou a difúznou vrstvou.^[49]

Zeta potenciál bol meraný prístrojom Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Rovnakým prístrojom bola meraná aj veľkosť častíc pre DLS.

4.1.4 Fluorescenčná mikroskopia

Aby boli objekty pozorovateľné pod fluorescenčným mikroskopom, musí dôjsť k excitácii, následne k separácii emisie a nakoniec k detekcii fluorescencie. Pre získanie vysokého kontrastu obrazu je nutná účinná separácia excitácie z fluorescenčného svetla. ^[40,41]

Excitáciu fluorescencie zabezpečuje svetlo emitované z ortuťovej lampy. Svetlo sa odráža smerom k pozorovanej vzorke pomocou dichroického zrkadla, ktoré je vzhľadom k vysielanému lúču v 45° uhle a odráža fotóny vybranej vlnovej dĺžky, (ale umožňuje aj prechod svetla dlhších vlnových dĺžok). Dvojfarebné zrkadlo je nastaviteľné podľa typu aplikácie tak, aby odrazilo vhodnú vlnovú dĺžku na základe očakávanej fluorescencie. Fluorescencia je emitovaná vzorkou všetkými smermi, ale len vhodne zvolená svetelná škála je zhromažďovaná objektívom. V dôsledku toho je fluorescencia slabá v porovnaní s excitovaným svetlom a musí byť efektívne separovaná a detekovaná. ^[40]

Na mikroskopovanie bol použitý svetelný mikroskop s fluorescenčným módom Olympus IX 70, obsahujúci objektívy modifikované pre fázový kontrast so zväčšením 10 a 40 a objektív modifikovaný pre fázový kontrast aj flourescenčný mód so zväčšením 20. Snímky boli zachytené kamerou Olympus DP72.

4.1.5 Spektrofluorimetria

Spektrofluorimetria patrí do skupiny luminiscenčných analytických metód. Budiacim zdrojom v spektrofluorimetroch je žiarenie vo viditeľnej alebo ultrafialovej oblasti svetla, obvykle je využívaný pulzný laser. Ako excitačné aj emisné monochromátory sú využívané optické mriežky. Žiarenie z budiaceho zdroja prejde cez monochromátor a dopadne na kyvetu so vzorkou. ^[51]

Pomocou monochromatického žiarenia je látka excitovaná, čiže elektrón

z poslednej vrstvy je vybudený na vyššiu energetickú úroveň. Návrat elektrónu do základného stavu je doprevádzaný vyžiarovaním energie vo forme fotónu a emitované svetlo má väčšiu vlnovú dĺžku ako excitačné. Emitované fluorescenčné žiarenie sa meria v smere kolmom na lúč budiaceho zdroja a je detekované pomocou fotonásobiča. [38]

Na rozdiel od fotometrických metód má táto metóda vyššiu citlivosť a špecifickosť. Negatívom je to, že fluorescenčné činidlá sú veľmi citlivé na zmenu pH, zmenu polarizácie či iónovej sily a na prítomnosť oxidačných činidiel (tzv. zhášačov). [51]

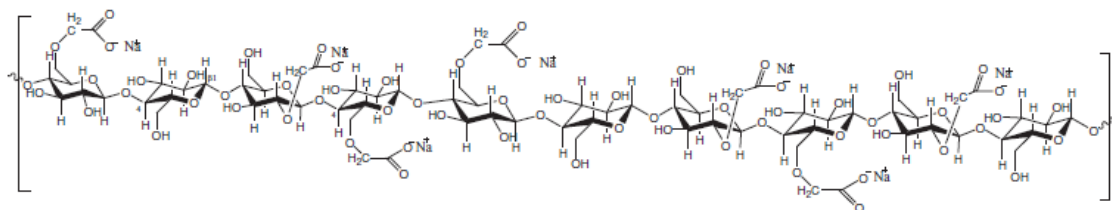
Fluorescenčné spektrá boli merané spektrofluorimetrom QuantaMaster 40 (Photon Technology International, U.S.A), ktorý ako zdroj žiarenia využíva xenónovú lampu, monochromátory Czernyho – Turnerovho typu a detektorom je fotonásobič.

4.2 Používané SPIO častice

Superparamagnetické nanočastice, ktoré sme použili na naviazanie fluorescenčnej látky boli poskytnuté PhDr. Zdenkou Medříkovou a boli pripravené nasledovným spôsobom.

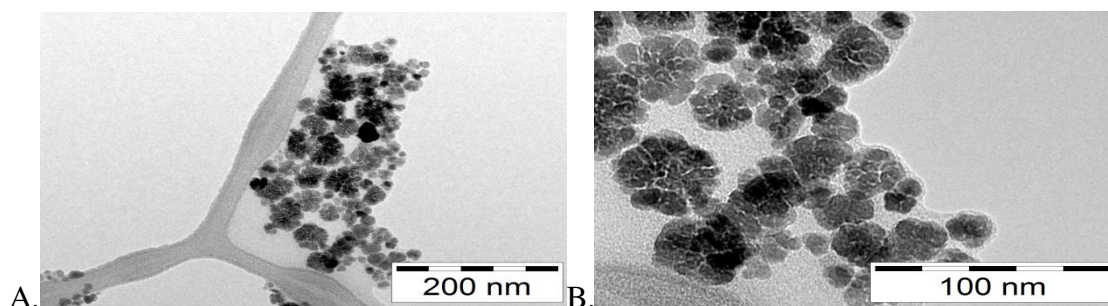
4.2.1 Príprava a charakterizácia častíc

Magnetické nanočastice magnetitu stabilizované CMC(karboxymetylcelulózou) boli pripravené podľa modifikovaného protokolu autora Bakandritsos et al. pani doktorkou Zdenkou Medříkovou (RCPTM UP). Jednalo sa o precipitáciu železoobsahujúceho prekursoru ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) v roztoku CMC (viď Obr.8), pomocou NH_4OH za zvýšenej teploty (323 K). Po procese miešania, centrifugácie a sonifikácie bol finálny magnetický koloid uskladnený pri 4 °C. [52]

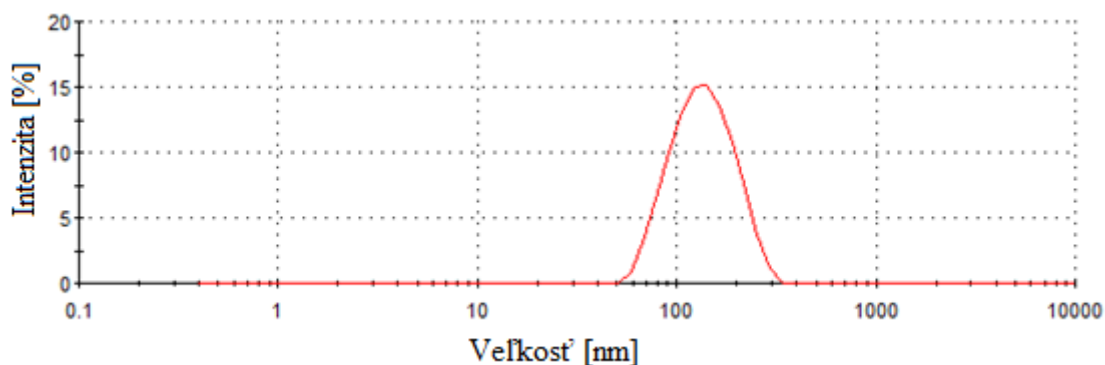


Obr.8: Vzorec karboxymetylcelulózy, ktorou boli obalené magnetitové nanočastice. [52]

Veľkosť a morfológia pripravených nanočastíc bola stanovená zo snímky z TEM (viď Obr.9) a pomocou DLS (viď Obr.10). Je vidieť, že jednotlivé nanočastice majú veľkosť cca 30 nm, držia pevne pri sebe a vytvárajú tzv. superklastry o veľkosti cca 120 nm vďaka prítomnosti stabilizujúceho polyméru CMC. Časť karboxylových skupín interaguje s Fe iónmi na povrchu nanočastíc, čím sa docieli adsorpcia vrstvy polysacharidu (viditeľné zo snímky z TEM). Táto adsorpcia bola potvrdená tiež pomocou FT-IR spektroskopie (dáta nie sú uvedené). Dôležitým výsledkom z FT-IR bolo tiež stanovenie prítomnosti voľných karboxylových skupín vyčnievajúcich do rozpúšťadla, a teda voľne prístupných pre ďalšie konjugácie. ^[52]

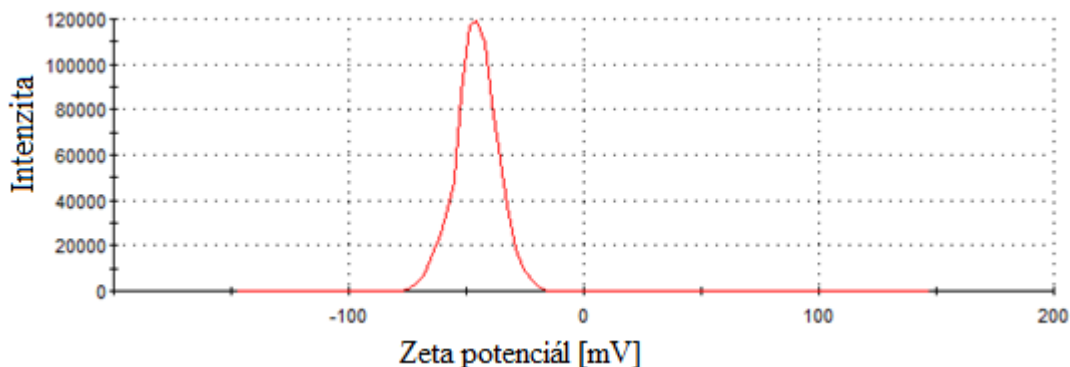


Obr. 9 A, 9 B : Snímky z TEM. Na obrázku B. je detailnejšie vidieť obal karboxymetylcelulózy, ktorou boli častice obalené.



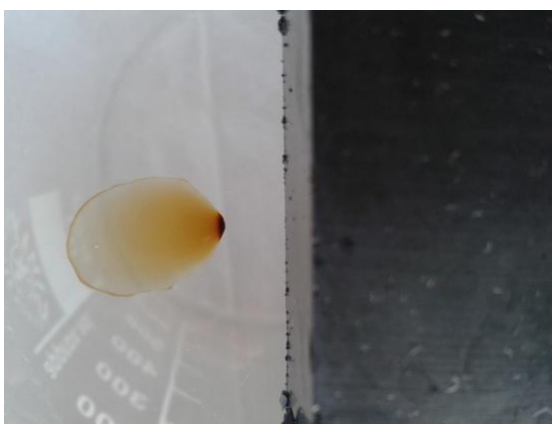
Obr.10: Graf DLS zobrazujúci veľkosť zhluku častíc, ktorá bola touto metódou určená na 119,2 nm.

Zeta potenciál $-45,6$ mV (vid' Obr.11) meraný pri pH 7,75 potvrdzuje stabilitu častíc vo vodnom prostredí, a teda koloidné chovanie bezpodmienečne nutné pre prípadne využitie častíc v medicíne.

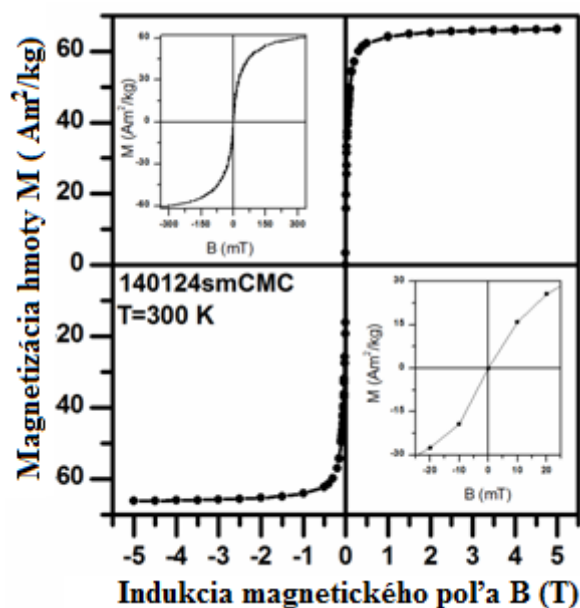


Obr.11: Graf zobrazujúci hodnotu zeta potenciálu

Magnetické vlastnosti (vid' Obr.12) pripravených nanočastíc boli analyzované pomocou Mössbauerovej spektroskopie a metódy SQUID. Bolo stanovené, že vzorka obsahuje nestechiometrický magnetit a pri izbovej teplote je hodnota saturačnej magnetizácie materiálu $68,4$ Am²/kg (vid' Obr.13). Dôležitý je tiež priebeh krivky magnetizácie. Je vidieť, že pri izbovej teplote sa v materiáli neindukujú hysterézne straty, tzn. že nie je patrná hysterézna slučka. Z toho môžeme usudzovať superparamagnetické chovanie pripravených nanočastíc. Takéto nanočastice môžu byť tiež použité na účely MRI ako tzv. negatívne kontrastné látky.



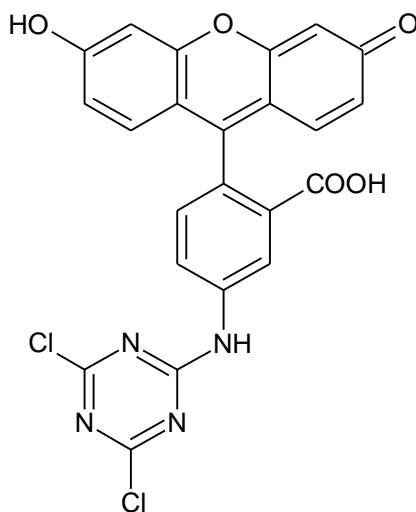
Obr. 12: Na obrázku je znázornená separácia magnetických nanočastíc z koloidného roztoku pomocou permanentného magnetu



Obr.13: Graf popisujúci magnetické vlastnosti nanočastíc obalených CMC

4.3 Fluoresceín

Ako fluorescenčné farbivo, ktoré sme imobilizovali na povrch bioaktívnej zložky SPIO nanočastíc, bol zvolený fluoresceín, konkrétne 5-DTAF (5-(4,6-Dichlorotriazinyl) Aminofluoresceín) (vid' Obr.14) zakúpený vo firme Sigma Aldrich.



Obr.14: Vzorec používaného fluoresceínu ^[53]

Tento druh fluoresceínu predstavuje reaktívne farbivo s absorpčným/emisným maximom ~ 492/516 nm. Na rozdiel od ostatných typov fluoresceínov, 5 - DTAF nereaguje len s amino skupinami, ale aj s tiolovými a alkoholovými skupinami. ^[53]

Ľahko reaguje napríklad s proteínmi, polysacharidmi alebo vodnými roztokmi alkoholov pri pH väčšom ako 9 a pri absencii iných nukleofilov. ^[54] Rozpustný je v organických rozpúšťadlách – napríklad v DMF alebo DMSO. ^[55]

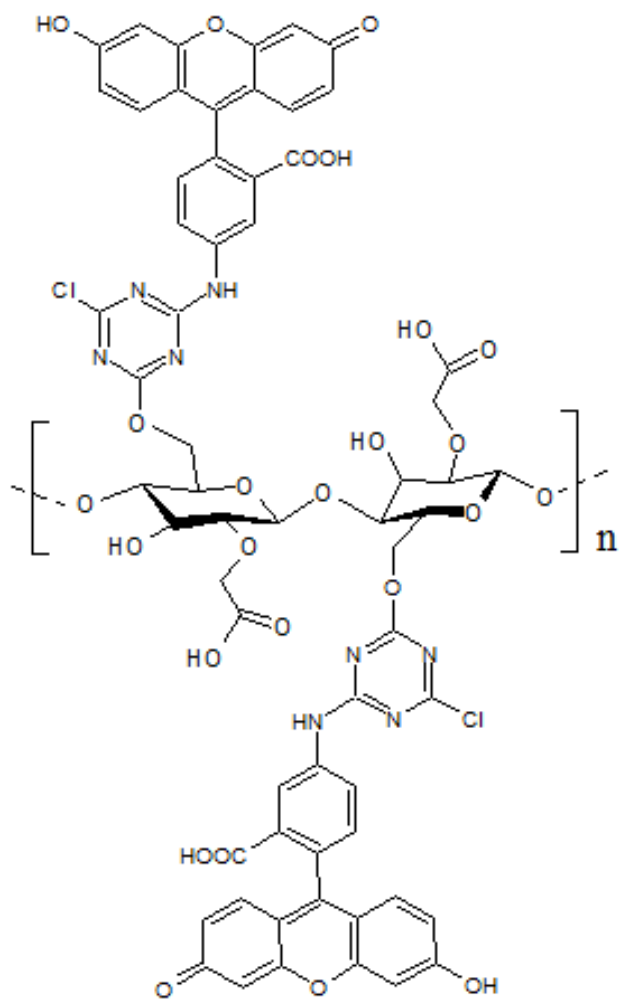
4.4 Naviazanie fluoresceínu na SPIO nanočastice

Zásobný roztok magnetitových nanočastíc s počiatočnou koncentráciou 3,5 mg/ml bol nariadený na koncentráciu 1mg/ml NaOH pufrom o pH10 do výsledného objemu 5 ml, čiže bolo zmiešaných 1,43 ml zásobného roztoku častíc a 3,57 ml pufru.

Na rovnakú koncentráciu bol nariadený aj fluoresceín v DMSO – 10,1 mg fluoresceínu bolo zriedených s 10,1 ml DMSO.

Roztok častíc s koncentráciou 1 mg/ml bol s fluoresceínom zmiešaný v pomere 50:1 (1,96 ml roztoku častíc a 0,04 ml fluoresceínu) a 500:1(1,996 ml roztoku častíc a 0,004 ml fluoresceínu) a cez noc (24hodín) sa nechali inkubovať v chladničke. Na druhý deň bolo odobraných 0,6 ml roztoku a toto množstvo sa centrifugovalo 45 min pri 15 000 g.

Po centrifugácii nasledovalo premývanie častíc, aby boli odstránené všetky zvyšky nenaviazaného fluoresceínu. Supernatant bol odobraný, sediment častíc sa opatrne doplnil 100 µl pufru a roztok sa opätovne centrifugoval pri 15 000 g 5 minút. Tento proces bol opakovaný 3x a ako výsledok sme dostali premytý sediment magnetitových nanočastíc a supernatant s nenaviazaným fluoresceínom.

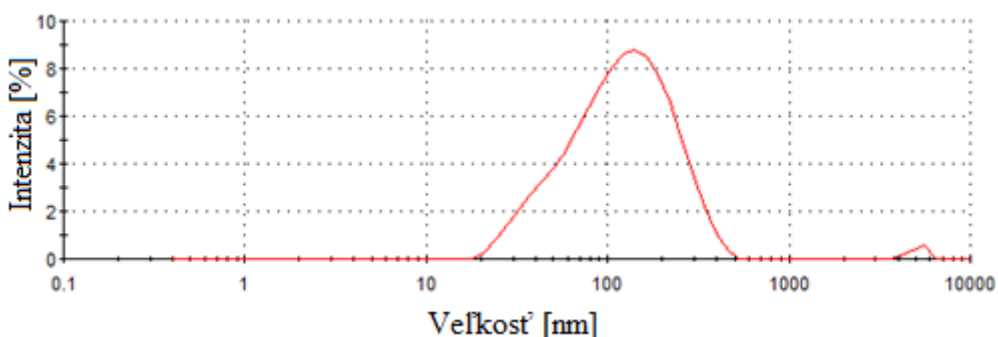


Obr.15: Vzorec fluoresceínu naviazaného na karboxymetylcelulóze

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Meranie DLS po naviazaní fluoresceínu

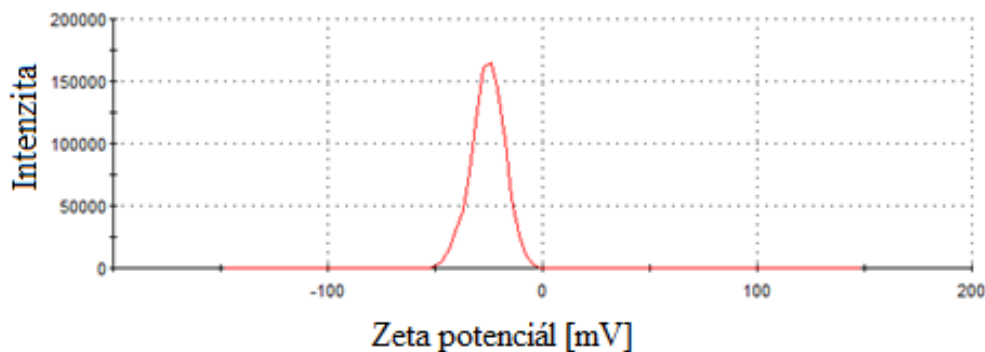
Využitím metódy DLS (viď Obr.16) sme stanovili priemerom z troch meraní, že veľkosť častíc po naviazaní fluoresceínu (v pomere 50:1) klesla z 119,2 nm na 100,8 nm. Pred naviazaním fluoresceínu boli častice obalené sodnou soľou karboxymetylcelulózy a molekula fluoresceínu sa na obal častice naviazala na miestach, kde bol sodík, ktorý sa vyviazal, čo pravdepodobne spôsobilo pokles veľkosti.



Obr.16: Výsledok DLS po naviazaní fluoresceínu

5.2 Meranie Zeta potenciálu po naviazaní fluoresceínu

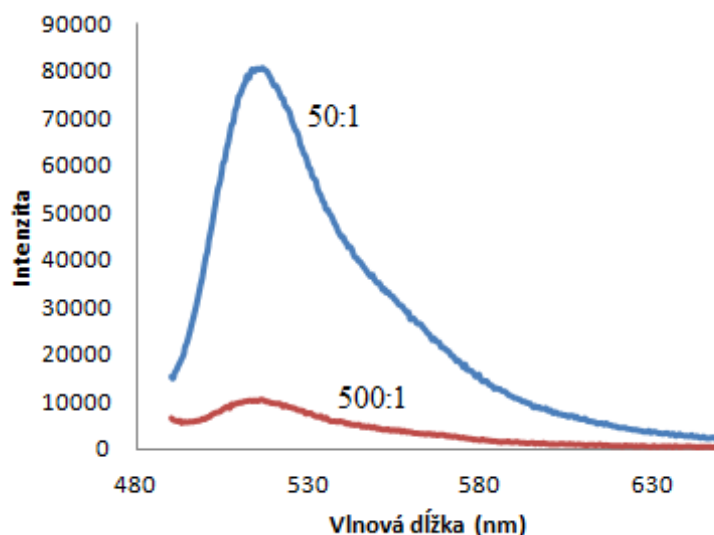
Hodnota zeta potenciálu bola meraná aj po naviazaní fluoresceínu (v pomere 50:1) a bola stanovená priemerom z troch meraní na -25,5 mV (viď Obr.17). Došlo teda k miernej destabilizácii častíc, z pôvodnej hodnoty -45,6 mV. Aj napriek tomu sa vzorka chovala stabilne vo vodnom aj bunkovom médiu. Zeta potenciál je veličina závisiaca hlavne od hodnoty pH. Táto hodnota poklesla z pôvodnej (pH=7,75) na 6,3, čo spôsobilo aj zvýšenie zeta potenciálu.



Obr.17: Výsledok Zeta potenciálu po naviazaní fluoresceínu

5.3 Fluorescenčná spektroskopia

Sedimenty premytých častíc s naviazaným fluoresceínom v pomere 500:1 a 50:1 boli aplikované do kremenej kvety s hrúbkou 1 cm. Meranie prebiehalo pri laboratórnej teplote pod uhlom 90°. Na Obr.18 je vidieť fluorescenčné (emisné) spektrum oboch pripravených vzoriek. Fluorescenčné maximum je patrné v oboch prípadoch, a to pri vlnovej dĺžke 516-519 nm typické pre FITC či DTAF. Intenzita fluorescenčného maxima je vyššia pri vzorke s pomerom častíc a fluoresceínu 50:1, môžeme teda usudzovať, že pri vyššom pomere fluoresceínu v reakcii sa ho naviaže na povrch nanočastíc väčšie množstvo. Kvantifikovať fluoresceín nie je triviálne, pretože pri väzbe sa môžu prejavovať javy zhášania, kedy pri vyššej koncentrácii fluoresceínu sa absorbný a emisný pás látky prekrývajú a látka absorbuje svoju vlastnú fluorescenciu. V našom prípade k zhášaniu fluorescencie u vzorky s pomerom častíc a fluoresceínu 50:1 nenastalo, a pretože bola jeho intenzita väčšia ako u vzorky 500:1, použili sme túto vzorku na značenie kmeňových buniek.



Obr.18: Graf zobrazuje závislosť intenzity fluorescence od vlnovej dĺžky. Modrá krivka znázorňuje intenzitu fluorescence vzorky, v ktorej bol pomer roztoku častíc a fluoresceínu 50:1 a hnedá krivka odzrkadľuje intenzitu fluorescence vzorky s pomerom roztoku častíc a fluoresceínu 500:1.

5.4 Aplikácia vzorky na bunky

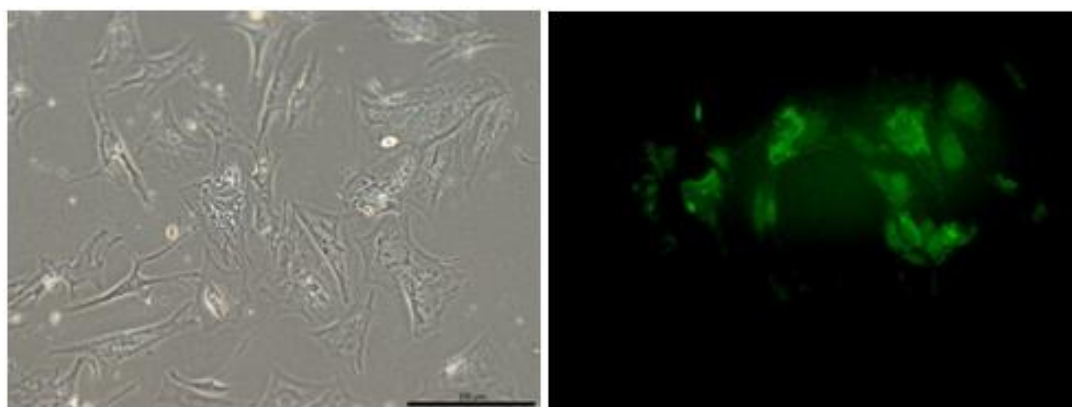
Pripravené magnetitové nanočastice obalené karboxymetylcelulózou, na ktoré bol naviazaný fluoresceín v pomere 50:1, boli aplikované na mezenchymálne kmeňové bunky.

5.4.1 Postup aplikácie

Do 24-jamkovej kultivačnej doštičky sa k adherovaným kmeňovým bunkám (20 000 kmeňových buniek na jamku s objemom 500 μ l) pridalo 50 μ g/ml nanočastíc. Zmes sa nechala kultivovať v CO₂ inkubátore 24 hodín.

5.4.2 Fluorescenčná mikroskopia

Po 24 hodinovej inkubácii nanočastíc s bunkami sa odsalo médium a dno jamky bolo premyté PBS roztokom. Boli vytvorené najskôr snímky v prechádzajúcom bielom svetle (vid' Obr. 19 A) a následne vo fluorescenčnom móde (vid' Obr. 19 B). Kmeňové bunky aj po označení fluorescenčnými nanočasticami zachovali rovnakú morfológiu ako bunky kontrolné. Emisia fluoresceínu bola patrná hlavne z membrány a cytosólu buniek. Je teda pravdepodobné, že po dobu 24 hodín dochádza k postupnému procesu internalizácie nanočastíc do bunkového cytosólu procesom zvaným endocytóza (proces typický pre SPIO nanočastice). Z mikroskopického zobrazenia označených buniek je zrejmé, že nanočastice sú biokompatibilné a môžu byť využité na účely bunkového a molekulárneho optického zobrazovania.



19A

19B

Obr. 19A, 19B: Kmeňové bunky zobrazené svetelnou mikroskopiou A) v prechádzajúcom bielom svetle, B) vo fluorescenčnom móde (zelená emisia); zväčšenie 20x.

6 ZÁVER

Bakalárska práca popisuje aktuálnu tému, prínosnú pre moderné diagnostické metódy v medicíne, a to tzv. multimodálne kontrastné látky pre bunkové a molekulárne zobrazovanie. Kontrastné látky na báze SPIO nanočastíc sú používané v MRI pre širokú škálu zobrazovacích orgánov. Vďaka unikátnym fyzikálnym vlastnostiam ako je jednodoménohosť a superparamagnetizmus spôsobujú negatívny kontrast zobrazovaného tkaniva či orgánu, a tým zvyšujú kontrast medzi požadovaným zobrazovaným a okolitým tkanivom. Veľkou výhodou je netoxičita a biodegradabilita narozdiel od pozitívnych gadolíniových kontrastných látok. Navyše, SPIO nanočastice je možné použiť ako nosiče liečiv pri magneticky cielelom doručovaní, za použitia vonkajšieho gradientného magnetického pola. MRI je neinvazívna diagnostická metóda, ktorou je možné priestorovo zobrazit' aj mäkké tkanivá v akejkoľvek hĺbke. Nevýhodou je však nízka citlivosť. Oproti tomu optické zobrazovanie (optical imaging) má výhodu práve vo vysokej citlivosti, nízkej cene a dobrej dostupnosti. Pri in vivo použití sa však prejavuje efekt absorpcie žiarenia v biologickom tkanive. Veľkou výzvou je teda príprava takých kontrastných látok, ktoré vyzdvihnú výhody oboch vyššie uvedených diagnostických metód.

Cieľom praktickej časti bakalárskej práce bolo teda pripraviť bifunkčnú kontrastnú látku pre MRI a optické zobrazovanie, predovšetkým pre účely značenia kmeňových buniek pri bunkovej terapii. Samotná príprava zahŕňala konjugáciu fluorosceínu (5-DTAF (5-(4,6-Dichlorotriazinyl) Amino fluoresceín)) na povrch SPIO nanočastíc obalených karboxymetylcelulózou.

Konjugácia farbiva na povrch nanočastíc bola potvrdená niekoľkými metódami. Metódou DLS bol zistený pokles veľkosti výsledných konjugovaných nanočastíc z pôvodných 120 nm na 100 nm. Zároveň došlo k posunu záporného náboja z -45,6 na -25,5 mV. Emisia fluorescencie konjugovaných nanočastíc bola overená jednak fluorescenčnou spektrofotometriou, a tiež pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Na záver bola vzorka aplikovaná na kmeňové bunky a vystavená inkubácii 24 hodín. Z výsledkov je zrejmé, že nanočastice obalené fluoresceínom sú biokompatibilné, čiže nespôsobujú zmenu morfológie buniek (prípadne ich degradáciu), sú postupne bunkami pohlcované do vnútrobunkového prostredia (cytosólu) a emitujú v zelenej oblasti.

Pripravený bimodálny komplex obsahujúci SPIO nanočastice konjugované fluoresceínom je nádejny pre bunkové zobrazovanie pomocou metódy MRI a optical imaging.

7 LITERATÚRA

- [1] Cao, Guozhong. *Nanostructures & Nanomaterials: Synthesis, Properties & Applications*. London: Imperial College Press, 2004. ISBN 1-86094-415.
- [2] Kubínek, Roman. *Vzdělávání v nanotechnologiích*[online]. Olomouc, 2011 [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <<http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/VzdelavaniNano.pdf>>
- [3] Kluchová, Kateřina. *Syntéza a charakterizace nanočástic oxidů železa pro lékařské aplikace*. Olomouc, 2009. Dizertační práce.
- [4] Kolářová, Mary. *Optimalizace značení kmenových buněk SPIO nanočásticemi*. Olomouc, 2013. Diplomová práce.
- [5] Šeděnkoá, Veroninka. *Spinové vychýlení u nanočástic gama-Fe₂O₃ a jeho studium pomocí Mössbauerovy spektroskopie ve vnějším magnetickém poli*. Olomouc, 2011. Diplomová práce.
- [6] Reddy, A.M. et al., *In vivo Tracking of Mesenchymal Stem Cells Labeled with a Novel Chitosan-coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles using 3.0T MRI*. J Korean Med Sci, 2010. 25: 211-219.
- [7] Goya, G. F., et al. *Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles*. Journal of Applied Physics, 2003, 94.5: 3520-3528.
- [8] Gupta et al. *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, 2005, 26.18: 3995-4021.
- [9] Wang et al. *Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging*. European radiology, 2001, 11.11: 2319-2331.
- [10] Cromer Berman et al. *Tracking stem cells using magnetic nanoparticles*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2011, : 343-355.
- [11] Zhe Liu, Fabian Kiessling, and Jessica Gärtjens. *Advanced Nanomaterials in Multimodal Imaging: Design, Functionalization, and Biomedical Applications*. Journal of Nanomaterials, 2010:1–15, 2010.
- [12] Cornell, Rochelle M.; Schwertmann, Udo. *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. John Wiley & Sons, 2003.

- [13] Schüler, D.; Frankel, Richard B. *Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52.4: 464-473.
- [14] Klein, C. *Mineralógia*. Bratislava: Oikos-Lumon, 2006.
- [15] *ResearchGate* [online].[cit.2016-04-04].Dostupné z:
https://www.researchgate.net/figure/272376574_fig5_Fig-12-The-magnetite-spinel-structure-FeOFe-2-O-3-21
- [16] Tucek, J., Zboril R., Petridis D. *Maghemite nanoparticles by view of Mössbauer spectroscopy*. J Nanosci Nanotechnol. 2006
- [17] Marková, Zdenka. *Příprava, charakterizace a aplikace multifunkčních hybridních nanostruktur založených na nanočásticích bakteriálního magnetitu a nulamocného železa*. Olomouc, 2013. Disertační práce.
- [18] Kluchová, Kateřina. *Syntéza a charakterizace nanočástic Fe₂O₃ termicky indukovanou reakcí pevné fázi s ohledem na využití v bioaplikacích*. Olomouc, 2005. Diplomová práce.
- [19] Classes of Magnetic Materials. *Institute for Rock Magnetism*, [online]. University of Minnesota, 2009 [cit. 2016-03-28].
Dostupnéz: http://www.irm.umn.edu/hg2m/hg2m_b/hg2m_b.html
- [20] Mohapatra, M.; Anand, S. *Synthesis and applications of nano-structured iron oxides/hydroxides—a review*. International Journal of Engineering, Science and Technology, 2010, 2.8.
- [21] Syková, E. and Jendelová P., *Magnetic Resonance Tracking of Implanted Adult and Embryonic Stem Cells in Injured Brain and Spinal Cord*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. 1049(1): p. 146-160.
- [22] Svatáková, Markéta. *In vitro studie mezenchymálních kmenových buněk značených magnetickými nanočásticemi*. Olomouc, 2012. Diplomová práce.
- [23] Vlaardingerbroek M. T. and Boer J. A., *Magnetic resonance imaging: Theory and practice, 3rd ed.* 2005.
- [24] Browne M. and Semelka R. C., *MRI: Basic Principles and Applications*, 2nd Edition. New York: Wiley, 1999.
- [25] Malá, Aneta. *Dynamické MR zobrazování na základě kontrastu T1*. Brno, 2011. Diplomová práce.
- [26] Binns, Chris. *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*. 2010. ISBN 978-0-471-77647-5.

- [27] Klener, Pavel. *Chemoterapie - minimum pro praxi*. Praha: Triton, 1999. ISBN 80-7254-028-9.
- [28] Alexiou, C.; Arnold, W.; Klein, R. J.; Parak, F. G.; Hulin, P. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting, *Cancer Res.*, 2000, 60, 6641-8.
- [29] Alberts, Bruce et al. *Základy buněčné biologie*. Espero, 2005. ISBN 8090290620.
- [30] Ďurkovský, Juraj a Bolješiková Elena. *Rádioterapia zhubných nádorov*. 2vyd. Bratislava: Liga proti rakovine SR, 2008. ISBN 978-80-89201-29-7
- [31] DUTZ, Silvio; HERGT, Rudolf. *Magnetic particle hyperthermia—a promising tumour therapy?*. *Nanotechnology*, 2014, 25.45: 452001.
- [32] ŠAFAŘÍKOVÁ, Mirka a Šafařík Ivo. *Magnetické separace v přírodních vědách a biotechnologiích*. *Chem. Listy* 89.1995, 280-287.
- [33] PANKHURST, Q.A. et al. *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2003, , 167-181.
- [34] Kubitscheck, Ulrich. *Fluorescence Microscopy From principles to Biological Applications*. Bonn : Wiley-Blackwell, 2013. 978-3-527-3292-9.
- [35] Lakowicz, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Baltimore : Springer, 2006. 0-387-31278-1.
- [36] Ke, J.H., Lin J.J. and Carey J.R. *A specific tumor-targeting magnetofluorescent nanoprobe for dual-modality molecular imaging*. *Biomaterials*. 2010, (31), 1707-1715.
- [37] Key, Jaehong a Leary, James F. *Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine*. *International Journal of Nanomedicine*. 2014, 711-726.
- [38] Lakowicz, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Baltimore : Springer, 2006. 0-387-31278-1.
- [39] Wolfbeis, O.S. *Fluorescence spectroscopy : new methods and applications*. Berlin: Springer, 1993. ISBN 3540552812.
- [40] Kubitscheck, Ulrich. *Fluorescence Microscopy From principles to Biological Applications*. Bonn : Wiley-Blackwell, 2013. 978-3-527-3292-9.
- [41] Mason, W.T. *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*. 2nd ed. London: Academic Press, 1999. ISBN 0-12-447836-0.

- [42] LIU, Yang et al. Optical probes and the applications in multimodality imaging. *Contrast Media Mol. Imaging*. 2011, 169-177.
- [43] Karlík, Miroslav. *Úvod do transmisní elektronové mikroskopie*. Praha: České vysoké učení technické, 2011. ISBN 978-80-01-04729-3.
- [44] Vůjtek, Milan, Kubínek Roman a Mašláň Miroslav. *Nanoskopie*[online]. 1. vydání. Olomouc: UPOL, 2012 [cit. 2016-04-01]. ISBN 978-80-244-3102-4. Dostupné z:<http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/nanoskopie.pdf>
- [45] ŠEVČÍKOVÁ, Petra et al. *Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů*. Chem. Listy. 2014, (108), 479-482.
- [46] Berne, Bruce J and Pecora Robert. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology and physics*. Mineola, N.Y.: Dover Publications, c2000. ISBN 0-486-41155-9
- [47] Fyzikálna kinetika.[cited 2016.<<https://www.upjs.sk/public/media/4354/Biofyzika07.pdf>>
- [48] Orolín, Ján. *Stabilita koloidních roztoků nanoslutin*. Brno, 2014. Bakalářská práce.
- [49] Kvítek, L. *Metody studia koloidních soustav*. Učebný text, 2006.
- [50] Goldys Ewa M. *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences*. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0-470-08370-3
- [51] Gore, Michael G. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry : a practical approach*. 1st ed. New York: Oxford University Press, 2000. ISBN 0199638128.
- [52] Bakandritsos, Aristides. *Doxorubicin Nanocarriers Based on Magnetic Colloids with a Bio-polyelectrolyte Corona and High Non-linear Optical Response: Synthesis, Characterization and Properties*. Adv. Funct. Mater.2011(21), 1465-1475.
- [53] *AAT Bioquest* [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://aatbio.com/gen4prst.pl?Cid=200&gid=423>
- [54] *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D16>
- [55] *AnaSpect* [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://www.anaspec.com/products/product.asp?id=28815>