

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY**



## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Vliv dopace gadolinia u nanočástic oxidů železa na  
cytotoxicitu zdravých buněčných linií**

**Autor: Nikola Mannová**

**Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.**

**Studijní obor: Nanotechnologie**

**Forma studia: Prezenční**

**Rok: 2016**

# Bibliografická identifikace

**Jméno a příjmení autora:** Nikola Mannová

**Název práce:** Vliv dopace gadolinia u nanočástic oxidů železa na cytotoxicitu zdravých buněčných linií

**Typ práce:** bakalářská

**Pracoviště:** Katedra experimentální fyziky

**Vedoucí práce:** Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2016

**Počet stran:** 37

**Jazyk:** čeština

## **Abstrakt:**

V této bakalářské práci je zkoumána cytotoxicita gadolнием dopovaných a nedopovaných superparamagnetických nanočástic oxidů železa (SPIO) na fibroblastech a kmenových buňkách. Práce obsahuje teoretický rozbor zabývající se nanotechnologiemi obecně, nanočásticemi oxidů železa a jejich specifickými vlastnostmi jako jsou například jednodoménnost a superparamagnetismus. Následně rozebírá interakci mezi nanočásticemi a buňkami a možnostmi studia cytotoxicity. Nakonec řeší vliv gadolinia na už zmíněnou cytotoxicitu SPIO nanočástic. Druhou částí je část experimentální, která se zabývá popisem používaných materiálů a přístrojů. Dále popisuje přípravy buněk na experiment - jejich kultivaci, rozsazování, počítání a následné značení SPIO nanočásticemi. Poté je rozebírán průběh tří denního experimentu a jeho struktury. Na závěr práce zobrazuje výsledky MTT testů prováděných na buňkách a jejich důsledky. Výsledky práce ukazují, že gadolнием dopované nanočástice jsou mírně toxičtější, avšak v použitých koncentracích nepřesahuje pokles viability 30% od kontrolních neznačených buněk. Z výsledků je patrné, že připravené gadolнием dopované SPIO nanočástice mohou být potenciálně využity v MRI jako nové biokompatibilní duální kontrastní látky, avšak je zapotřebí další studie zkoumající vliv dopace gadolinia na kontrast v MRI.

**Klíčová slova:** superparamagnetické nanočástice oxidů železa, SPIO, fibroblasty, kmenové buňky, toxicita, cytotoxicita, gadolinium, gadolнием dopované SPIO nanočástice, MTT test

# Bibliographical identification

**Author's first name and surname:** Nikola Mannová

**Title:** The influence of gadolinium doped iron oxide nanoparticles on cytotoxicity of healthy cell lines

**Type of thesis:** bachelor

**Department:** Department of Experimental Physics

**Supervisor:** Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.

**Year of presentation:** 2016

**Number of pages:** 37

**Language:** czech

## **Abstract:**

This bachelor thesis describes the influence of gadolinium doped superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO) on cytotoxicity of fibroblasts and stem cells. The thesis includes theoretical introduction of nanotechnology and iron oxide nanoparticles. The work also discusses specific characteristics of SPIO nanoparticles like single domain effect and superparamagnetism. After this the thesis describes interaction between nanoparticles and cells through the study of cytotoxicity. In the end of theoretical assay the thesis mentions the possible effect of gadolinium on cytotoxicity of SPION. The experimental part starts with a brief description of used materials and devices. After that the thesis clarifies the procedure of preparing cells for experiment, for example cultivation. Then the work describes process of three-day experiment itself. Finally, the thesis shows the results of MTT assays and their consequences. Results of tests indicate that gadolinium doped SPIO nanoparticles are slightly more toxic. However, the decrease of viability did not exceed 30% from the control cells without SPION. The results demonstrate that gadolinium doped iron oxide nanoparticles can be potentially used as a new biocompatible dual contrast medium for magnetic resonance imaging (MRI). Nevertheless, the further study about an influence of gadolinium on contrast in MRI is needed to perform.

**Keywords:** superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIO, fibroblasts, stem cells, toxicity, cytotoxicity, gadolinium, gadolinium doped SPIO nanoparticles, MTT assay

Prohlašuji, že jsem závěrečnou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Kateřiny Polákové, PhD. a výhradně za použití zdrojů, které cituji a uvádím v seznamu zdrojů.

V Olomouci dne .....

Podpis .....

Děkuji vedoucí práce Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D. za ochotu, čas a odborné vedení při zpracování této práce. Dále děkuji Mgr. Zdence Medříkové, Ph.D. za poskytnutí vzorků k realizaci experimentu a celému týmu RCPTM za poskytnutí prostoru pro provedení experimentu a jejich pochopení. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Haně Slavíčkové za motivaci, korekturu a obrovskou dávku trpělivosti, kterou mi během psaní práce poskytla.

# OBSAH

ÚVOD .....	8
TEORETICKÁ ČÁST .....	9
1. POJEM „NANO“ VE SVĚTĚ VĚDY .....	9
1.1. DEFINICE NANOTECHNOLOGIÍ .....	9
1.2. DEFINICE NANOMATERIÁLŮ A POJEM NANOČÁSTICE.....	9
1.3. PŮVOD NANOČÁSTIC .....	10
2. NANOČÁSTICE OXIDŮ ŽELEZA.....	11
2.1. STRUKTURNÍ FORMY OXIDŮ ŽELEZA.....	11
2.2. JEDNODOMÉNOVOST.....	13
3. SUPERPARAMAGNETISMUS.....	14
4. INTERAKCE S BUŇKOU .....	15
4.1. BUNĚČNÉ POHLČENÍ .....	15
4.2. PROSTUP MEMBRÁNOU .....	15
5. TOXICITA .....	17
5.1. VLIV VLASTNOSTÍ NANOČÁSTIC NA TOXICITU .....	17
5.2. TESTY VIABILITY .....	17
5.2.1. Trypanová modř.....	17
5.2.2. MTT test .....	18
6. VLIV GADOLINIA NA CYTOTOXICITU NANOČÁSTIC.....	19
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
7. CÍL PRÁCE .....	20
8. POUŽITÉ MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	21
8.1. MATERIÁLY .....	21
8.2. PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	21
9. POUŽITÉ METODY .....	23
9.1. KULTIVACE BUNĚK.....	23
9.2. PASÁŽOVÁNÍ.....	23
9.3. VÝMĚNA MÉDIA .....	23
9.4. POČÍTÁNÍ BUNĚK.....	24
9.5. ZNAČENÍ BUNĚK .....	24
10. POSTUP EXPERIMENTU .....	25

10.1. PRVNÍ DEN .....	25
10.2. DRUHÝ DEN.....	25
10.3. TŘETÍ DEN .....	26
11. VÝSLEDKY.....	28
11.1. PRVNÍ TEST – FIBROBLASTY .....	28
11.2. DRUHÝ TEST – FIBROBLASTY .....	30
11.3. TŘETÍ TEST – KMENOVÉ BUŇKY.....	32
ZÁVĚR.....	35
ZDROJE .....	36

# ÚVOD

Obrovský vývoj a posun ve výzkumu světa nanotechnologií má za důsledek neustálé posuny hranic pro potenciální využití nanočástic. Velmi podstatným se stalo využití nanotechnologií v bioaplikacích. Už dnes můžeme najít nanočástice používané jako čističe podzemních vod v ekologii nebo k výrobě antibakteriálních sterilních materiálů.

Velký potenciál ale skrývají nanotechnologie v medicíně. Nanočástice oxidů železa jsou jeho nedílnou součástí. Jelikož je železo kovem běžně se vyskytujícím v lidském těle, u některých dospělých můžeme nalézt více než 4 g železa v těle, víme, že z hlediska toxicity by nemělo být železo v dostatečně malém množství problém. Mimo biokompability nám nanočástice železa zajišťují i biodegradabilitu. Lidské tělo je totiž odbourává v rámci svého fyziologického metabolismu.

Důležitým aspektem využití nanočástic oxidů železa jsou i jejich magnetické vlastnosti. Za zmínění určitě stojí jejich superparamagnetismus, který vykazují jednodoménné částice už za pokojové teploty.

Využití nanočástic oxidů železa v medicíně spočívá zejména v protinádorové léčbě, distribuci léků a jako kontrastní činidlo na zobrazování magnetickou rezonancí (MRI).

Nejvíce zastoupené v tomto směru jsou nanočástice magnetitu a maghemitu.[1]

S dalším výzkumem nanočástic pro medicínské účely dochází k možnosti dopování jinými kovy za účelem zlepšení vlastností pro konkrétní využití. Jedním z důležitých kovů je gadolinium, které nám mění magnetické vlastnosti nanočástic, což má vliv na kontrast v MRI.

Gadolinium dopované nanočástice oxidů železa mají obrovský potenciál jako kontrastní činidla na zobrazování magnetickou rezonancí. Nejenže jejich účinnost je přibližně pětikrát větší než dnes používaná činidla, ale gadolinium dopované nanočástice oxidů železa skrývají i ambice na propojení diagnostiky a distribuce léčiva v rámci jednoho úkonu.[2]

Jednou z hlavních věcí pro klasifikaci gadolinium dopovaných nanočástic oxidů železa jako kontrastního činidla pro MRI je výzkum cytotoxicity. Prvním krokem je tedy in vitro výzkum cytotoxicity na živých buněčných liniích. Ten probíhá v prostředí co nejpodobnějšímu in vivo – tedy lidského či zvířecího těla.

Po kultivaci a dostatečné přípravě buněčných linií se provede test viability, který v procentech udá, kolik buněk přežilo značkování gadolinium dopovaných nanočástic oxidů železa. Z těchto procentuálních výsledků je možné odvodit, zda je gadolinium pro buňky toxické nebo či je vhodné pro další výzkum v hledání co nejúčinnějšího kontrastního činidla.



# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. POJEM „NANO“ VE SVĚTĚ VĚDY

Vše co se týče nanotechnologií a nanočástic se točí kolem předpony *nano-*. Tento pojem pochází z řeckého *νανος* (nanos), což v překladu znamená trpaslík. Tato předpona je také součástí soustavy SI a vyjadřuje jednu miliardtinu ( $10^{-9}$ ) základní jednotky. Značíme jí písmenem n.[3]

### 1.1. DEFINICE NANOTECHNOLOGIÍ

Nanotechnologie mají mnoho definicí. Můžeme se na ně dívat jako na multidisciplinární obor zahrnující chemii, fyziku, biologii, vědy o materiálech a inženýrství. Další definice nám také říká, že nanotechnologie jsou projektování, charakterizace, produkce a aplikace struktur, zařízení a systémů řízení tvarů a rozměrů v nanometrické škále.[2] Nebo můžeme nanotechnologie chápat jako aplikace vědeckého poznání vedoucí k syntéze, manipulaci a použití materiálů v rozmezí 1-100 nm, u nichž se mohou objevovat nové vlastnosti a fenomény vzhledem k tomuto rozměru.[4]

### 1.2. DEFINICE NANOMATERIÁLŮ A POJEM NANOČÁSTICE

Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization, ISO) nám udává: „*Nanomateriál je materiál s jakýmkoliv vnějšími rozměry velikosti v řádu nanometrů nebo s vnitřní strukturou nebo povrchovou strukturou v řádu nanometrů, přesněji 1–100 nm.*“[5]

Evropská komise doporučuje definici, která nám říká: „*Nanomateriál je přírodní materiál, materiál vzniklý jako vedlejší produkt nebo materiál vyrobený obsahující částice v nesloučeném stavu nebo jako agregát či aglomerát, ve kterém je u 50 % nebo více částic ve velikostním rozdělení jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí velikosti 1–100 nm.*“[6] Jsou připouštěny i některé výjimky, co se týče nižšího (1–50 %) obsahu částic v tomto rozmezí. V této definici agregátem myslíme částici složenou z pevně vázaných nebo sloučených částic, zatímco aglomerátem shluk slabě vázaných částic nebo agregátů, jejichž výsledný vnější povrch je podobný součtu povrchů jednotlivých složek.

V rámci předchozí charakteristiky za nanočástici považujeme malou část hmoty s definovanými fyzikálními hranicemi.[6]

### 1.3. PŮVOD NANOČÁSTIC

Nanočástice můžeme dělit na přírodní a uměle vytvořené. Mezi přírodní nanočástice řadíme například nanočástice vznikající sopečnou činností, různé druhy jílů nebo i třeba části těl hmyzu či viry a proteiny. Vykazují se rozmanitou a složitější definovatelností.[7]

Všechny přírodní nanomateriály vznikly procesem samoorganizace (neboli self-assembly), tedy procesem, při kterém se molekuly daného nanomateriálu, spontánně organizují a vytvářejí výsledné struktury. Díky své struktuře mají přírodní nanomateriály velmi unikátní a zajímavé vlastnosti, kterými se mnohdy člověk inspiroval a v rámci biomimetiky vytvořil nanomateriál inspirovaný přírodou za účelem replikace těchto unikátních vlastností. Mezi zmíněné vlastnosti řadíme například superhydrofobicitu, schopnost samočištění, antireflexní vlastnosti či schopnost samohojení.[3]

Uměle vytvořené nanočástice dělíme na částice vzniklé řízenou lidskou činností a na částice vzniklé náhodným procesem neboli antropogenní nanočástice. Nanočástice vzniklé řízenou lidskou činností jsou lépe definovatelné. Řadíme je do 8 kategorií.

- Uhlíková čern
- Kovy, oxidy kovů a keramika
- Fullereny
- Uhlíkové nanotrubic
- Nanodrátky
- Kvantové tečky
- Dedrimery
- Nanojíly

Antropogenní nanočástice jsou velmi variabilní ve své velikosti i struktuře. Mezi procesy vzniku antropogenních nanočástic řadíme například spalování v dieselových motorech, důlní činnost, svařování apod. Významným zdrojem těchto nanočástic je tedy automobilová doprava.[7]

## 2. NANOČÁSTICE OXIDŮ ŽELEZA

Železo je nejrozšířenějším prvkem na Zemi. Můžeme ho spolu s jeho oxidy nalézt prakticky ve všech vrstvách a obalech Země – litosféře, pedosféře, atmosféře, biosféře, hydrosféře atd.[8]

### 2.1. STRUKTURNÍ FORMY OXIDŮ ŽELEZA

Oxidy železa dělíme do dvou hlavních skupin a to hydratované a nehydratované formy oxidů železa. Mezi hydratované formy řadíme minerály jako goethit, akaganeit, lepidokrokit, feroxyhit, ferihydrit atd. Vystavíme-li hydratované formy oxidu železa rostoucí teplotě na vzduchu, uvidíme, že nám začne mizet krystalická struktura a dojde k fázové transformaci. Díky této transformaci nám vznikají nehydratované formy oxidů železa. Mezi nehydratované formy patří tyto oxidy:[8]

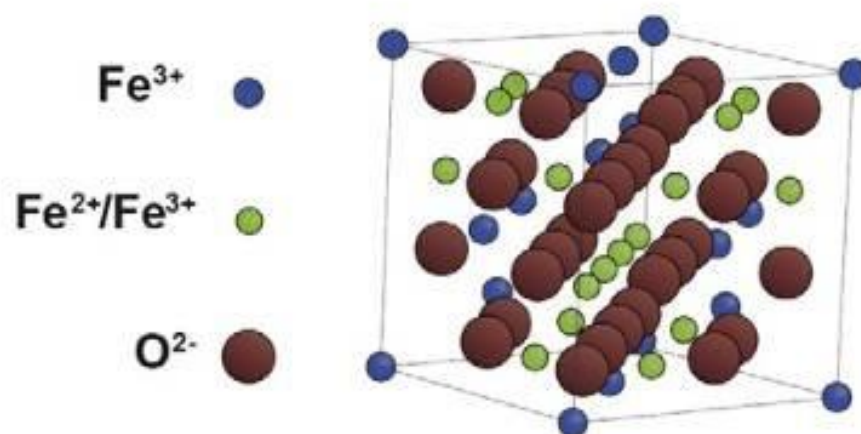
- Oxid železnatý – FeO – wüstit
- Oxid železitý – Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – polymorfní – α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (hematit), β-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemit), ε-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- Oxid železnato-železitý - Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – magnetit

My v naší experimentální části pracujeme s nanočásticemi magnetitu, tedy oxidu železnato-železitého, proto se budeme dál konkrétně zabývat pouze tímto oxidem železa.

Magnetit je černý, magnetický minerál běžně se vyskytující v přírodě. Můžeme ho nalézt jak v horninách, tak v organismech. Jedním ze zajímavých přírodních zdrojů nanočástic magnetitu jsou magnetotaktické bakterie, které v sobě procesem biomineralizace vytváří pravidelné magnetické nanokrystaly obalené membránou z fosfolipidů. Takto vzniklé nanočástice nazýváme magnetosomy. Tyto magnetosomy slouží bakteriím k magnetotaxi, tedy orientaci a pohybu pomocí magnetických siločar.[9]

Výhodou těchto nanočástic je, že jsou biokompatibilní a jejich fosfolipidová membrána umožňuje vazbu bioaktivních látek.

Magnetit se skládá z iontů Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup>. Jeho krystalovou strukturu řadíme do kubických krystalografických struktur. Anionty kyslíku vytváří FCC (face centered cubic) mřížku. Ionty železa jsou rozmístěny v 8 tetraedrických a 16 oktaedrických pozicích. V tetraedrických pozicích najdeme přednostně ionty Fe<sup>3+</sup>. Uspořádání si můžeme všimnout na obrázku č. 1.[1]

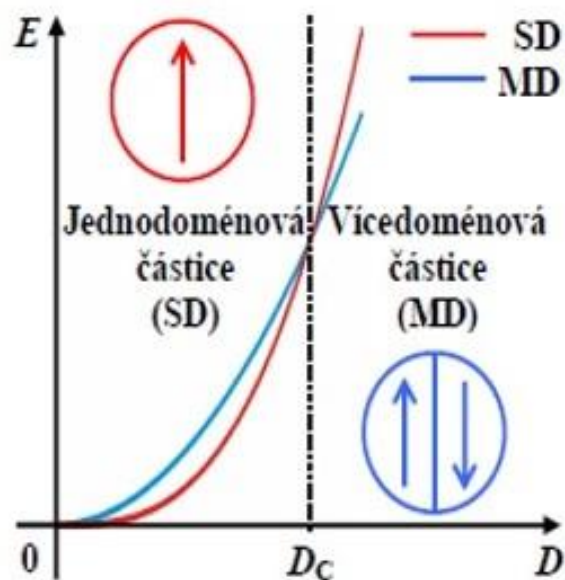


Obrázek č. 1: Grafické znázornění krystalové mřížky magnetitu.  
Převzato a upraveno z [10].

## 2.2. JEDNODOMÉNOVOST

Jednodoménořnost je velmi významný jeř spojený s konečným rozměrem materiálu. Objemový magneticky uspořádaný materiál se skládá z domén, neboli spontánně zmagnetovaných oblastí. Tyto skupiny magnetických momentů směřující v jednom směru, které spolupůsobí v rámci jedné domény, jsou odděleny doménovými stěny. Tyto bariéry jsou charakteristické svou energií a šířkou. Domény mění svůj vektor magnetizace pomocí nukleace a pohybu doménových stěn. Tato změna bývá zapříčiněna přítomností vnějšího magnetického pole. Pokud ale začneme materiál zmenřovat, začne klesat počet vznikajících doménových stěn až do momentu kritického objemu, kdy už bude pro materiál energeticky výhodnější rozdělit jednu doménu do menřích domén než tvořit doménové stěny (viz obrázek č. 2). Materiál, který má menřší nebo stejný objem, jak už zmíněný kritický, považujeme za jednodoménořv. V takových materiálech už se změny magnetizace neprovádí pomocí pohybu doménových stěn, nýbrž pomocí koherentní rotace magnetických momentů.[11]

Výsledkem je, že vzniklý jednodoménořv systém je vysoce uspořádaná magnetická struktura, jejíž magnetické momenty atomů jsou orientovány ve stejném směru, tudíž se projevují jako jeden velký magnetický moment. Tento zmíněný kritický rozměr/objem je platný pouze u sférických, magneticky neinteragujících nanočástic se silnou anizotropií. V jiném případě je potřeba vzít v úřahu i tvarovou anizotropii částice, která tento kritický rozměr částice zvětřuje.[11]



Obrázek č. 2: Závislost energie na rozměru částice ( $D$ ) pro jedno/vicedoménořvé sférické částice. Převzato z [11].

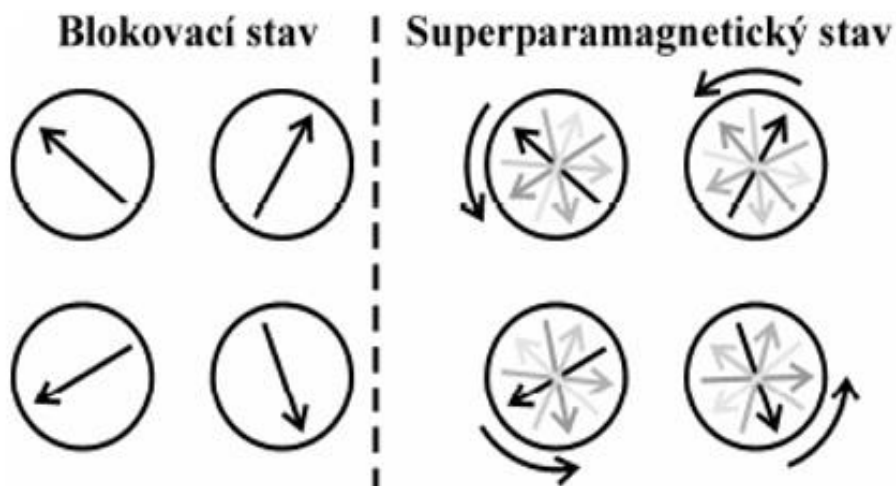
### 3. SUPERPARAMAGNETISMUS

Superparamagnetismus je dalším unikátním jevem spojeným s konečným rozměrem materiálu. Vzniká při dalším zmenšování rozměrů jednodoménového magnetického materiálu pod určitý hraniční rozměr, který je udán typem a morfologií daného nanomateriálu.[9]

Superparamagnetismus je stav materiálu, kdy jsou anizotropní energie a energie teplotních fluktuací srovnatelné. V tomto momentu se magnetický moment spontánně překlopí z jednoho snadného směru do druhého a to bez jakékoli přítomnosti vnějšího magnetického pole.[9]

Tento jev je závislý na teplotě. Teplotu, při které dochází ke srovnatelnosti anizotropní energie a energie teplotních fluktuací, nazýváme blokovací teplotou. Při teplotách nižších klesá energie teplotních fluktuací a naopak energie anizotropní se zvyšuje, čímž dochází k zafixování magnetického momentu v jednom snadném směru. Naopak je tomu při teplotách vyšších, než je teplota blokovací. V tom případě je energie teplotních fluktuací vyšší než energie anizotropní. Dochází k fluktuaci celkové magnetizace. [9]

Tudíž i slabé vnější magnetické pole způsobuje vybuzení velmi intenzivní vnitřní magnetizace uvnitř superparamagnetických nanočástic.[9]



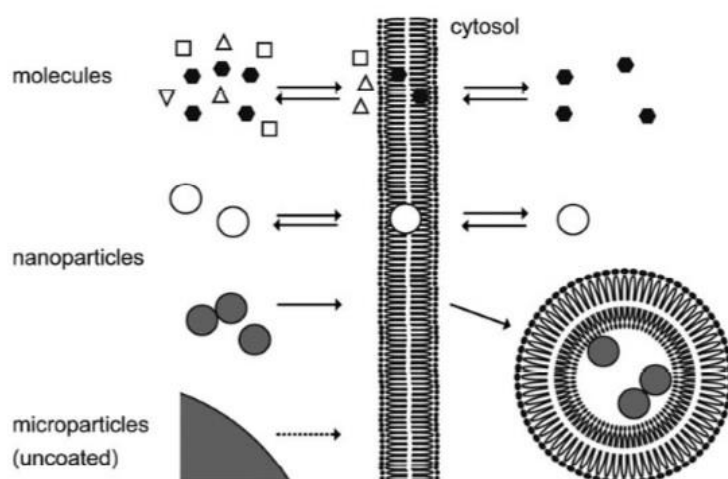
Obrázek č. 3: Blokovací stav (pro teploty nižší než teplota blokovací) a superparamagnetický stav (pro teploty vyšší než teplota blokovací) nanomateriálu. Převzato a upraveno z [11].

## 4. INTERAKCE S BUŇKOU

Buňka sama o sobě tvoří otevřený termodynamický systém, který neustále interaguje se svým okolím. Probíhá zde totiž neustálá výměna energie a látek mezi buňkou a okolím. Všechny tyto výměny probíhají přes semipermeabilní cytoplazmatickou membránu, která odděluje buňku od okolí. Tato membrána je složena z lipidové dvojvrstvy s kanálky a proteiny.[9] [12]

### 4.1. BUNĚČNÉ POHLCENÍ

Přímo nanočástice pronikají do buňky několika způsoby na základě jejich obalové vrstvy. Ta může mít hydrofobní či hydrofilní charakter. Konkrétně například nanočástice obalené polymerní vrstvou pronikají samovolně skrz membránu – free-floating metoda. Další metodou průniku látek do buňky je endocytóza. Tímto způsobem se do buňky transportují například nanočástice oxidů železa – viz obrázek č. 4.[9]



Obrázek č. 4: Znárodnění prostupu částic cytoplazmatickou membránou. Světlé nanočástice ukazují vstup difúzí a tmavé vstup endocytózou.

Převzato a upraveno z [13].

### 4.2. PROSTUP MEMBRÁNOU

Pokud k pohlcení nanočástic dochází formou endocytózy, buňka obklopí nanočástice cytoplazmatickou membránou a postupně je vchlípí do sebe, čímž vznikne váček, který se volně vyskytuje v cytoplasmě uvnitř buňky. Díky specifickým receptorům se váček naváže na určitou z organel buňky a dojde ke splynutí váčku s organelou. Uvnitř organely dojde ke konečné reakci buňky na nanočástice.[9]

U nanočástic často dochází k degradaci uvnitř buňky a to z důvodu, že je buňka považuje za potenciální hrozbu, tudíž je ještě ve váčku naváže na lysozom, kde dochází ke štěpení obsahu váčku díky enzymům. A právě tato reakce má za důsledek degradaci nanočástic. Tento případ můžeme konkrétně pozorovat u nanočástic železa.[9]

Aby se zabránilo štěpení, potahují se nanočástice určitou biokompatibilní vrstvou, která buňku zmate a celý proces degradace se značně zpomalí.[9]

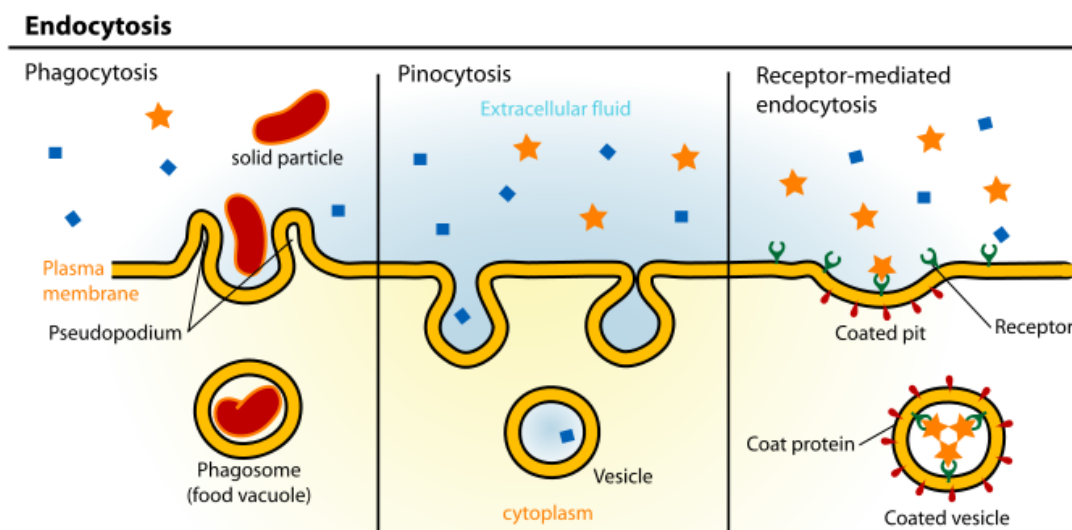
Velikost pohlcované látky nám taky určuje, o jaký přesný typ endocytózy se jedná. Existují tři typy endocytózy.

- Fagocytóza
- Pinocytóza
- Endocytóza zprostředkovaná receptorem

Fagocytóza neboli „cell eating“ spočívá ve vytvoření tzv. panožek kolem relativně velkého objektu a následného vchlípení. Panožky buňka vytváří pomocí membrány.[13]

Pinocytóza („cell drinking“) je děj, při kterém nedochází k transportu pouze látky, ale i okolní tekutiny. Membrána vytvoří váček kolem tekutiny s látkou. Tímto způsobem buňka pohlcuje kapaliny, malé části a v určitých případech i plyny.[13]

Posledním typem endocytózy je endocytóza zprostředkovaná receptorem, která je podobná pinocytóze s jediným rozdílem, že na membráně je určitý receptor, na který se dokáží navázat pouze specifické látky. Selektivnost látek k transportu vede k zrychlení a zvýšení účinnosti celého procesu.[13]



Obrázek č. 5: Znázornění typů endocytózy – zleva fagocytóza, pinocytóza a endocytóza zprostředkovaná receptorem.[15]



## 5. TOXICITA

Sledování cytotoxicity je nedílnou součástí studia interakcí nanočástic s buňkami. Při každém měření je nutné zjistit vliv nanočástic na viabilitu buněčných linií.[14]

### 5.1. VLIV VLASTNOSTÍ NANOČÁSTIC NA TOXICITU

Důležitým faktorem míry toxicity jsou vlastnosti nanočástic.

Umístění nanočástic v buňce určuje především velikost nanočástic. Vliv také má povrchový náboj, struktura nanočástice a následně i jejich koncentrace. Pokud je koncentrace vysoká, nanočástice se shromažďují v pánčkách vytvořených cytoplazmatickou membránou. Je-li ale koncentrace dostatečně nízká, nanočástice vytvoří shluky v cytoplazmě kolem jádra. Z hlediska toxicity ale problém vzniká až ve chvíli, kdy nanočástice proniknou do jádra.[9]

Dalším důležitou vlastností v rámci cytotoxicity je plocha povrchu. Čím je částice menší a má větší plochu povrchu, tím je i její toxicita vyšší.

Nejsnazším způsobem jak zjistit cytotoxicitu SPIO nanočástic, je provést test viability – viz níže.[9]

### 5.2. TESTY VIABILITY

Mezi nejpoužívanější testy viability patří barvení Trypanovou modří, MTT test či fluorescenční barvení.[14]

Viabilitu můžeme měřit i průtokovým cytometrem, fluorescenčními sondami či pomocí detekce integrity cytoplazmatické membrány.[16]

#### 5.2.1. Trypanová modř

Trypanová modř je barvivo obsahující chromofor. Tento test funguje na principu zbarvení mrtvých buněk. U těch totiž barvivo pronikne dovnitř přes poškozenou cytoplazmatickou membránu a zbarví je do tmavě modra. Membránou zdravých živých buněk trypanová modř nepronikne. Po rozlišení se buňky mrtvé i živé spočítají a pomocí jednoduchého vzorce se vypočítá viabilita.[9]

### 5.2.2. MTT test

Základem MTT testu je reakce buněčných enzymů s methyltetrazoliovou solí. Konkrétně se jedná o enzymy mitochondrií. Klíčovou roli hraje aktivita mitochondriálních dehydrogenáz. Ta rozhoduje o změně barvy roztoku. Aktivní dehydrogenázy odpovídají živým buňkám, které barví roztok do fialova. Test se vyhodnocuje spektrofotometricky měřením absorpance. Měření probíhá při vlnové délce 570 nm.[9] [14]

Zde můžeme i jednoduše určit toxickou dávku materiálu, která odpovídá koncentraci, při které nastane buněčná smrt u poloviny buněk.

Problémem zde zůstává možné zkreslení dat kvůli probíhajícímu metabolismu buňky. Metabolická aktivita buňky se může měnit i bez přítomnosti přidané látky.[9] [14]

## 6. VLIV GADOLINIA NA CYTOTOXICITU NANOČÁSTIC

Gadolinium dopované nanočástice mají velké možnosti uplatnění v medicíně – hlavně ve snímkování MRI. Jako kontrastní činidlo by tyto nanočástice fungovaly pětikrát účinněji než dnes používané kontrastní činidlo. K tomu mají tyto nanočástice potenciál spojit diagnostiku rovnou s distribucí léků. [2]

Z obrovského potenciálu gadolinia ve využití v bioaplikacích plyne, že bychom potřebovali, aby gadolinium dopované nanočástice měly co nejmenší cytotoxicitu a co nejvyšší biokompabilitu.

V rámci teoretické rešerše jsme zjistili, že u experimentů nebyly zjištěny žádné vlivy na cytotoxicitu ani biokompabilitu. Výsledky viability buněčných linií se pohybovaly ve stejných rozmezích jako u nanočástic nedopovaných.[17] [18] [19]

Proto můžeme gadolinium dopované nanočástice považovat za velmi lukrativní jak v oblasti diagnostiky rakovinových buněk, tak v bioaplikacích obecně.[17] [18] [19]

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 7. CÍL PRÁCE

Po dostatečném teoretickém rozboru problematiky nanočástic, jsme se zaměřili na experiment samotný.

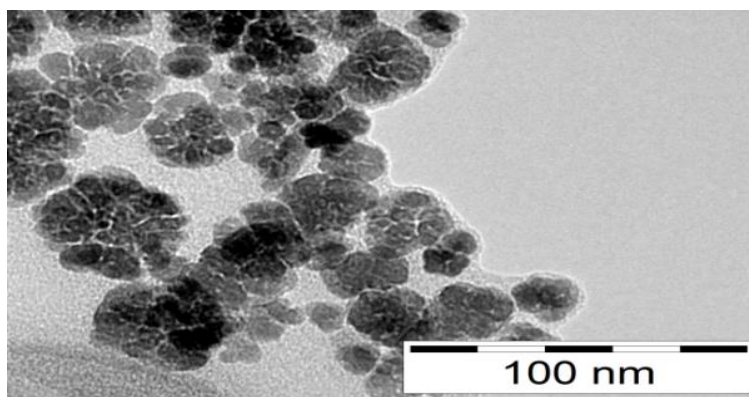
Cílem toho experimentu bylo zjistit, zda má gadolinium vliv na cytotoxicitu SPIO nanočástic a pokud ano, jestli má za efekt její snížení či zvýšení.

## 8. POUŽITÉ MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

### 8.1. MATERIÁLY

V experimentální části jsme pracovali s lidskými fibroblasty (NIH 3T3) a kmenovými buňkami získanými z odebrané tukové tkáně pacientů při liposukci. V rámci experimentu se na tyto buňky aplikovaly SPIO nanočástice nedopované či dopované určitým podílem gadolinia. Jednalo se o magnetické nanočástice stabilizované CMC (karboxymetylcelulózou). Gadolinem dopované SPIO nanočástice byly připraveny úpravou syntézy, kdy se během přípravy nahradilo 5% a 10% iontů železa ionty gadolinia ( $GdO_2$ ). Tyto nanočástice byly připraveny v RCPTM paní doktorkou Mgr. Zdenkou Medříkovou, Ph.D.

Jednotlivé nanočástice měly velikost cca 30 nm a vytvářely tzv. superklastry o velikosti přibližně 120 nm.



Obrázek č. 6: Snímek použitých SPIO nanočástic pořízených transmisí elektronovou mikroskopií (TEM)

Další nezbytností pro práci s buňkami v rámci *in vitro* experimentu bylo vhodné médium, které se lišilo pro každý typ buněk. Dále jsme také používali například roztok trypsinu – štěpícího proteinu pro deadheraci buněk pro jejich následné pasážování.

### 8.2. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

K správnému provedení experimentu byly využity následující laboratorní pomůcky - kultivační láhve, správně kalibrované pipety, kultivační panely (destičky) s jamkami a mnohé další.

Pro pozorování buněk a jejich adherace a deadherace jsme používali světelný mikroskop Olympus IX 70.

Další neodmyslitelnou součástí experimentu byl CO<sub>2</sub> inkubátor s prostředím pro buňky co nejideálnějším, tudíž co nejpodobnější prostředí in vivo – prostředí lidského (zvířecího) těla. Ten náš měl nastavenou teplotu na 37°C spolu s o 5% CO<sub>2</sub> obohacenou atmosférou.

Veškeré práce s buňkami a vzorky se prováděly ve flow-boxu, který nám zajišťoval sterilní prostředí a zastával funkci chemické digestoře pro bezpečnou práci.



Obrázek č. 7: Foto používaného flow-boxu.  
Převzato a upraveno z [14].

Využili jsme také přístroje jako heater na ohřev trypsinu a MTT roztoku nebo vodní lázně například na ohřevy média. A v neposlední řadě nesmíme zapomenout na spektrofotometr (TECAN I Control, Infinite 200Pro) s připojeným počítačem pro samotné provedení MTT testu.

## 9. POUŽITÉ METODY

### 9.1. KULTIVACE BUNĚK

Kultivace buněk se nejprve provádí ve velkých nebo malých kultivačních lahvích. Ty se dle potřeby pasážují a pravidelně se v nich vyměňuje médium – viz níže.

Dostatek živin a ochranu před infekcí zajišťuje právě médium, které má přesné složení pro každý typ buněk.

Důležitým aspektem viability buněk je i co největší omezení času stráveného mimo atmosféru inkubátoru.

Zda se nám buňky prosperují a úspěšně adherují kontrolujeme pravidelně výše zmíněným světelným mikroskopem. Jakmile množství buněk dosáhne 80% a více, provedeme pasáž.

### 9.2. PASÁŽOVÁNÍ

Pasážování neboli rozsazení buněk, provádíme při vysoké konfluenci buněk v kultivační lahvi, kdy by nedostatek prostoru a živin vedl k deadheraci buněk a následné buněčné smrti – tzv. kontaktní inhibice.

Nejprve si zahřejeme roztok PBS a médium ve vodní lázni na ideálně 37°C. Dále si v heateru ohřejeme zkumavku trypsinu, který se pro uchování účinnosti uchovává v zmražené podobě. Odsajeme z kultivační láhve médium a promyjeme buňky roztokem PBS pro odstranění zbytků média. Přidáme do kultivační láhve rozmrzlý roztok trypsinu a vložíme láhev do inkubátoru. Díky trypsinu (štěpícímu proteinu) se nám buňky deadherují ode dna. Úspěšnost deadherace zjistíme na mikroskopu, kdy úspěšně deadherovaný fibroblast/kmenová buňka má kulatý tvar a „plave“ nám v lahvi. Po deadheraci přidáme malé množství média pro zastavení procesu štěpení a následně polovinu média s buňkami odsajeme. Posledním krokem je, že doplníme médium podle velikosti kultivační láhve. Tím jsme vlastně zredukovali množství buněk na polovinu a dáváme jim prostor prosperovat a dál se množit.

### 9.3. VÝMĚNA MÉDIA

Pro viabilitu buněk je i nutná pravidelná dávka živin, tudíž pravidelná výměna média. Ta se provádí každé tři dny.

Po ohřátí média ve vodní lázni na 37°C, odsajeme veškeré médium z kultivační láhve a následně podle velikosti láhve doplníme pipetou požadované množství „čerstvého“ média.

## 9.4. POČÍTÁNÍ BUNĚK

Pro správné stanovení viability je nutné mít stejný počet buněk v každé jamce kultivačního panelu. My jsme v našem experimentu k počítání buněk používali tzv. Bürkerovu komůrku.

Jedná se o manuální počítání buněk pod světelným mikroskopem.

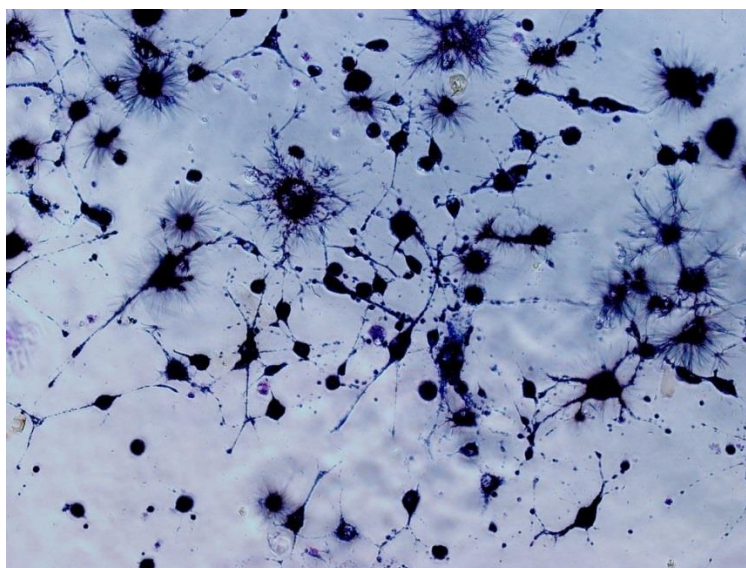
Bürkerova komůrka se skládá z podložního sklíčka s mřížkou a sklíčka krycího. Po nakápnutí naší buněčné suspenze vložíme komůrku pod mikroskop. Tam po dostatečném přiblížení a zaostření spočítáme množství buněk v každém čtverečku mřížky - konkrétně v pěti čtvercích v horní půlce komůrky a v pěti dolních. Poté sečteme napočítané buňky ve všech deseti čtvercích. Tento počet vydělíme deseti a vynásobíme  $10^5$ . Výsledkem je počet buněk v mililitru suspenze.

## 9.5. ZNAČENÍ BUNĚK

Značením buněk nazýváme finální část experimentu, kdy ke spočítaným zdravým buňkám (20 000 buněk v 100  $\mu$ l média v každé jamce 96-jamkové kultivační destičky) přidávám předem vypočítané množství vzorku SPIO nanočástic pro dosažení námi chtěných koncentrací.

Jako první krok si rozesadíme buňky z kultivační láhve do kultivačního panelu s určitým množstvím jamek. My jsme používali panel s 96 jamkami.

Po důkladném propočítání potřebných objemů vzorků jsme vždy odebrali toto množství média a napipetovali vzorek do jamky k buňkám. Dále už dochází k interakcím buněk se SPIO nanočásticemi – viz výše v teoretickém rozboru.



Obrázek č. 8: Fotka buněk po aplikaci MTT roztoku. Krystalky MTT roztoku v buňkách mají za následek modré zbarvení.



## 10. POSTUP EXPERIMENTU

Celý experiment od počítání buněk po samotné provedení MTT testu trvá tři dny. Samozřejmě pokud bereme v potaz i dostatečný čas pro kultivaci a dosažení potřebné adherence, viability a množství buněk v kultivační láhvi, jedná se spíše o týdny.

### 10.1. PRVNÍ DEN

Po ujištění, že jsou buňky narostlé v dostatečném množství a adherované, jsme postupovali stejně jako při pasážování buněk.

Nejprve jsme si zahřáli PBS a médium. Poté rozmrazili trypsin. Po správné deadheraci jsme, místo odsávání poloviny objemu buněčné suspenze, celý objem suspenze pipetou přenesli do zkumavky, kde jsme suspenzi pořádně rozsuspendovali.

Následně jsme spočítali počet buněk na mililitr pomocí Bürkerovy komůrky. Nejprve pod a poté nad krycí sklíčko komůrky jsme napipetovali 10  $\mu$ l suspenze.

Po uvážení kolik jamek budeme k experimentu potřebovat neboli kolik druhů vzorku budeme používat, vypočítáme, kolik buněk budeme k celému experimentu potřebovat (na každou jamku připadá 20 000 buněk). Posléze jednoduchým přepočtem vypočítáme počet mililitrů buněčné suspenze potřebné pro experiment.

Do každé jamky patří objem 100  $\mu$ l, tudíž doplníme do suspenze médium pro získání potřebného objemu a následně už jen mnohokanálovou pipetou „rozesadíme“ buňky do jamek.

Kultivační panel se zaplněnými jamkami ihned po dokončení kultivace vložíme do inkubátoru. V tuto chvíli může provádět testy viability, protože víme, že v každé jamce máme objem 100  $\mu$ l a počet buněk přibližně 20 000.

### 10.2. DRUHÝ DEN

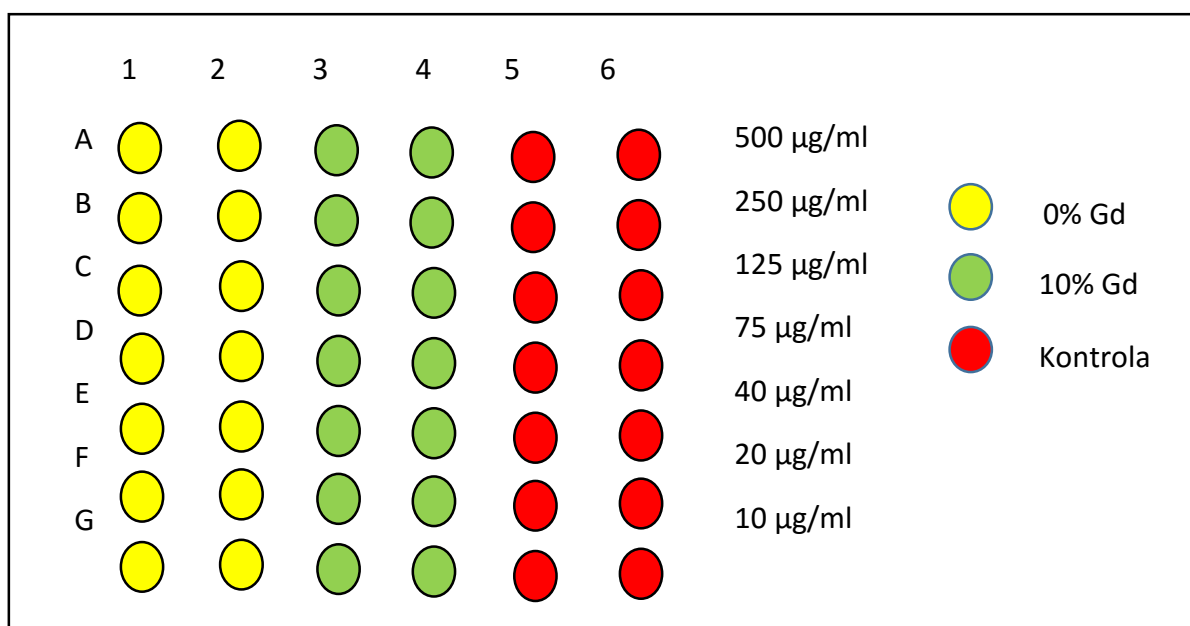
Po 24 hodinách strávených v inkubátoru jsme zkontrolovali, zda jsou buňky živé a adherované v každé jamce se suspenzí. Následně jsme buňky označili.

Jako první krok jsme si zvolili vzorky s určitým obsahem gadolinia. Konkrétně jsme používali vzorky s 5% a 10% obsahem Gd a vzorek nanočástic bez gadolinia. Po promyšlení, jaké vzorky budeme používat, jsme si stanovili koncentrace jednotlivých řádků kultivačního panelu. Naše koncentrace se konkrétně pohybovaly v rozmezí 10 – 700  $\mu$ g/ml SPIO.

Po ustanovení koncentrací a námi známé koncentrace zásobního roztoku SPIO nanočástic (2 mg/ml) jsme si vypočítali objem zásobního roztoku, který potřebujeme pro dosažení jednotlivých koncentrací.

Například pro koncentraci 500 µg/ml víme, že na 1 ml potřebujeme 0,25 ml 2 mg/ml koncentrovaného roztoku. Tudíž na objem 100 µl, který máme v každé jamce, potřebujeme 25 µl zásobního roztoku pro dosažení koncentrace 500 µg/ml.

Takto si rozpočítáme každou koncentraci a následně odebereme námi vypočítaný objem média, objem suspenze i se roztokem SPIO nanočástic musí být pořád v každé jamce 100 µl.



Obrázek č. 9: Rozložení koncentrací vzorků na kultivačním panelu.

### 10.3. TŘETÍ DEN

Po dalších 24 hodinách v inkubátoru se přidá do každé jamky 20 µl roztoku MTT (formazan). Ten si nejprve necháme rozmraznout v heateru podobně jako trypsin při pasážování s jediným rozdílem, že ho přikryjeme alobalem a pracujeme ve flow-boxu se zhaslým světlem. To z důvodu, že tento roztok je citlivý na světlo a jeho zbytečné vystavení světlu by mohlo vést ke zkreslení výsledků. Formazan přidáváme bez odebrání média.

Poté vložíme celý panel na 4 hodiny do inkubátoru. Během této doby se nám suspenze živých buněk v jamkách zabarví do fialova vlivem právě MTT roztoku.

Následně vyklepneme supernatant z destičky a přidáme detergent (DMSO), který nám rozpustí vzniklé krystaly roztoku formazanu. Celý panel vložíme na 15 minut na elektrickou míchačku.

Posledním krokem je vložení panelu do spektrofotometru, nastavení správných vlnových délek (570 nm) a změření intenzity absorpance.

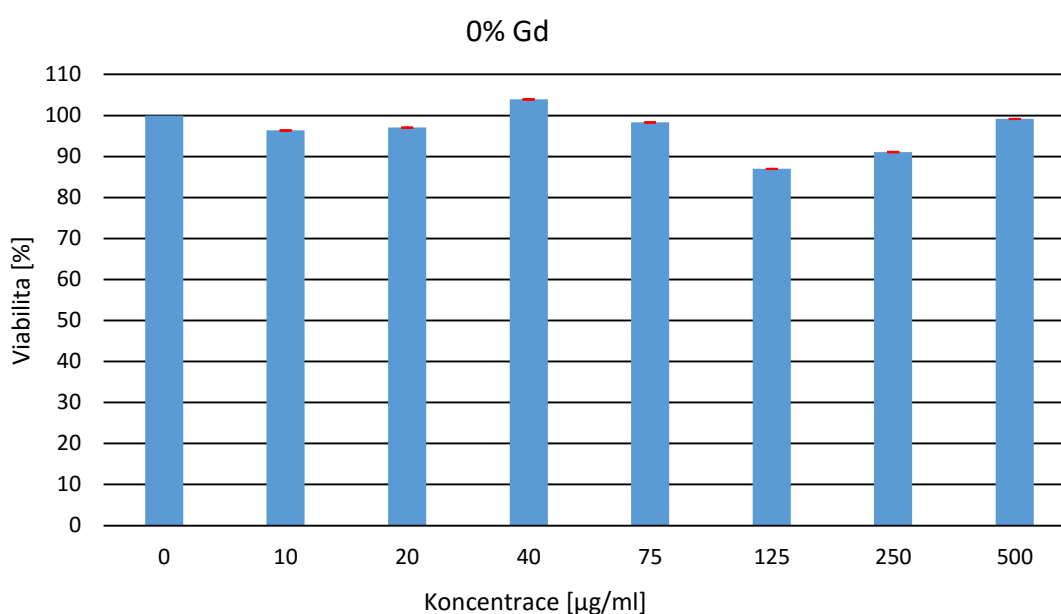
Následuje už jen početní zpracování výsledků.

## 11. VÝSLEDKY

### 11.1. PRVNÍ TEST – FIBROBLASTY

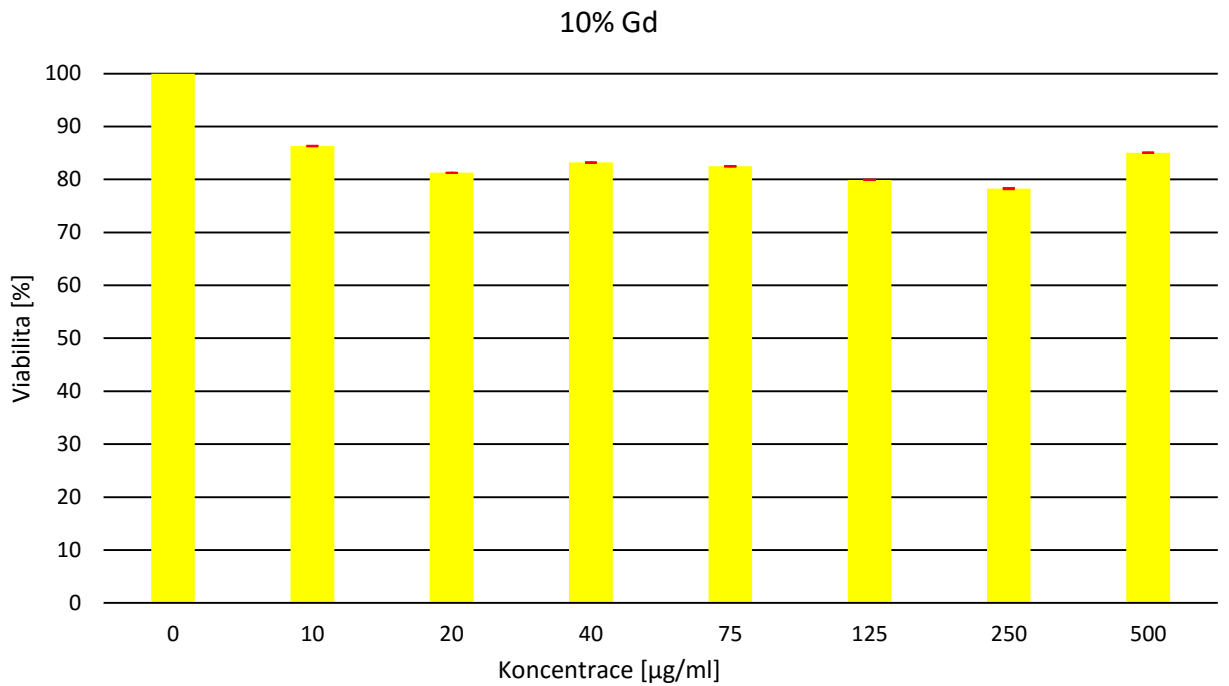
<b>koncentrace [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	0	10	20	40	75	125	250	500
<b>viabilita 0% Gd [%]</b>	100	96,336	97,073	103,908	98,332	86,978	91,043	99,150
<b>viabilita 10% Gd [%]</b>	100	86,293	81,268	83,226	82,474	79,928	78,260	85,057
<b>odchylka 0% Gd</b>	0	0,023	0,030	0,006	0,007	0,044	0,074	0,010
<b>odchylka 10% Gd</b>	0	0,048	0,009	0,021	0,016	0,004	0,111	0,014

Tabulka č. 1: Vypočítané viability pro jednotlivé vzorky s odchylkami 1.



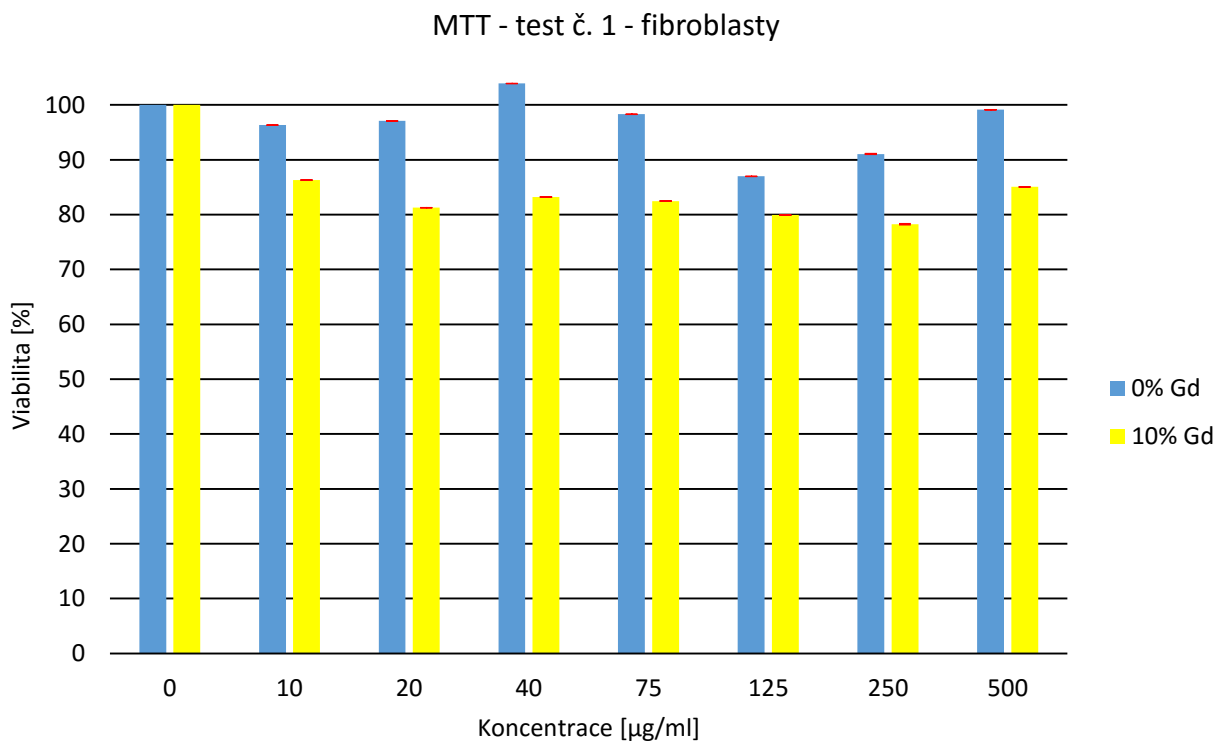
Obrázek č. 10: Graf závislosti viability na koncentraci u vzorku SPIO nanočástic s 0% obsahem Gd 1.

Z grafu můžeme vyčíst, že SPIO nanočástice bez procentuálního obsahu Gd jsou biokompatibilní. Největší pokles viability jsme zaznamenali u koncentrace 125  $\mu\text{g}$  SPIO na 1 ml suspenze, kdy viabilita činí  $(86,98 \pm 0,04)\%$ .



Obrázek č. 11: Graf závislosti viability na koncentraci u vzorku s 10% Gd 1.

U dopovaných nanočástic s 10% Gd vidíme už znatelný pokles viability od kontrolní hodnoty. Nejnižší hodnota viability je  $(78,3 \pm 0,1)\%$  u koncentrace 250 µg/ml.



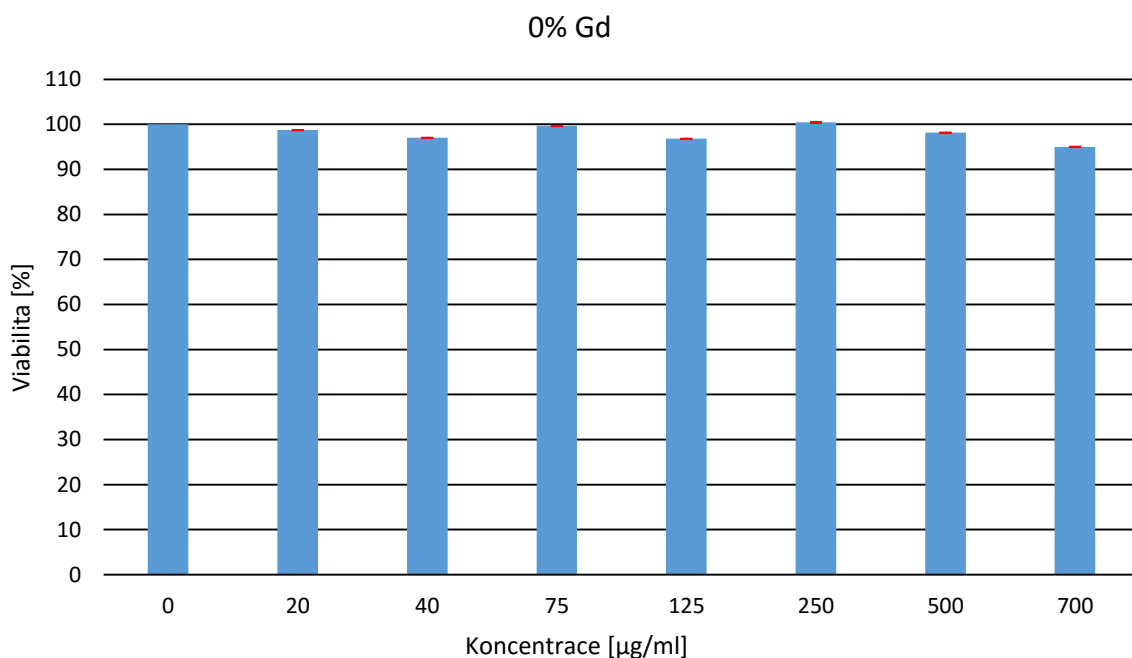
Obrázek č. 12: Graf závislosti viability na koncentraci u fibroblastů 1.

Na obrázku č. 12 můžeme porovnat hodnoty viability u dopovaných a nedopovaných nanočástic. Je zde zřetelný rozdíl. Viabilita nanočástic s gadoliniem je nižší než u nanočástic bez gadolinia.

## 11.2. DRUHÝ TEST – FIBROBLASTY

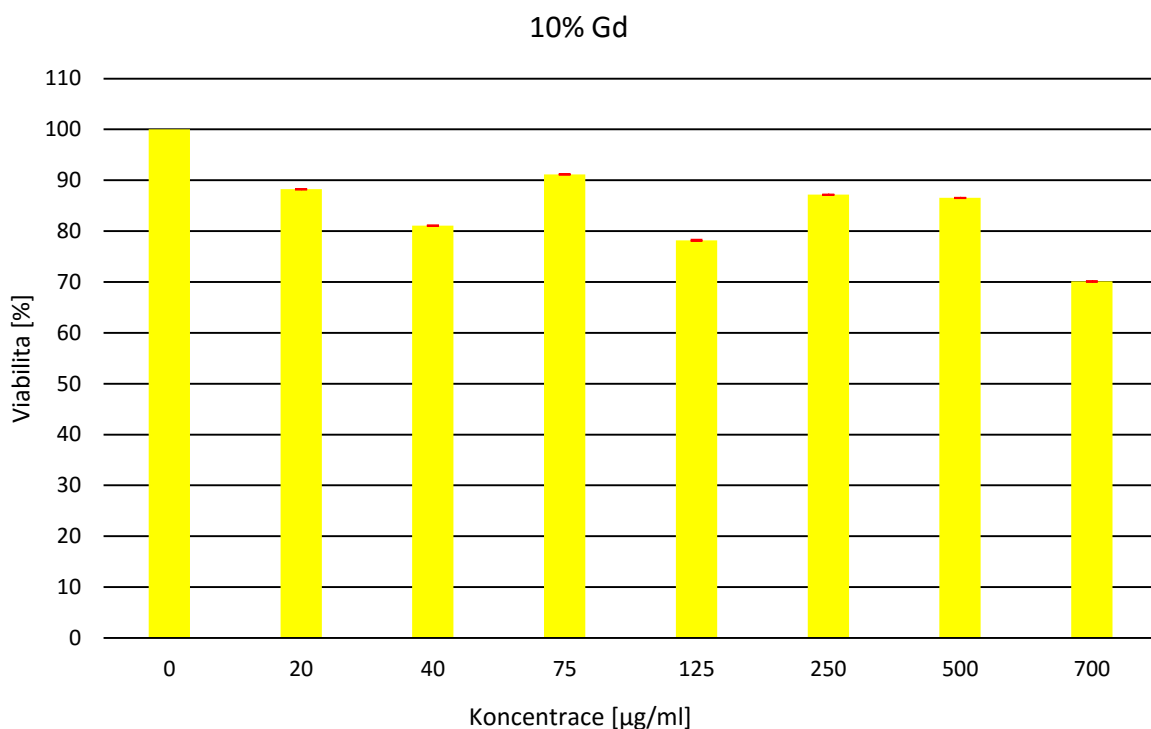
<b>koncentrace [µg/ml]</b>	0	20	40	75	125	250	500	700
<b>viabilita 0% Gd [%]</b>	100	98,746	97,000	99,672	96,813	100,410	98,133	95,004
<b>viabilita 10% Gd [%]</b>	100	88,236	81,104	91,167	78,192	87,175	86,531	70,114
<b>odchylka 0% Gd</b>	0	0,017	0,016	0,020	0,026	0,008	0,038	0,064
<b>odchylka 10% Gd</b>	0	0,017	0,069	0,057	0,107	0,030	0,033	0,017

Tabulka č. 2: Vypočítané viability pro jednotlivé vzorky s odchylkami 2.



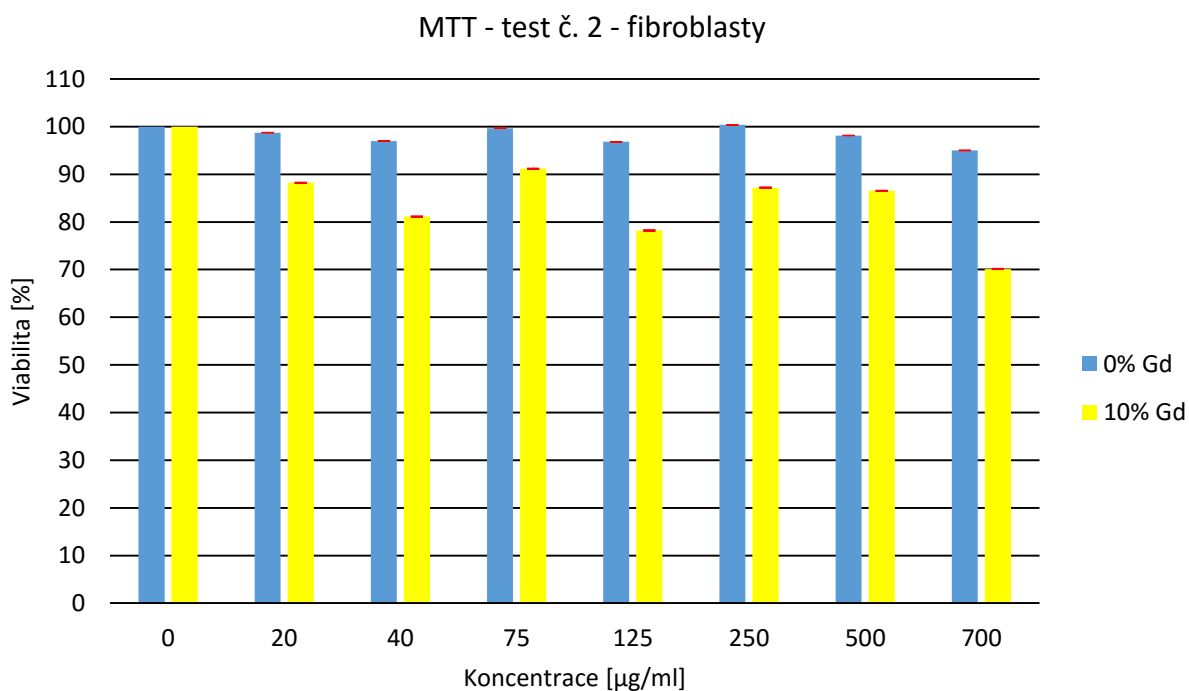
Obrázek č. 13: Graf závislosti viability na koncentraci u vzorku SPIO nanočástic s 0% obsahem Gd 2.

U druhého testu můžeme znovu pozorovat biokompatibilitu nedopovaných SPIO nanočástic. Hodnoty viability nám zde dokonce neklesnou pod 95%.



Obrázek č. 14: Graf závislosti viability na koncentraci u vzorku s 10% Gd 2.

Na obrázku č. 14 vidíme zřetelné poklesy viability. Nejnižší hodnota se nachází u nejvyšší koncentrace (700  $\mu\text{g/ml}$ ) a činí  $(70,11 \pm 0,02)\%$ .



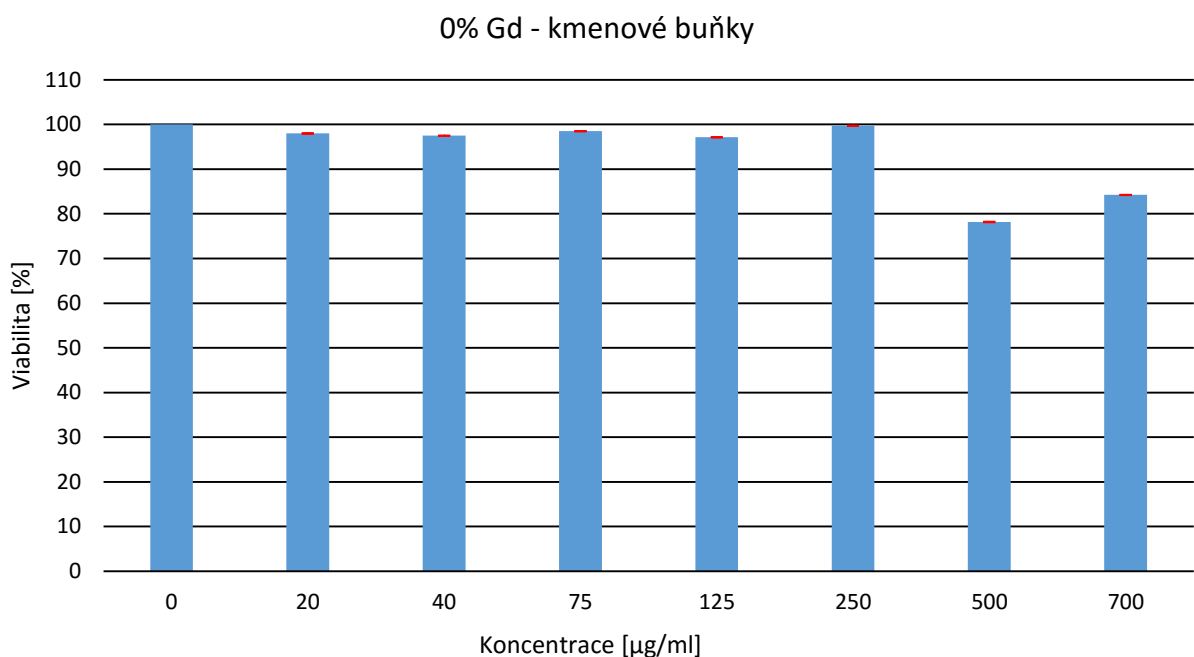
Obrázek č. 15: Graf závislosti viability na koncentraci u fibroblastů 2.

Z porovnání hodnot dopovaných a nedopovaných SPIO nanočástic vidíme, dokonce zřetelněji než u prvního testu, pokles hodnot viability u nanočástic s gadoliniem. Z toho můžeme usuzovat negativní vliv gadolinia na životaschopnost buněk.

### 11.3. TŘETÍ TEST – KMENOVÉ BUŇKY

koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	20	40	75	125	250	500	700
viabilita 0% Gd [%]	100	98,005	97,501	98,547	97,132	99,740	78,176	84,240
viabilita 5% Gd [%]	100	97,636	92,790	77,019	75,445	91,978	69,023	62,098
viabilita 10% Gd [%]	100	99,740	94,475	97,280	99,359	97,722	91,326	76,724
odchylka 0% Gd	0	0,045	0,039	0,001	0,010	0,015	0,076	0,022
odchylka 5% Gd	0	0,003	0,014	0,013	0,019	0,068	0,002	0,019
odchylka 10% Gd	0	0,022	0,000	0,019	0,021	0,003	0,019	0,098

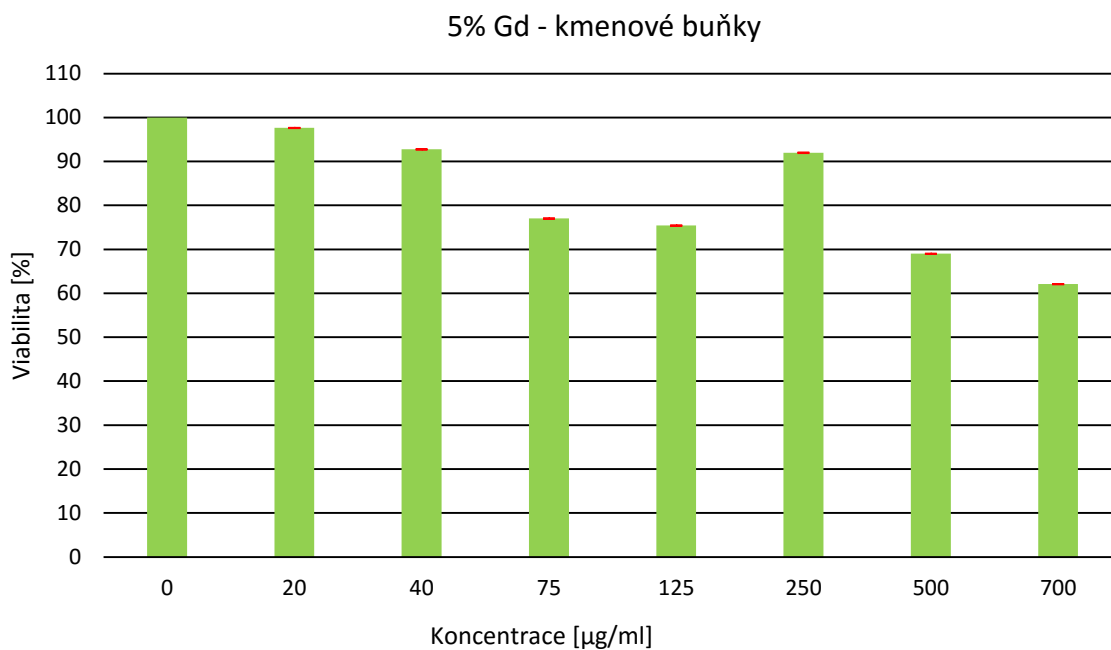
Tabulka č. 3: Vypočítané viability pro jednotlivé vzorky s odchylkami 3.



Obrázek č. 16: Graf závislosti viability na koncentraci u vzorku SPIO nanočástic s 0% obsahem Gd 3.

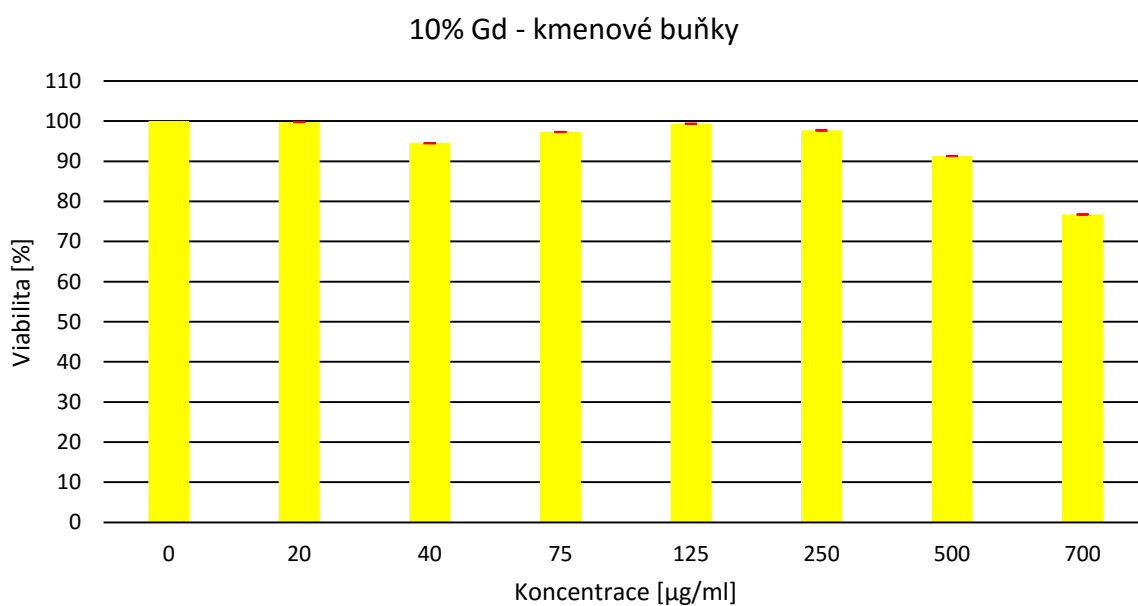
U kmenových buněk jsme zaznamenali pokles viability u vyšších hodnot koncentrace (500  $\mu\text{g/ml}$  a 700  $\mu\text{g/ml}$ ) i u nedopovaných nanočástic. Nejnižší hodnota zde je (78,18  $\pm$  0,08)%.





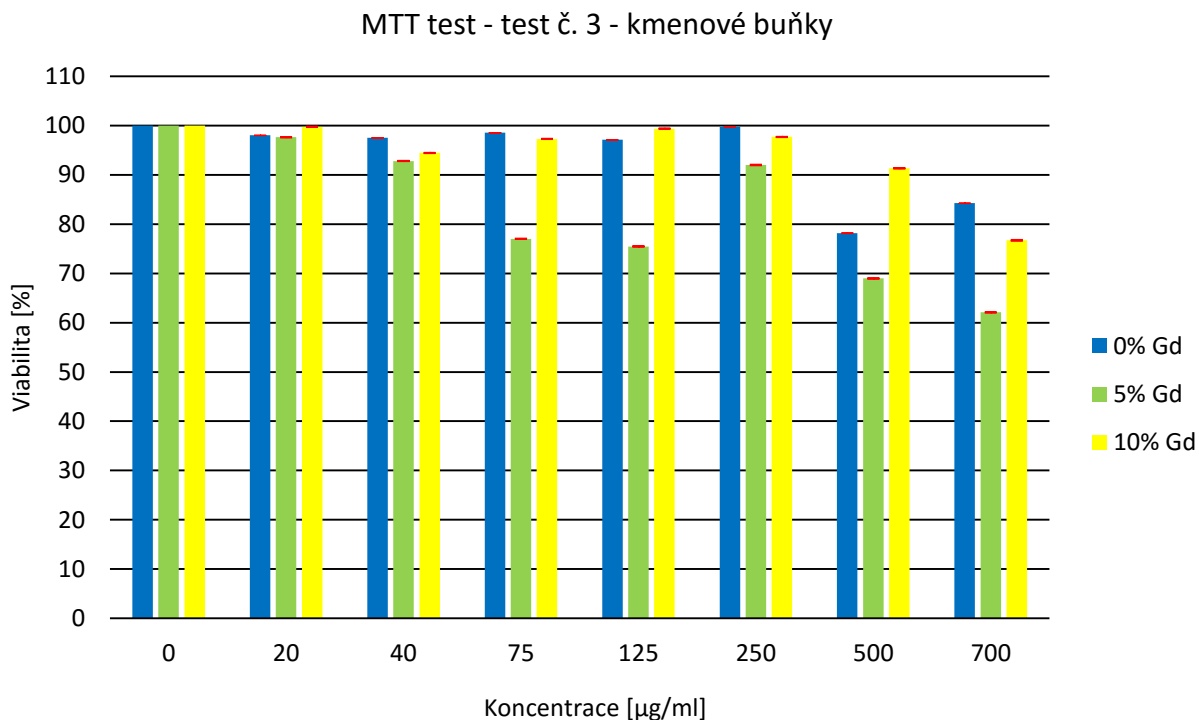
Obrázek č. 17: Graf závislosti viability na koncentraci u vzorku SPIO nanočástic s 5% obsahem Gd.

U měření se vzorky s 5% obsahem gadolinia jsme zjistili výrazný pokles životaschopnosti kmenových buněk. Nejnižší hodnota se nachází u koncentrace 700 µg/ml a činí  $(62,10 \pm 0,02)\%$ . Takto rapidní pokles můžeme pravděpodobně připsat další příměsi ve vzorku, která má negativní vliv na životaschopnost buněk.



Obrázek č. 18: Graf závislosti viability na koncentraci u vzorku s 10% Gd 3.

Zatímco u nanočástic s 5% Gd jsme pozorovali jasný pokles viability, u nanočástic s 10% Gd se viabilita pohybuje ve vyšších hodnotách. Nejnižší hodnota je u nejvyšší koncentrace a činí  $(76,7 \pm 0,1)\%$ .



Obrázek č. 19: Graf závislosti viability na koncentraci u kmenových buněk.

Při porovnání hodnot viability u 0%, 5% a 10% Gd vzorku můžeme pozorovat pokles životaschopnosti nejvýrazněji u vzorku s 5% Gd. Tato odchylka mohla být způsobena hned několika způsoby.

MTT test není stoprocentní a jeho výsledky jsou snadno ovlivnitelné vnitřním metabolismem buňky. Druhým důvodem pro odchýlení dat mohla být námi špatně provedená příprava buněk. Buňky nemusely být zcela zdravé či mohlo dojít k lehké kontaminaci během příprav. Dalším důvodem mohla být přítomnost jiných příměsí v nanočásticích - například různých fluorescenčních barviv, které sloužila k jiným experimentům. V neposlední řadě musíme zmínit chyby způsobené přístroji.

Nejvhodnějším řešením by bylo zopakování experimentu s novými vzorky. Takovou možnost jsme bohužel z důvodu časové tísně neměli.

## ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit, zda dopace nanočástic oxidů železa gadolinem má určitý vliv na jejich cytotoxicitu. Úkolem tedy bylo zkoumání procentuální viability u fibroblastů a kmenových buněk po značení nanočásticemi oxidů železa bez gadolinia a s gadolinem v různých koncentracích. To probíhalo formou MTT testu.

Naše výsledky tedy naznačují, že ani 5% či 10% Gd ve vzorku SPIO nanočástic nemá výrazný vliv na viabilitu fibroblastů. Pouze při vysokých koncentracích (700  $\mu\text{g/ml}$ ) dochází k poklesu viability o cca 30%. Tento materiál tedy můžeme považovat za biokompatibilní do koncentrace 500  $\mu\text{g/ml}$ .

Velký potenciál gadolinem dopovaných nanočástic poukazuje na to, že tomuto tématu určitě stojí za to věnovat další pozornost a pokračovat v měření, zejména zjistit, zda má dopace Gd vliv na kontrastní účinek v metodě MRI.

## ZDROJE

- [1] KAŠPAR Jaroslav. Diplomová práce: *Interakce nanočástic oxidů železa s doxorubicinem*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2015.
- [2] LIU Yongjun, NA Zhang. Gadolinium loaded nanoparticles in theranostic magnetic resonance imaging, *Elsevier: Biomaterials* 33, 2012, 5363-5375.
- [3] KOLÁŘOVÁ Lucie. *Úvod do nanovědy a nanotechnologií*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4179-5.
- [4] FILIPOVÁ Zuzana, KUKUTSCHOVÁ Jana, MAŠLÁŇ Miroslav. *Rizika nanomateriálů*. 1. vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [5] ISO Standard 80004-4: Nanotechnologies – Vocabulary – Part 4: Nanostructured materials. International Organisation for Standardisation, Geneva, Švýcarsko (2011).
- [6] Doporučení komise ze dne 18. října 2011 o definici nanomateriálu 2011/696/EU, 2011. Dostupné na:  
[http://www.sgpstandard.cz/editor/files/on\\_line/reach/demo/reach/nano.pdf](http://www.sgpstandard.cz/editor/files/on_line/reach/demo/reach/nano.pdf)
- [7] DOHNALOVÁ Lucie, DOHNAL Vlastimil. *Nanočástice a jejich toxicita*. Chemické listy 109, 444-450, 2015.
- [8] TUČEK Jiří. Habilitační práce: *Nanometrické polymorfy oxidu železitého, jejich magnetické vlastnosti a aplikační potenciál*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2012.
- [9] SVATÁKOVÁ Markéta. Diplomová práce: *In vitro studie mezenchymálních kmenových buněk značených magnetickými nanočásticemi*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2012.
- [10] 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.
- [11] TUČEK Jiří. Disertační práce: *Magnetismus nanočástic oxidů železa a dvojného perovskitu typu  $Sr_2FeRuO_6$* . Olomouc: Univerzita Palackého, 2008.
- [12] NEČAS Oldřich. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., V nakl. H & H 1. vyd. Jinočany: H & H, 2000. ISBN 80-86022-46-3.
- [13] STARK Wendelin J. *Nanoparticles in biological systems*. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 50(6):1242–58, February 2011.
- [14] KOLÁŘOVÁ Mary. Diplomová práce: *Optimalizace značení kmenových a fibroblastických buněk superparamagnetickými nanočásticemi oxidů železa*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2013.
- [15] VILLARREAL, Mariana Ruiz. *Endocytosis types.svg* [online], 2007, cit. 18. 8. 2016. Dostupný na: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AEndocytosis\\_types.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AEndocytosis_types.svg)

- [16] KOVÁRNÍKOVÁ Markéta. Bakalářská práce: *Detekce živých a mrtvých buněk*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012.
- [17] XIAO Ning, GU Wei, WANG Hao, DENG Yunlong, SHI Xin, YE Ling. T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> dual-modal MRI of brain gliomas using PEGylated Gd-doped iron oxide nanoparticles, *Elsevier: Journal of Colloid and Interface Science* 417, 2014, 159-165.
- [18] YANG Meicheng, GAO Lipeng, LIU Kai, LUO Chunhua, WANG Yiting, YU Lei, PENG Hui, ZHANG Wen. Characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/Gd<sub>2</sub>O(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> core/shell/shell nanoparticles as T1 and T2 dual mode MRI contrast agent. *Elsevier: Talanta* 31, 2015, 661-665.
- [19] LIU Yongjun, CHEN Zhijin, LIU Chunxi, YU Dexin, LU Zaijun, NA Zhang. Gadolinium-loaded polymeric nanoparticles modified with Anti-VEGF as multifunctional MRI contrast agents for the diagnosis of liver cancer. *Elsevier: Biomaterials* 32, 2011, 5167- 5176.