

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI



---

Přírodovědecká  
fakulta

Katedra fyzikální chemie

**VÝVOJ SYSTÉMU PRO CÍLENÉ MULTIMODÁLNÍ  
BIOLOGICKÉ ZOBRAZOVÁNÍ ZALOŽENÉHO  
NA NANOČÁSTICÍCH OXIDŮ ŽELEZA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: Aneta Frydrychová

Studijní obor: Nanomateriálová chemie

Vedoucí práce: Mgr. Jan Belza

Konzultantka: Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.

**Olomouc 2020**

# BIBLOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

- Autor:** Aneta Frydrychová
- Název práce:** Vývoj systému pro cílené multimodální biologické zobrazování založeného na nanočásticích oxidů železa
- Typ práce:** Bakalářská
- Pracoviště:** Katedra fyzikální chemie a Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Univerzita Palackého v Olomouci
- Vedoucí práce:** Mgr. Jan Belza
- Rok obhajoby práce:** 2020
- Abstrakt:** Nanočástice oxidů železa jsou již řadu let intenzivně zkoumány pro své unikátní vlastnosti, které je předurčují k využití v biomedicíně, zejména jako kontrastních látek pro zobrazování magnetickou rezonancí nebo k léčbě rakoviny pomocí hypertermie. Tato bakalářská práce přináší přehled o jejich nejdůležitějších vlastnostech, možnostech přípravy a modifikacích. Cílem práce je samotná příprava a charakterizace nanočástic oxidů železa a jejich povrchová modifikace prostřednictvím polymerů obsahujících funkční skupiny, které mohou umožnit vazbu fluorescenční protilátky pro cílené zobrazování nádorových tkání. Součástí práce je také cytotoxicitní studie na dvou buněčných liniích, jejíž výsledky dosvědčují skvělou biokompatibilitu těchto částic. Připravené nanočástice jsou potenciálně použitelné jako multimodální sonda pro cílené biologické zobrazování.
- Klíčová slova:** nanočástice oxidů železa, polymery, protilátka, povrchová modifikace, cílené zobrazování, cytotoxicita
- Počet stránek:** 69
- Jazyk:** Čeština

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

- Author:** Aneta Frydrychová
- Title:** Development of targeted multimodal bioimaging tool based on iron oxide nanoparticles
- Type of thesis:** Bachelor
- Department:** Department of Physical Chemistry and Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Palacký University Olomouc
- Supervisor:** Mgr. Jan Belza
- The year of presentation:** 2020
- Abstract:** Over the past decades the iron oxide nanoparticles have been intensively studied for their unique properties which predispose them for use in biomedicine, especially as contrast agents for magnetic resonance imaging or for the hyperthermia cancer treatment. This bachelor thesis provides an overview of their most important properties, preparation options and their surface modification. The aim of this thesis is then a preparation and characterization of the iron oxide nanoparticles and their surface modification by using polymers containing functional groups that allow binding of a fluorescent antibody for a targeted imaging of a tumor tissue. Part of the thesis is a cytotoxic study accomplished on two cell lines. Its results confirmed an excellent biocompatibility of synthesized particles. Thus, these polymer coated biocompatible nanoparticles are a potential multimodal tool for targeted biological imaging.
- Keywords:** iron oxide nanoparticles, polymers, antibody, surface modification, targeted bioimaging, cytotoxicity
- Number of pages:** 69
- Language:** Czech

*Prohlášení:*

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jana Belzy s využitím informačních zdrojů, které jsou řádně citovány.

V Olomouci dne .....

.....  
Aneta Frydrychová

### *Poděkování:*

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu této bakalářské práce Mgr. Janu Belzovi za skvělou spolupráci, velkou pomoc s experimenty a jejich vyhodnocováním a za veškerý čas, který mi věnoval. Dále děkuji konzultantce Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D. za cenné rady a připomínky. V neposlední řadě patří dík pracovnícím RCPTM za snímky z elektronových mikroskopů.

Také chci moc poděkovat své rodině za obrovskou podporu a toleranci (nejen) během celého studia; bez Vás by tato práce nevznikla.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>NANOČÁSTICE OXIDŮ ŽELEZA</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Příprava nanočástic oxidů železa</b>	<b>15</b>
2.1.1	Koprecipitace	15
2.1.2	Mikroemulzní syntéza	17
2.1.3	Tepelný rozklad	18
<b>2.2</b>	<b>Metody charakterizace</b>	<b>19</b>
2.2.1	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	20
2.2.2	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	20
2.2.3	Dynamický rozptyl světla (DLS)	21
2.2.4	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR)	23
<b>2.3</b>	<b>Modifikace IONPs</b>	<b>24</b>
2.3.1	Alginát	25
2.3.2	Polyethylenglykol a jeho deriváty	26
<b>2.4</b>	<b>Využití v biologii a medicíně</b>	<b>28</b>
2.4.1	Magnetická separace	28
2.4.2	Cílené doručování léčiv	29
2.4.3	Hypertermie	30
2.4.4	Zobrazování magnetickou rezonancí	31
<b>3</b>	<b>MOTIVACE</b>	<b>33</b>
	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b>	<b>36</b>

<b>5</b>	<b>MATERIÁLY A METODY</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Materiály</b>	<b>37</b>
5.1.1	Chemikálie	37
5.1.2	Roztoky a média	37
5.1.3	Přístroje	38
5.1.4	Biologický materiál	38
<b>5.2</b>	<b>Metody</b>	<b>39</b>
5.2.1	Syntéza MagAlg částic	39
5.2.2	PEGylace	39
5.2.3	Ferrozinová metoda – stanovení koncentrace železa	41
5.2.4	DLS a zeta-potenciál	41
5.2.5	FT-IR spektrometrie	41
5.2.6	Kultivační podmínky a pasážování	42
5.2.7	Průtoková cytometrie	43
5.2.8	Měření ROS	44
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>45</b>
<b>6.1</b>	<b>Fyzikálně-chemická charakterizace částic</b>	<b>45</b>
6.1.1	Elektronová mikroskopie	45
6.1.2	DLS analýza	48
6.1.3	FT-IR analýza	51
<b>6.2</b>	<b>Výsledky biologických testů</b>	<b>52</b>
6.2.1	Měření viability	52
6.2.2	Analýza buněčného cyklu	54
6.2.3	Vznik reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)	56
6.2.4	Optická mikroskopie	57
<b>7</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>63</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>65</b>
	<b>REFERENCE</b>	<b>66</b>

# 1 ÚVOD

Desetmilionkrát menší než mravenec, jedna miliardtina metru neboli 1 nanometr, taková je velikost nejmenší nanočástice. Podle definice je její největší rozměr 100 nm, což odpovídá desettisíckrát zmenšené špendlíkové hlavičce. Tyto objekty mají díky své velikosti jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti, které je předurčují k aplikacím v celé škále oborů od katalýzy, elektroniky a optiky, přes ochranné nátěry na fasádách, k čištění vod až ke kontrastním látkám pro magnetickou rezonanci.

Ačkoliv veškeré produkty a technologie s předponou „nano-“ získaly pozornost teprve nedávno, nanočástice už však mají značně dlouhou historii. Již starověký pigment, egyptská modř, obsahoval nanočástice křemičitanů. Z období Římské říše jsou známé Lykurgovy poháry, které díky nanočásticím zlata a stříbra vykazují zvláštní barevné efekty. Kovové nanočástice mají zkrátka mimořádné schopnosti barvit sklo, toho jsou důkazem i středověké vitráže nebo lesk glazované keramiky ze 13. – 16. století.<sup>1</sup>

Dnes se nanočástice kovů a jejich oxidů využívají nejen pro své optické vlastnosti. Nanočástice nulamocného železa (nZVI) se svými redukčními schopnostmi nabízí pomoc při odstraňování polutantů z půd i podzemních vod. Železo vytváří také nanočástice svých oxidů (IONPs), které jsou zase jedny z nejkoumanějších materiálů v oblasti biomedicíny, včetně léčby rakoviny. A právě o jejich inovativních vlastnostech, možnostech přípravy a využití pojednává tato bakalářská práce. Experimentální část se poté zabývá vlastní syntézou, modifikací a charakterizací nanočástic oxidů železa a zkoumá jejich cytotoxicitu na savčích buňkách.



# TEORETICKÁ ČÁST

## 2 NANOČÁSTICE OXIDŮ ŽELEZA

Nanočástice (NPs) získávají díky své velikosti pod 100 nm unikátní vlastnosti. U magnetických nanočástic (MNPs) se projevují například jako superparamagnetismus, jednodomérovost a vysoká magnetická susceptibilita, což je předurčuje k aplikacím v celé řadě oborů.<sup>2</sup> V současnosti patří MNPs mezi nejvíce zkoumané a využívané materiály v bioaplikacích včetně magnetické bioseparace, klinické diagnózy (jako je MRI) a terapie, cíleného doručování léčiv či hypertermie. Z magnetických nanočástic mají v této oblasti největší využití nanočástice oxidů železa (IONPs), a to především biokompatibilní magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) a maghemit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), jejichž aplikace v *in vitro* diagnostice se praktikuje už téměř půl století.<sup>3</sup>

Železo tvoří celkem 6 známých oxidů, ve kterých vystupuje jako:

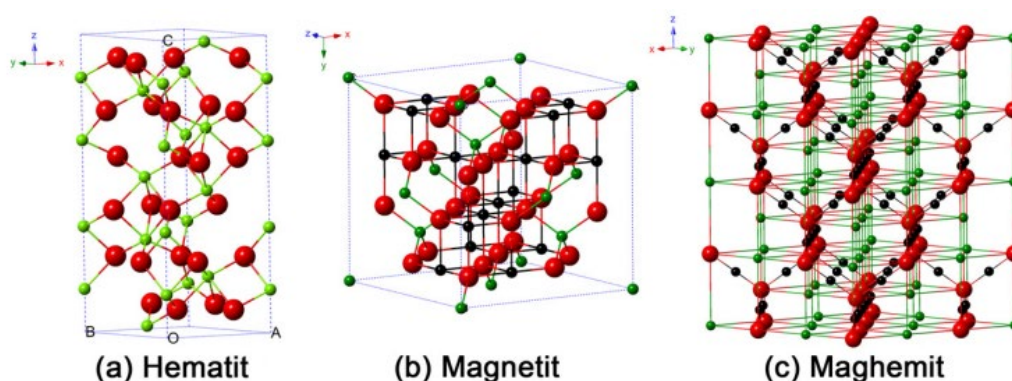
- dvojmocné Fe (II) – wüstit  $\text{FeO}$
- trojmocné Fe (III) –  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , který má 4 polymorfy s výrazně odlišnými strukturálními i magnetickými vlastnostmi: v přírodě vyskytující se minerály hematit  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a maghemit  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , zbývající formy  $\beta$ - a  $\varepsilon$ - jsou známy pouze jako syntetické nanočástice<sup>4</sup>
- dvojmocné i trojmocné Fe (II, III) – magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Tři z těchto oxidů, hematit, magnetit a maghemit, mají jedinečné biochemické, magnetické, katalytické a jiné vlastnosti, které je předurčují pro specifické technické a biomedicínské aplikace.<sup>5</sup>

Hematit,  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , je nestabilnější oxid železa. Jak je znázorněno na Obr. 1a, jeho symetrie je trigonální, ionty  $\text{Fe}^{3+}$  zabírají dvě třetiny oktaedrických pozic, které jsou omezené hexagonální těsně uspořádanou mřížkou kyslíkových aniontů. Při pokojové teplotě je antiferomagnetický.<sup>6</sup>

Magnetit,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , se liší od ostatních oxidů obsahem jak  $\text{Fe}^{2+}$ , tak i  $\text{Fe}^{3+}$  iontů. Má kubickou inverzní spinelovou strukturu skládající se z kubické těsně uspořádané mřížky iontů kyslíku, ve které všechny dvojmocné ionty obsazují polovinu oktaedrických pozic a  $\text{Fe}^{3+}$  ionty jsou rovnoměrně rozmístěné ve zbývajících oktaedrických a tetraedrických pozicích.<sup>6</sup> (Obr. 1b)

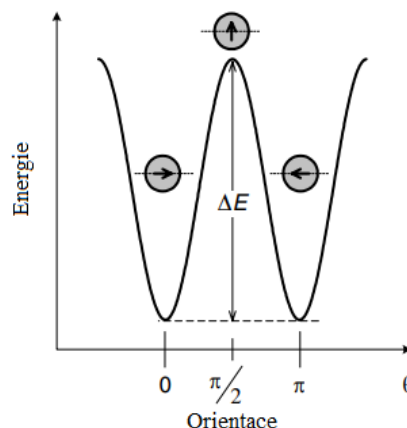
Maghemit,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , vzniká oxidací magnetitu, má podobnou strukturu (Obr. 1c) a oba mají ferimagnetické vlastnosti. Atomy kyslíku tvoří kubickou těsně upořádanou mřížku a železité ionty pak obsazují tetraedrické i oktaedrické pozice. Krystalová struktura obsahuje také vakance v oktaedrických pozicích kompenzující zvýšený kladný náboj.<sup>4</sup>



**Obr. 1:** Krystalová struktura hematitu, magnetitu a maghemitu. Černé kuličky představují ionty  $\text{Fe}^{2+}$ , zelené  $\text{Fe}^{3+}$  a červené  $\text{O}^{2-}$ . Upraveno podle Wu, W. et al. (2015).<sup>5</sup>

Nanočástice tvořené těmito oxidy vykazují zvláštní magnetickou vlastnost, známou jako superparamagnetismus, vyskytující se pouze u jednodoménových částic pod kritickou velikostí, pro IONPs zpravidla pod 15 nm při pokojové teplotě.<sup>5</sup>

U jednodoménových částic míří magnetické momenty všech atomů v jednom směru, podél snadné osy, a kooperují přes celou částici. Orientace magnetizace ve směru snadné osy je energeticky výhodná a anizotropní energie tak dosahuje minimálních hodnot, svého maxima nabývá mezi dílčími snadnými směry. Aby došlo k překlopení magnetizace v nulovém magnetickém poli z jednoho snadného směru do druhého, musí částice překonat energetickou bariéru,  $\Delta E = KV$ , danou objemem částice. (Obr. 2)

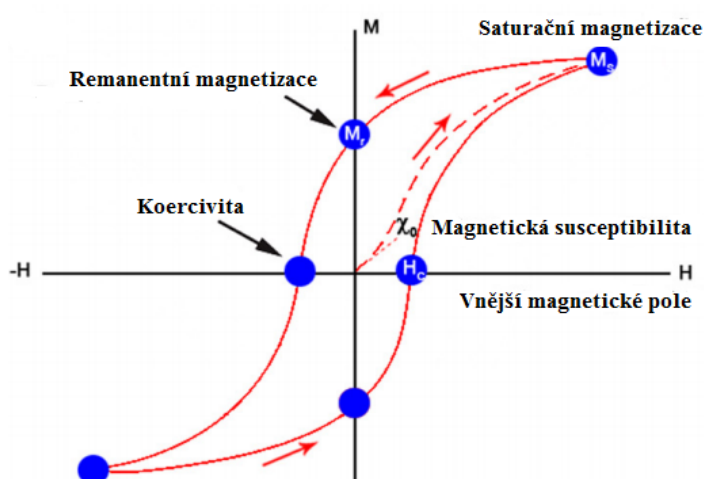


**Obr. 2:** Energie spojená s překlopením směru magnetizace pro jednoosou magnetickou částici. Minima energie odpovídají magnetizaci orientované podél snadné osy (znázorněná čárkovaně). Upraveno podle Schmid, G. (2003).<sup>7</sup>

Při zmenšování částic se tedy zmenšuje i velikost  $\Delta E$ , která může nabýt hodnoty srovnatelné s termální energií  $k_B T$ , kde  $k_B$  je Boltzmannova konstanta. V tomto případě už nemůže energetická bariéra udržovat směr

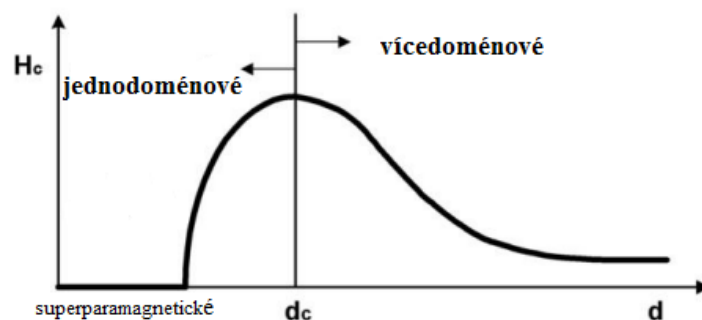
magnetizace a rotace jejího směru nastává v důsledku teplotních fluktuací magnetického momentu jednodoménové částice. Taková částice se stává superparamagnetickou.<sup>7</sup>

K popisu chování feromagnetických látek v přítomnosti vnějšího magnetického pole slouží hysterezní křivka. Je to vyjádření závislosti magnetizace materiálu  $M$  na indukci magnetického pole  $H$  (Obr. 3). Po vložení nemagnetizovaného materiálu do magnetického pole dojde k magnetizaci po tzv. křivce prvotní magnetizace (na obrázku naznačena čárkovaně) až k maximální hodnotě do bodu nasycení  $M_s$ . Jakmile dojde k odstranění magnetického pole, dostaneme se do bodu  $M_r$  – feromagnetické materiály vykazují zbytkovou magnetizaci i při nulovém magnetickém poli. Aby došlo ke snížení hodnoty magnetizace na nulu, musíme na materiál působit opačným magnetickým polem, tato síla se nazývá koercivita  $H_c$ . Dalším působením magnetického pole dojde ke zmagnetizování, ale s opačnou orientací. Po opětovné demagnetizaci materiálu získáme celou hysterezní smyčku.<sup>8</sup>



**Obr. 3:** Schematické zobrazení hysterezní smyčky pro IONPs. Upraveno podle Wu, W. et al. (2015).<sup>5</sup>

Jak je vidět na Obr. 4, koercivita magnetické částice výrazně závisí na její velikosti. Pro částice s vícedoménovou strukturou je koercivita nízká, protože k obrácení směru magnetizace dochází relativně snadno prostřednictvím pohybu stěn domény. U jednodoménových částic je tato změna vyvolaná pouze koherentní rotací spinů, což má za následek vysokou koercivitu. Při dalším zmenšování velikosti částic koercivita klesá kvůli rostoucímu vlivu teplotních fluktuací, to vede až k superparamagnetismu s nulovou koercivitou.<sup>9</sup>



**Obr. 4:** Závislost koercivity  $H_c$  na velikosti částice  $d$ . Největší koercivita je pozorovaná při velikosti  $d_c$  odpovídající přechodu částice z vícedoménové struktury na jednodoménovou. Upraveno podle Schmid, G. (2003).<sup>7</sup>

Hysterezní smyčka superparamagnetických látek tedy nevykazuje žádnou hysterezi; po odstranění magnetického pole nemají žádnou remanentní magnetizaci, koercivita je tudíž nulová a křivky magnetizace se překrývají.<sup>10</sup>

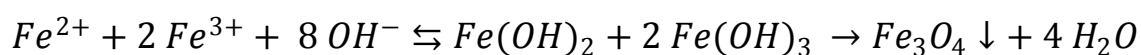
## 2.1 Příprava nanočástic oxidů železa

Tématem syntézy nanočástic oxidů železa se vědecká komunita intenzivně věnuje už několik desítek let. Mnohé postupy již byly optimalizovány natolik, že vedou k tvorbě stabilních, biokompatibilních a monodisperzních nanočástic požadované velikosti. Mezi nejběžnější metody patří koprecipitace, tepelný rozklad, hydrotermální a sonochemické syntézy a také syntéza v reverzních micelách. IONPs mohou být připraveny i elektrochemicky, laserovou pyrolýzou nebo magnetotaktickými bakteriemi.<sup>11</sup>

Alkalická koprecipitace, syntéza v reverzních micelách a tepelný rozklad organokovových prekurzorů patří mezi metody přípravy IONPs, které splňují požadavky pro jejich použití v biomedicínských aplikacích.<sup>12</sup> Tyto metody budou v následujícím přehledu podrobněji popsány.

### 2.1.1 Koprecipitace

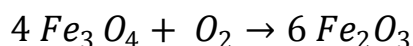
Jednou z nejstarších a nejběžnějších metod přípravy magnetitových a maghemitových nanočástic je alkalická koprecipitace. Metoda spočívá ve společném vysrážení železnatých a železitých hydroxidů přidáním báze (obvykle NaOH nebo NH<sub>4</sub>OH) do roztoku Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> solí v molárním poměru 1:2.<sup>13</sup> Reakční mechanismus lze zapsat jako:



Velikost, tvar a složení nanočástic závisí na typu použité soli (např. chlorid, síran, dusičnan), poměru Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>, reakční teplotě, pH a iontové síle

média.<sup>14</sup> S nárůstem hodnoty pH a iontové síly precipitačního roztoku klesá velikost částice. Oba tyto parametry mají také vliv na složení i náboj povrchu.<sup>12</sup> Jakmile dojde k stanovení těchto podmínek, syntéza magnetitových nanočástic je plně reprodukovatelná.

Nicméně nanočástice magnetitu nejsou za okolních podmínek příliš stabilní, rozpouští se v acidickém prostředí a snadno oxidují na  $Fe_2O_3$ .<sup>5</sup>



Na základě této skutečnosti proto bývají záměrně vystaveny oxidaci a použity k přípravě maghemitových nanočástic, které jsou pak chemicky stabilní v bazickém i kyselém prostředí.<sup>15</sup>

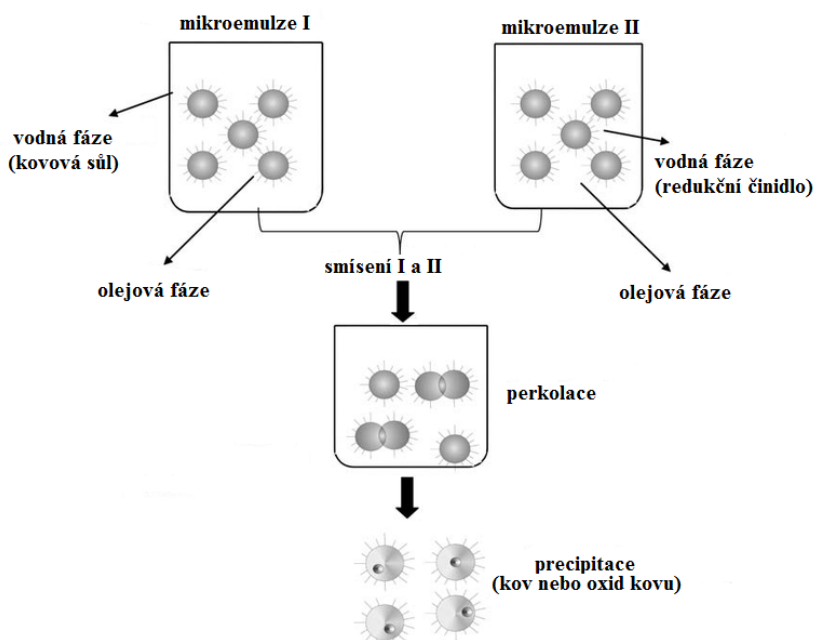
Částice připravené koprecipitací většinou mívají širokou velikostní distribuci. Přidáním povrchově aktivní látky, jako je polyethylenglykol (PEG) nebo dextran, do reakčního média lze získat nanočástice monodisperzní. Surfaktant může být také přidán až v následujícím kroku po syntéze. Tyto látky stabilizují vzniklou koloidní disperzi a brání shlukování částic.<sup>16</sup>



## 2.1.2 Mikroemulzní syntéza

Mikroemulze je definována jako termodynamicky stabilní izotropní disperze dvou nemísitelných kapalin. V mikroemulzi typu voda-olej (reverzní micela) jsou jemné kapičky vodné fáze (obvykle 1 – 50 nm v průměru) obklopené monovrstvou molekuly povrchově aktivní látky rozptýlené v kontinuální fázi oleje.<sup>17</sup> Velikost micely lze upravovat v závislosti na molárním poměru voda/surfaktant/olej.<sup>18</sup>

Micela, která má uvnitř rozpuštěnou sůl železa, může být použita jako „nanoreaktor“ pro tvorbu těchto nanočástic. Smísením dvou typů micel, jedné s obsahem kovových iontů (nejčastěji  $\text{FeCl}_2$ ), druhé s redukčním činidlem (např.  $\text{NaBH}_4$ ), dojde k jejich vzájemnému srážení za vytvoření sraženiny. Přidáním rozpouštědla, jako je aceton nebo ethanol, se sraženina vyextrahuje.<sup>3</sup> Celý proces je zachycen na Obr. 5.



**Obr. 5:** Schematické znázornění syntézy nanočástic v reverzních micelách. Upraveno podle Eslamian, M. & Shekarriz, M. (2009).<sup>19</sup>

V porovnání s koprecipitací ve vodné fázi má tvorba NPs v mikroemulzi určité výhody díky malé velikosti micel, která omezuje průběh reakce a zabraňuje aglomeraci částic. Tato metoda má však i nevýhody, a to zejména ve velikostní distribuci připravených částic, která je úzká jen pro částice pod 10 nm.<sup>12</sup>

### 2.1.3 Tepelný rozklad

Monodisperzní nanočástice s dobrou krystalinitou mohou být připraveny termickým rozkladem organometalických sloučenin v přítomnosti horkého organického rozpouštědla obsahujícího stabilizující povrchově aktivní látky.<sup>20</sup> Mezi nejběžnější prekurzory patří karbonyl, acetát, acetoacetát, kupferronát a chlorid železa. Jako rozpouštědlo s vysokou teplotou varu se nejčastěji používá oktylether nebo dichlorbenzen, stabilizační funkci zastávají mastné kyseliny a aminy.<sup>21</sup> Množství a druh použitých reaktantů, stejně jako teplota a čas reakce, ovlivňují velikost a morfologii vznikajících nanočástic.

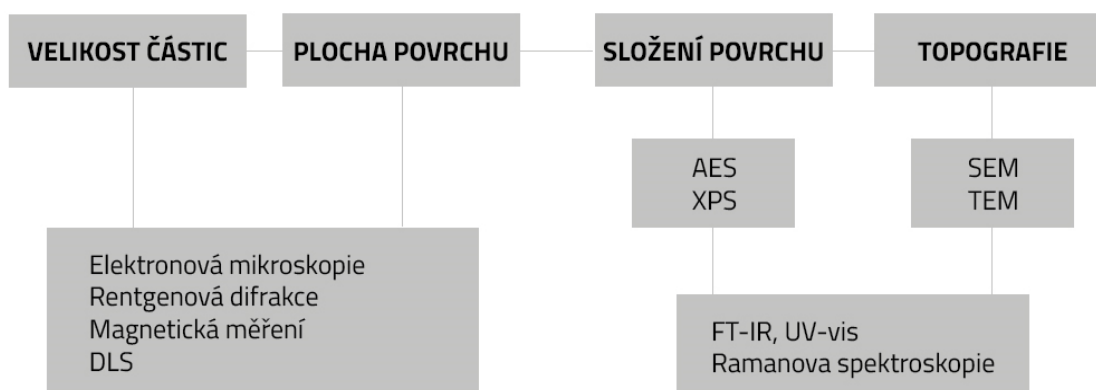
V případě karbonylu, kde je Fe v oxidačním stavu 0, vede jeho termický rozklad k tvorbě amorfních nanočástic.<sup>14</sup> Takové částice lze pak snadno zoxidovat vzduchem na  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs nebo je lze generovat přímo přidáním mírného oxidačního činidla (např. trimethylamin oxid) do reakční směsi. Rozklad ostatních prekurzorů s kationtovým železem vede přímo k tvorbě nanočástic oxidů železa.<sup>22</sup>

Tepelným rozkladem se dají připravit vysoce monodisperzní nanočástice s úzkou velikostní distribucí, ale i tak má tato metoda několik nevýhod. Protože mastné kyseliny a aminy použité jako stabilizátory vedou ke vzniku hydrofobních nanočástic, je nutné jejich povrch modifikovat.

Dalším problémem je použití toxických rozpouštědel, která mohou snižovat biokompatibilitu nanočástic.<sup>12</sup>

## 2.2 Metody charakterizace

Magnetické i biologické chování IONPs je ovlivněno velikostí, tvarem, mikrostrukturou, polydisperzitou, ale i povrchem a jeho nábojem. K určení těchto parametrů existuje celá řada fyzikálně-chemických metod, nejběžnější z nich shrnuje Obr. 6.



**Obr. 6:** Nejběžnější fyzikálně-chemické metody k charakterizaci IONPs.

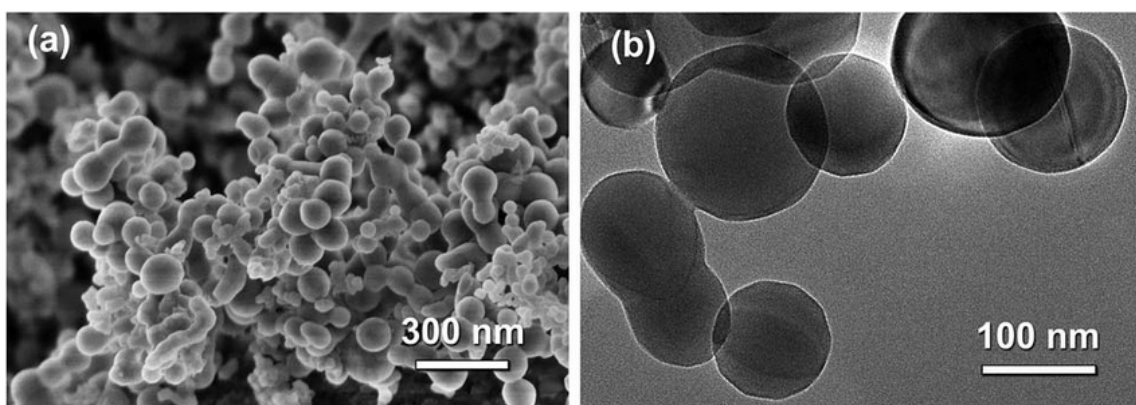
V následujícím výčtu budou popsány pouze metody charakterizace nanočástic použité v rámci experimentální části této práce.

### 2.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie je metoda, která poskytuje informace o topografii a chemickém složení vzorku. Podstatou je dopad elektronového svazku na povrch vzorku a následná emise rentgenového záření, sekundárních a zpětně odražených elektronů, které jsou shromažďovány scintilačním detektorem připojeným k fotonásobiči a poté jsou převedeny na digitální signál tvořící konečný 3D obraz. Sekundární elektrony pocházejí z atomů v blízkosti povrchu (jednotky nm), proto jejich detekce vede k získání topografického obrazu. Zpětně odražené elektrony jsou emitovány z větší hloubky a poskytují tak informace o změně složení.<sup>23</sup>

### 2.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Podstatou zobrazování pomocí TEM je také interakce elektronů s povrchem vzorku, ale u této metody dochází k průchodu elektronového svazku vzorkem. Z vytvořeného 2D obrazu lze získat představu o vnitřní struktuře, velikosti nebo tvaru částic.<sup>23</sup> (Obr. 7)

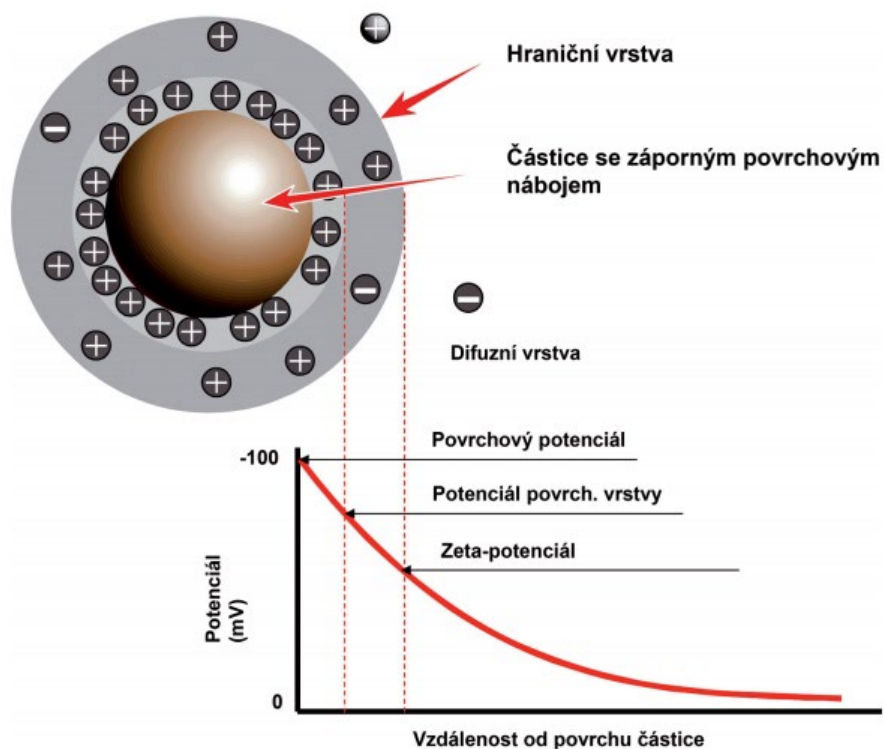


**Obr. 7:** Zobrazení Si nanočástic pomocí (a) SEM a (b) TEM. Převzato z Shao, D. et al. (2017).<sup>24</sup>

### 2.2.3 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla je jednou z nejběžnějších metod k určení velikosti a koloidní stability MNPs se sférickou nebo anizotropní strukturou. Během DLS měření je suspenze nanočástic vystavena laserovému paprsku. Po jeho interakci s částicemi dochází k rozptylu a následné interferenci záření. Protože částice neustále vykonávají Brownův pohyb, dochází ke změnám intenzity dopadajícího záření; tyto změny tedy nesou informaci o náhodném pohybu částic, a to vede k měření difúzního koeficientu, který je použit pro výpočet hydrodynamického poloměru částice.<sup>25</sup>

Jedním z ukazatelů stability koloidních soustav je zeta-potenciál. Opačně nabitě ionty kapaliny a povrchu částice v ní dispergované tvoří elektrickou dvojvrstvu. Jak znázorňuje Obr. 8, elektrická dvojvrstva je složena z vnitřní a difúzní vrstvy. Ionty vnitřní vrstvy se pohybují společně s částicí, difúzní vrstva se pohybuje nezávisle na ní. Na jejich rozhraní, tzv. hranici skluzu, vzniká zeta-potenciál.<sup>26</sup>



**Obr. 8:** Znárodnění elektrické dvojvrstvy a zeta-potenciálu. Převezato z Polčík, M. (2010).<sup>26</sup>

Hodnota zeta-potenciálu může předpovědět stabilitu disperze; částice s vysokým zeta-potenciálem se budou odpuzovat, naopak částice s nízkým zeta-potenciálem mají tendenci k tvorbě shluků. Obecně se za koloidně stabilní částice považuje systém, jehož hodnota zeta-potenciálu je větší než  $\pm 30$  mV.<sup>26</sup> Stabilní disperzi však mohou tvořit i částice se zeta-potenciálem  $\pm 0$  mV díky sterické stabilizaci některými makromolekulami či povrchově aktivními látkami. Zeta-potenciál je ovlivnitelný řadou faktorů, nejdůležitějším je však pH.<sup>27</sup>

Samotné měření je založeno na aplikaci elektrického pole na disperzi nanočástic. Tím dojde k pohybu nabitých částic k elektrodě s opačným nábojem. Rychlost tohoto pohyb je měřena a na jejím základě je určen výsledný zeta-potenciál.<sup>27</sup>

## 2.2.4 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR)

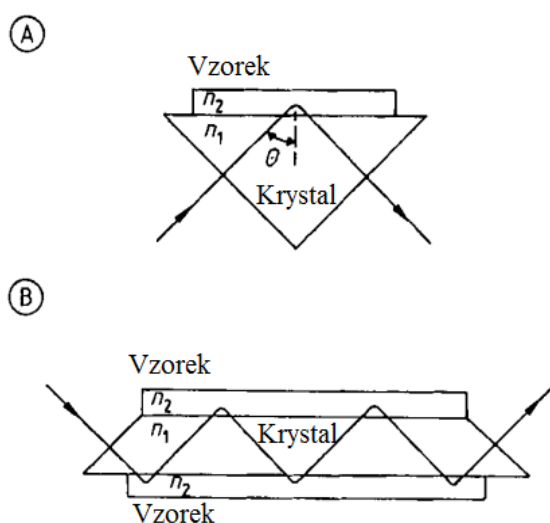
Infračervená spektroskopie je analytická technika, která umožňuje charakterizaci a identifikaci struktur molekul. Při průchodu infračerveného záření vzorkem dochází k jeho absorpci, a to vyvolá změnu vibračního stavu molekuly. Změny vibrací jsou zaznamenány a převedeny na IR-spektrum, které udává závislost absorbance na vlnočtu tohoto záření.

V IR-spektru lze poté rozlišit oblast charakteristických vibrací, odpovídající vlnočtu  $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ , která se využívá k identifikaci funkčních skupin v molekule a oblast otisku prstu ( $1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$ ) charakteristickou pro konkrétní molekulu.<sup>28</sup>

U FT-IR techniky záření nejprve dopadá na interferometr, kde je rozděleno na dva paprsky; jeden z nich je odražen na pevné a druhý na pohyblivé zrcadlo. Poté dochází k interferenci tohoto záření, tvoří se interferogram a z něj je pomocí Fourierovy transformace vypočítáno konečné IR-spektrum.<sup>29</sup>

Pro studování povrchu vzorku se používají zejména FT-IR spektrometry s ATR technikou. Tato technika zeslabeného úplného odrazu je vhodná pro silně absorbující vzorky, pastovité a práškové vzorky i polymerní vrstvy. Principem je nanesení kompaktní vrstvy vzorku na povrch měrného krystalu, který má vysoký index lomu. Mezi nejběžněji používané ATR krystaly patří ZnSe, Ge, směs bromidu-jodidu thallného KRS-5 nebo diamantový krystal. Svazek IR záření poté dopadá na rozhraní mezi vzorkem a krystalem pod úhlem, který odpovídá totálnímu odrazu za vzniku evanescentní vlny prostupující do vzorku. (Obr. 9) Vzorek část záření absorbuje, a tím dojde k oslabení odraženého paprsku o tuto energii.

Detektor zaznamenává zeslabený paprsek záření jako interferogramový signál, který je poté převeden na IR-spektrum.<sup>30</sup>



**Obr. 9:** ATR technika: A – jednodrazový, B – víceodrazový krystal. Upraveno podle Günzler, H. & Williams, A. (2001).<sup>30</sup>

## 2.3 Modifikace IONPs

Magnetické nanočástice oxidů železa jsou široce zkoumány pro možné *in vivo* aplikace jako je zobrazování magnetickou rezonancí, regenerace tkání, hypertermie, doručování léčiv nebo separace buněk.<sup>31</sup> Tyto aplikace vyžadují, aby IONPs byly biokompatibilní, stabilní, netoxické a s úzkou velikostní distribucí. Samotné železo je ale toxické a náchylné k oxidaci, navíc bez jakékoliv povrchové úpravy mají tyto nanočástice hydrofobní povrch. V důsledku hydrofobních interakcí mezi částicemi dochází k jejich shlukování a tvorbě aglomerátů, což vede ke zvýšení velikosti nanočástice.<sup>3</sup>

Vlastnosti povrchu mohou být modifikovány pomocí různých organických i anorganických látek. Mezi nejběžněji používané látky patří jak přírodní, tak syntetické polymery s vysokou molekulovou hmotností; jejich přehled přináší Obr. 10. Podrobněji se budu zabývat alginátem



a polyethylenglykolem (PEG), protože tyto polymery byly použity během vlastního experimentu.

### Přírodní polymery

dextran  
škrob  
želatina  
chitosan  
alginát

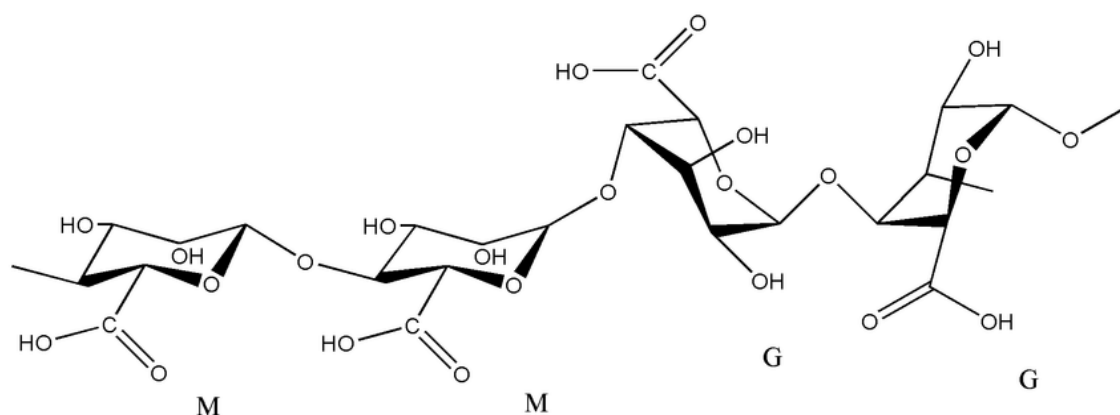
### Syntetické polymery

polyethylenglykol (PEG)  
polyvinylalkohol (PVA)  
kyselina polymléčná (PLA)  
polymethylmethakrylát (PMMA)  
polyakrylová kyselina (PAA)

**Obr. 10:** Přehled nejběžnějších polymerů k modifikaci IONPs.

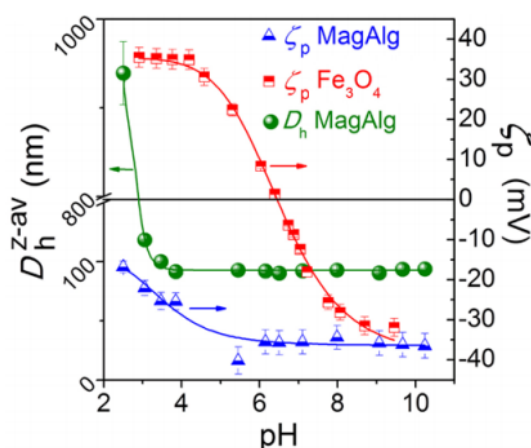
### 2.3.1 Alginát

Alginát je přírodně se vyskytující polysacharid hnědých mořských řas. Jedná se o lineární polymer složený z  $\alpha$ -L-gulonátových (G) a  $\beta$ -D-mannuronových (M) podjednotek. Tyto podjednotky jsou vzájemně propojeny kovalentně 1-4 glykosidickou vazbou v různých sekvencích a tvoří polymerní blok.<sup>32</sup> Alginát ve své struktuře obsahuje mnoho karboxylových skupin vázaných v pevných pozicích. (Obr. 11)



**Obr. 11:** Strukturální vzorec alginátu. Převzato z Gomathi, T. et al.(2017).<sup>33</sup>

Předpokládá se, že tyto karboxyláty působí jako aktivní látky, které interagují s ionty železa na povrchu nanočástice a jejich vzájemné elektrostatické odpuzování částice stabilizuje. G. Zoppellaro *et al.* nastiňuje účinnost této povrchové modifikace: IONPs potažené alginátem (MagAlg) vykazovaly výrazně odlišnou závislost zeta-potenciálu na pH v porovnání s nemodifikovanými IONPs.<sup>34</sup> Hodnota  $\zeta_p$  MagAlg částic zůstala vysoce negativní, až při  $\text{pH} < 4$  se začaly karboxylové skupiny protonizovat a zeta-potenciál se posunul k méně záporným hodnotám. (Obr. 12)



**Obr. 12:** Závislost zeta-potenciálu na pH pro IONPs obalené alginátem (modře) a nemodifikované (červeně). Převzato z Zoppellaro, G. *et al.*(2014).<sup>34</sup>

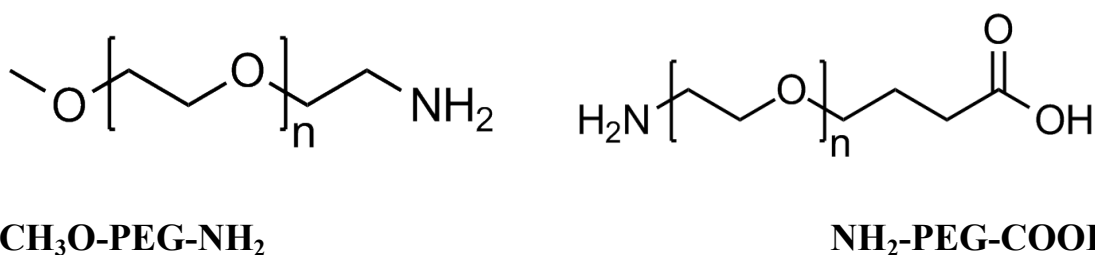
### 2.3.2 Polyethylenglykol a jeho deriváty

Pro aplikace nanočástic *in vivo* je důležité, aby nebyly rozpoznány imunitním systémem a nedošlo k jejich odstranění fagocytujícími buňkami.<sup>35</sup> PEG je amfifilní, chemicky inertní polymer, díky kterému se částice dokážou vyhnout přirozeným vylučovacím mechanismům, jako je retikuloendoteliární systém (RES). PEGylované částice se tedy chovají jako „utajené“ a vykazují delší oběhový čas v krevním řečišti.<sup>36</sup>

Tuto ochranu však částicím nemůže poskytnout každý neiontový hydrofilní polymer. Důležitým faktorem pro biokompatibilitu a utajení částic je molární hmotnost a polydisperzita polymeru. Molární hmotnost PEGu používaného v biomedicínských aplikacích se pohybuje přibližně od 400 Da do 50 kDa. Pro konjugaci nanočásticových systémů a protilátek se používají PEGy s molekulovou hmotností 1 – 5 kDa.<sup>37</sup>

Kromě toho má PEG řadu dalších výhod: stericky zabraňuje shlukování částic a zvyšuje jejich disperzibilitu a stabilitu ve vodném i fyziologickém prostředí. Částice modifikované PEGem také mohou prostupovat buněčnými membránami.<sup>38</sup> Navíc PEG může přinášet do molekuly další funkční skupiny jako například karboxyl, amin, thiol nebo hydrazid a ty usnadňují následnou imobilizaci biologických molekul.<sup>12</sup> Nevýhodou je však to, že není biodegradabilní.<sup>37</sup>

V rámci experimentální části práce byly použity heterobifunkční deriváty polyethylenglykolu, konkrétně CH<sub>3</sub>O-PEG-NH<sub>2</sub> a COOH-PEG-NH<sub>2</sub>, jejichž strukturní vzorce jsou na Obr. 13. Heterofunkční deriváty PEGu se obecně používají jako zesilovací činidla nebo jako rozpěrky mezi dvěma různými chemickými entitami. Různá kombinace koncových funkčních skupin poskytuje zvýšenou selektivitu reakce pro biokonjugaci, modifikaci, zesilování i k použití jako molekulární sondy.



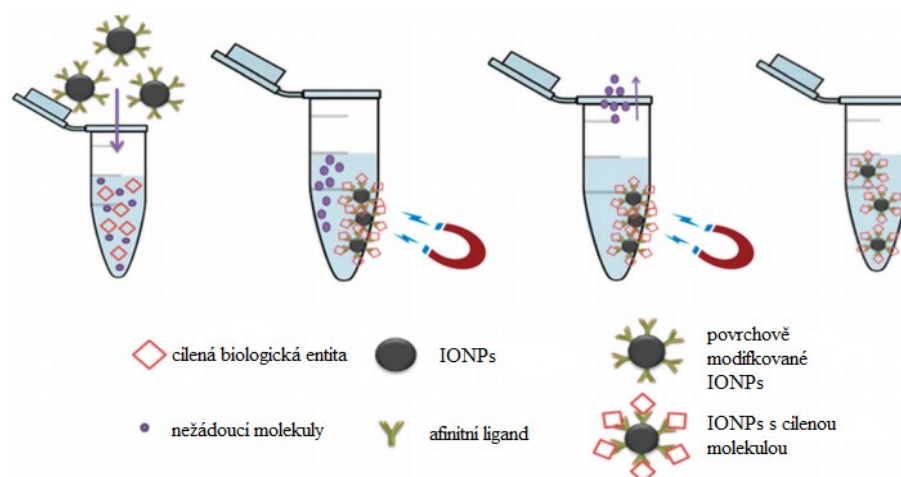
**Obr. 13:** Strukturní vzorce použitých heterofunkčních derivátů polyethylenglykolu.

## 2.4 Využití v biologii a medicíně

Biomedicínské aplikace nanočástic oxidů železa můžeme klasifikovat podle jejich použití uvnitř (*in vivo*) nebo mimo (*in vitro*) těla. *In vivo* aplikace mohou být dále rozděleny na terapeutické (např. cílené doručování léčiv a hypertermie) a diagnostické (zobrazování magnetickou rezonancí MRI), hlavní využití *in vitro* aplikací je v diagnostice (značení a separace buněk).

### 2.4.1 Magnetická separace

V biomedicínském výzkumu je často vyžadována separace specifických biologických entit (např. DNA, proteinů a buněk) od jejich přirozeného prostředí. Díky vysoké magnetizaci v přítomnosti magnetického pole a žádné v jeho nepřítomnosti, jsou superparamagnetické koloidy IONPs pro tuto aplikaci ideální. V typickém procesu separace jsou biologické entity označeny nanočásticemi a poté podrobeny separaci pod vnějším magnetickým polem.<sup>21</sup> (Obr. 14)



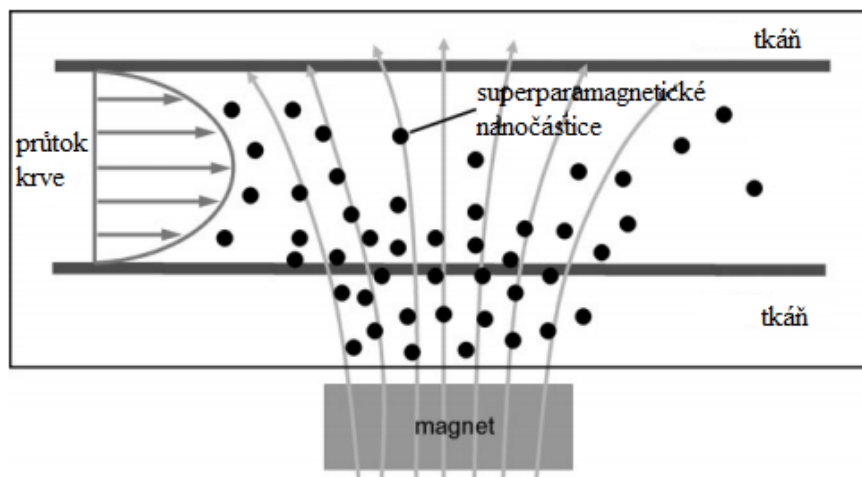
**Obr. 14:** Základní princip magnetické separace. Upraveno podle Demirer, G. S. et al. (2015).<sup>11</sup>

Nanočástice mohou mít také na svém povrchu navázané různé ligandy, jako protilátky nebo hormony, které umožňují specifické značení cílených entit.<sup>39</sup> Magnetická separace pomocí protilátek je velmi přesná, protože protilátky se mohou vázat na odpovídající antigeny na povrchu cílové buňky. Imunospecifické magnetické částice byly úspěšně aplikovány na rozpoznání buněk rakoviny prsu, buněk rakoviny urologického traktu a plicního karcinomu, červených krvinek i pro izolaci enzymů, DNA a RNA z různých zdrojů, včetně tělních tekutin.<sup>40</sup>

#### **2.4.2 Cílené doručování léčiv**

V současné době je většina léčiv po aplikaci náhodě distribuována, což může vést k vedlejším účinkům na zdravé buňky nebo k lékové interakci s ostatními používanými medikamenty. Doručení léčiva na specifické místo může nejen omezit vedlejší účinky, ale také snížit jeho potřebnou dávku.<sup>41</sup> Za tímto účelem jsou intenzivně studovány magnetické nanočástice oxidů železa.

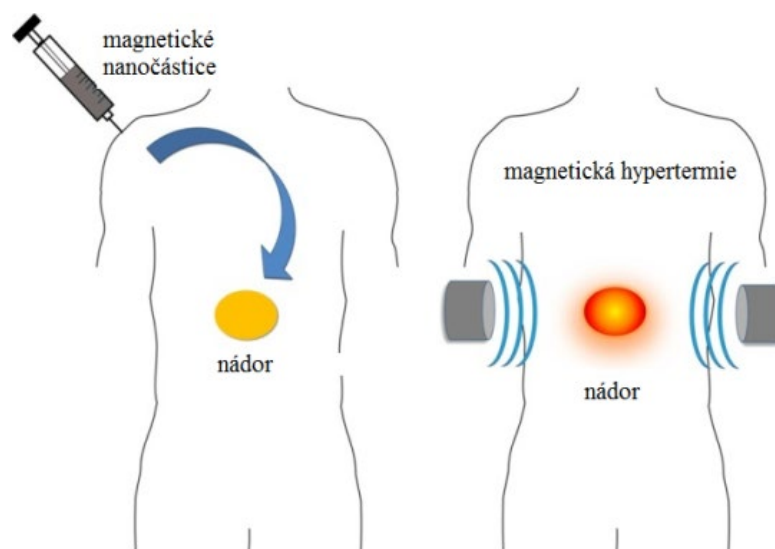
Principem je, že se na IONPs s vhodným povrchovým obalem naváže léčivo. Po jejich injekčním podání do krevního řečiště se pomocí silného magnetického pole navedou na cílové místo. (Obr. 15) Jakmile je nosič s léčivem na správném místě, dojde k uvolnění léčiva prostřednictvím enzymové aktivity nebo změnou fyziologických podmínek (pH, osmolalita, teplota).<sup>42</sup> Úspěch této metody závisí na rychlosti částic v krevním řečišti, době oběhu a síle magnetického pole.<sup>40</sup>



**Obr. 15:** Schematické znázornění magnetického systému pro doručování léčiv. Magnetický gradient pohání magnetické IONPs proudící v oběhovém systému do specifického místa tkáně. Upraveno podle Jeong, U. et al. (2007).<sup>21</sup>

### 2.4.3 Hypertermie

Magnetická hypertermie je léčebná metoda, která využívá magnetické nanočástice ke zvýšení teploty tkáně na  $\sim 43$  °C, při níž dochází k ničení nádorových buněk.<sup>43</sup> Při teplotě nad 41 °C směřují rakovinné buňky směrem k acidóze, což snižuje jejich viabilitu a mění se funkce mnoha enzymatických a strukturálních proteinů, které ovlivňují růst i diferenciaci buněk, což může vést až k apoptóze.<sup>44</sup> Postup tedy zahrnuje dispergování magnetických nanočástic v cílové tkáni, kde mohou generovat značné indukční teplo v závislosti na frekvenci a amplitudě aplikovaného střídavého magnetického pole. (Obr. 16) Aby došlo ke zničení nádorových buněk bez současného poškození okolní zdravé tkáně, je ještě potřeba podstatně zlepšit cílovou selektivitu, stejně jako optimalizovat velikost a s ní související koloidní stabilitu částic.<sup>45</sup>



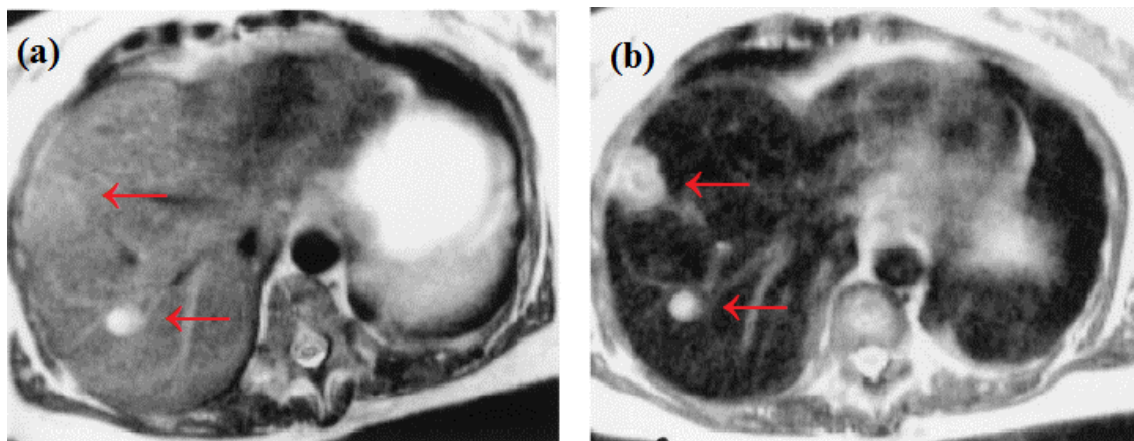
**Obr. 16:** Magnetická hypertermie: nejprve jsou nanočástice injekčně vpraveny do nádoru a poté je střídavým magnetickým polem indukováno teplo. Upraveno podle Andrade, A. et al. (2011).<sup>46</sup>

#### 2.4.4 Zobrazování magnetickou rezonancí

Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) je jednou z nejučinnějších neinvazivních technik v klinické medicíně.<sup>47</sup> MRI je založeno na aplikaci magnetického pole ( $B_0$ ) a vlastnosti vodíkových jader, která se začnou orientovat ve směru tohoto pole a rotovat kolem něj. Směr jejich magnetického momentu je poté změněn příčným vysokofrekvenčním pulzem. Po odstranění tohoto impulzu se protony vodíku vracejí do své původní polohy. Tento relaxační proces má dvě nezávislé části; podélnou  $T_1$  relaxaci a příčnou  $T_2$  relaxaci, jejichž doby se monitorují za vytvoření MR obrazu. Kontrast v obraze poté odpovídá protonové hustotě a fyzikálně-chemické povaze tkáně.<sup>48</sup>

Ke zvýšení kontrastu a zesílení signálu se používají kontrastní látky, v poslední době se zkoumají zejména ty na bázi nanočástic oxidů železa.

Ty po akumulaci v tkáních poskytují změnu intenzity signálu a zesilují kontrast zkrácením podélné i příčné relaxační doby okolních protonů. Pro zkracování  $T_1$  času je důležitá jejich úzká interakce s protony, té ale může zabraňovat tloušťka povrchové vrstvy. Ke zkrácení  $T_2$  doby dochází v důsledku lokálních magnetických nehomogenit způsobených nerovnoměrně rozmístěnými IONPs v dané tkáni.<sup>49</sup> V důsledku výraznějšího  $T_2$  efektu se IONPs využívají jako negativní kontrastní činidla – okolní tkáň ztmavují. (Obr. 17)



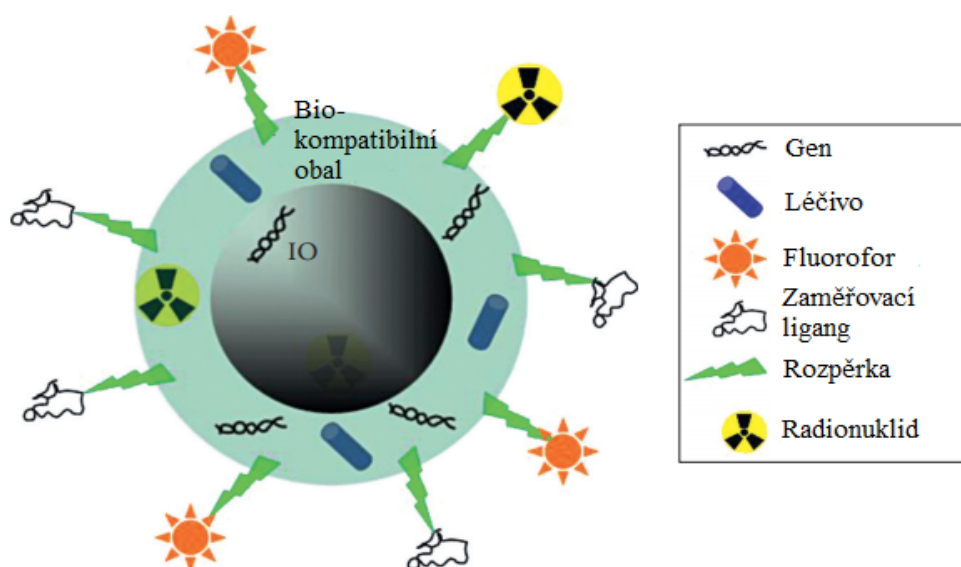
**Obr. 17:** MRI obraz jaterních metastáz (a) bez a (b) s kontrastní látkou na bázi IONPs. Převzato z Chen, F. et al. (1999).<sup>50</sup>



### 3 MOTIVACE

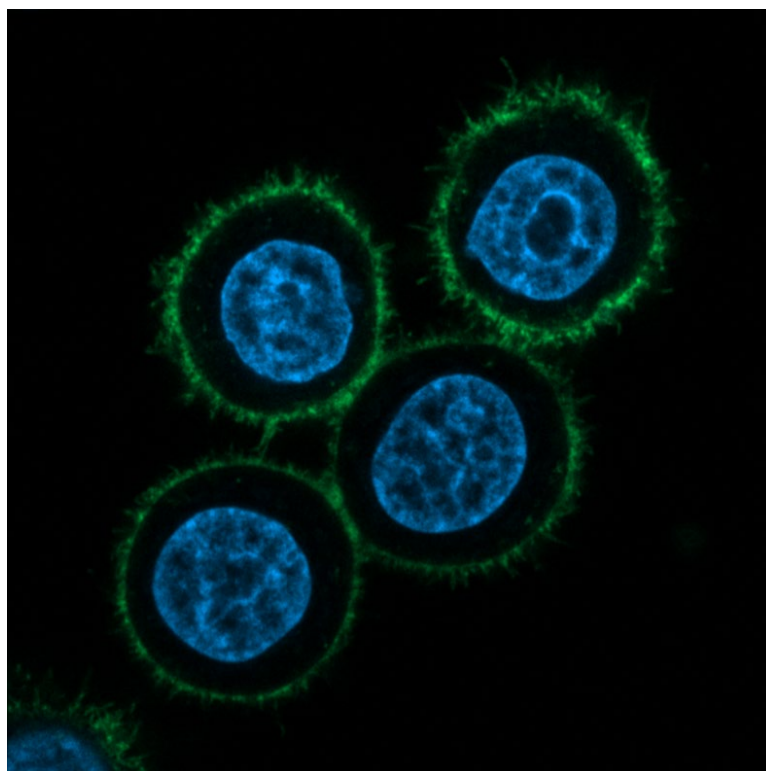
Celosvětově je asi 20 až 30 % rakovin prsu HER2/neu pozitivní. Tato rakovina je velmi agresivní, roste rychle s nádory vysokého stupně. Tento druh rakoviny nereaguje na hormonální terapii, místo toho se léčí protilátkami proti HER2/neu receptoru blokujícími jeho účinek.<sup>51</sup> Příkladem je monoklonální protilátka trastuzumab známá pod komerčním názvem Herceptin.

Nadměrná exprese tohoto biomarkeru může být využita jako tzv. „target“, který umožňuje specifické rozpoznání daného typu nádoru nanočásticemi. Pro takové zobrazování jsou ideálními kandidáty nanočástice oxidů železa; na jejich povrch může být navázána protilátka, která zvýší akumulaci v nemocné tkáni a v důsledku výše popsaných magnetických vlastností IONPs, bude tato tkáň snadno detekovatelná metodou magnetické rezonance. V případě navázání fluoroforu může být detekce doplněna o optické zobrazení. IONPs jsou slibnou multimodální sondou pro včasnou detekci, diagnózu i léčbu nádorů. (Obr. 18)



**Obr. 18:** Schematické znázornění multifunkční nanosondy. Upraveno podle Thanh, N. T. (2012).<sup>12</sup>

Tato práce je zaměřena na vývoj nanočástic oxidů železa, které jsou povrchově modifikovány biokompatibilním polymerem s funkčními skupinami; ty mohou potenciálně umožnit navázání fluorescenční protilátky s vysokou afinitou k HER2/neu receptoru, který je nadměrně produkován nádorovými buňkami SK-BR-3. (Obr. 19) Na této buněčné linii byla také zkoumána cytotoxicita připravených nanočástic.



**Obr. 19:** *Konfokálním fluorescenčním mikroskopem pořízený snímek buněk SK-BR-3, u kterých byl pomocí fluorescenční protilátky označen transmembránový receptor HER2/neu (zelená), jádro je označeno barvou Hoechst 33342 (modrá). Snímek pořídil a ochotně poskytl Mgr. Jan Belza.*

# **EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4 CÍLE PRÁCE

**V teoretické části této práce bylo cílem shrnout dosavadní poznatky o:**

- Nanočásticích oxidů železa, jejich vlastnostech, přípravě a metodách charakterizace
- Povrchové modifikaci těchto částic
- Využití nanočástic oxidů železa v biologii a medicíně

**Cílem experimentální části bylo:**

- Připravit a charakterizovat superparamagnetické nanočástice oxidů železa
- Cíleně modifikovat povrch těchto částic polymery s funkčními skupinami
- Studovat cytotoxicitu modifikovaných nanočástic pomocí vybraných metod na dvou buněčných liniích
- Zpracovat výsledky cytotoxicitních testů

## 5 MATERIÁLY A METODY

### 5.1 Materiály

#### 5.1.1 Chemikálie

- Kyselina alginová (Sigma-Aldrich)
- Zelená skalice  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Lach:ner)
- Hydroxid sodný NaOH (Penta)
- Amoniak  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% (Sigma-Aldrich)
- Polymery  $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$  (2022 Da),  $\text{COOH-PEG-NH}_2$  (2996 Da) (RAPP polymere)
- N,N'-Diisopropylkarbodimid DIC (Sigma-Aldrich)
- N,N-Diisopropylethylamin DIPEA (Sigma-Aldrich)
- 1-Hydroxybenzotriazol HOBt (Alfa Aesar)
- Dimethylformamid DMF (Merck)
- Dimethylsulfoxid DMSO (Sigma-Aldrich)
- LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher scientific)
- BD Cycletest Plus DNA Kit (BD Biosciences)
- Fluorescenční sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Thermo Fisher scientific)

#### 5.1.2 Roztoky a média

- Redukční pufr (10% w/v hydroxylaminhydrochlorid v 100 ml 1 M HCl)
- Ferrozinový pufr (50 g octanu amonného a 0,1 g ferrozinu v 100 ml DI vody)
- 0,25% roztok trypsin – EDTA
- Fosfátový pufr PBS o pH 7,4 obsahující 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- Kultivační médium pro buňky HeLa: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM High Glucose) s obsahem 4500 mg/l D-glukózy, L-Glutaminu, 10 % fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % antibiotik (penicilin/streptomycin)
- Kultivační médium pro buňky SK-BR-3: McCoy's 5A Medium obsahující 10 % FBS a 1 % antibiotik (penicilin/streptomycin)

### 5.1.3 Přístroje

- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK)
- FT-IR spektrometr Nicolet iS5 (Thermo Scientific)
- Půtokový cytometr BD FACSVersé (BD Biosciences)
- Multifunkční modulární reader Tecan Infinite M200 PRO (Schoeller Instruments)
- CO<sub>2</sub> inkubátor NB-203XL (N-Biotek)
- Laminární biohazard flow-box (Bio-Ban)
- Mikroskop CKX31 (Olympus)
- Centrifuga 5430 R (Eppendorf)
- Vakuový systém na odsávání média (Mediset)
- Přístroj na počítání buněk Bio-Rad TC10 (Bio-Rad)
- Přístroj na ultračistou vodu Puris Evo-up (Mirae St)

### 5.1.4 Biologický materiál

Pro analýzu cytotoxicity připravených částic byly použity dvě adherentní buněčné linie, a to lidské nádorové buňky rakoviny děložního hrdla (HeLa) a zhoubné buňky rakoviny prsu (SK-BR-3).

## 5.2 Metody

### 5.2.1 Syntéza MagAlg částic

Syntéza magnetických nanočástic byla provedena podle podrobného popisu v článku, který publikoval Giorgio Zoppellero *et al.*<sup>34</sup>: Kyselina alginová (300 mg) se rozpustí v ultračisté vodě (60 ml) a po zvýšení teploty (40 °C) se přidají 4 ml koncentrovaného roztoku NH<sub>4</sub>OH. Po zahřátí na 55 °C se přidá roztok FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ve vodě s přídavkem koncentrované HCl (1,440 g ve 20 ml ultračisté vody s přídavkem 60 µl HCl). Vzniklé MagAlg částice se nechají 24 hod míchat a poté jsou promývány a frakcionalizovány centrifugací. Připravené částice jsou hydrofilního charakteru a na svém povrchu mají volné COOH- skupiny alginátu.

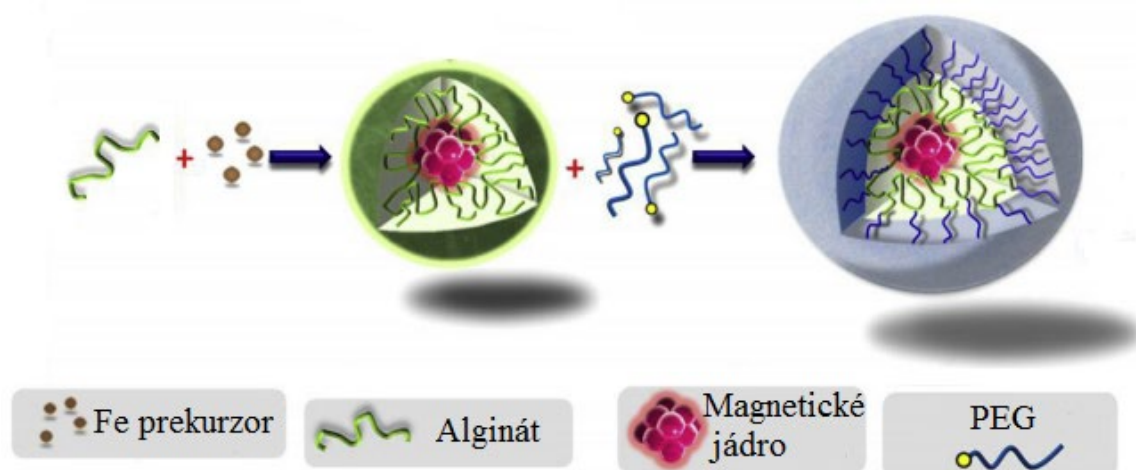
### 5.2.2 PEGylace – povrchová modifikace polyethylen glykolovými řetězci

U připravených nanočástic byl poté modifikován jejich povrch polymery obsahujícími funkční skupiny, které by potenciálně mohly umožnit navázání fluorescenční protilátky pro cílené zobrazování nádorových buněk. (Obr. 20)

Modifikace probíhala podle postupu uvedeného v článku od Yiannise Sarigiannise *et al.*<sup>52</sup>: Připravené MagAlg částice byly po dobu 48 hod dialyzovány ve vodě o pH 4,5. Poté byly zcentrifugovány, supernatant odebrán a částice byly rozdispergovány v 1 ml DMF. Tento proces byl opakován celkem 3×. Podle počtu volných COOH- skupin z již navázaného alginátu bylo vypočítáno potřebné množství ostatních reaktantů (polymer, DIC, HOBt). Tato reakce běžela za stálého protřepávání přes noc. Proces PEGylace probíhal ve třech reakčních dnech; postup byl vždy od

centrifugování až po přidavek polymeru stejný. Na konci celého procesu polymerace byly částice naposledy zcentrifugovány, 2× promyty v DMF, 2× ve vodě a poté finálně rozdispergovány ve vodě.

Celkem byly připraveny 2 typy modifikovaných částic. U prvního typu byl ve všech reakčních dnech přidáván pouze polymer CH<sub>3</sub>O-PEG-NH<sub>2</sub>, výsledné nanočástice jsou dále označovány jako MagAlg\_mPEG. U druhého typu částic, MagAlg\_cPEG, byl v posledním kroku methoxy-polymer nahrazen polymerem s karboxylovou skupinou COOH-PEG-NH<sub>2</sub>.



**Obr. 20:** Schematické znázornění přípravy a následné povrchové modifikace nanočástic oxidů železa. První polymerní obal je tvořen alginátem, druhý deriváty polyethylenglykolu. Upraveno podle Sarigiannis, Y. et al. (2016).<sup>52</sup>



### **5.2.3 Ferrozinová metoda – stanovení koncentrace železa**

Ke stanovení obsahu železa a následnému přepočtu na obsah  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  v připravených i v modifikovaných nanočásticích byla použita ferrozinová metoda. Tato metoda spočívá v redukci vzorku Fe (III) redukčním pufrem na Fe (II). K takto připraveným vzorkům se přidá ferrozinový pufr za tvorby fialového komplexu Fe (II) - ferrozin, který je spektrofotometricky analyzován při vlnové délce 562 nm. Výsledná průměrná absorbance byla dosazena do kalibrační přímky, která byla naměřena Mgr. Šárkou Adámkovou (RCPTM). Celková koncentrace  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  v částicích je poté udána v jednotkách mg/ml.

### **5.2.4 DLS a zeta-potenciál**

Měření DLS a zeta-potenciálu vhodně koncentrované disperze při definovaném pH bylo provedeno za použití Zetasizer Nano ZS. Zeta-potenciál byl měřen v kapilární kyvetě DTS1070. Částice byly měřeny v prostředí ultračisté vody, dále v roztoku 0,5 M NaCl a v prostředí pufru PBS.

### **5.2.5 FT-IR spektrometrie**

Infračervená spektra byla měřena na spektrometru Nicolet iS5 FTIR. Na krystal ZnSe se nakápla kapička vodné disperze, která na krystalu zaschla a vytvořila film. Spektra byla získána shromážděním 32 skenů.

## 5.2.6 Kultivační podmínky a pasážování

Všechny experimenty s buňkami byly prováděny *in vitro*. Pro navození podmínek prostředí živého organismu byly buňky kultivovány v kultivačním médiu a uchovávány v inkubátoru s 5% atmosférou CO<sub>2</sub> při teplotě 37 °C. Práce s buňkami probíhala ve sterilním prostředí laminárního flow-boxu.

Růst buněk byl pravidelně kontrolován pod optickým mikroskopem. Při míře konfluence 70 – 80 % se buňky musely přenést do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem, aby nedocházelo ke kontaktní inhibici růstu.

Při pasážování se z nádoby odsálo médium, buňky se opláchly přidáním 5 ml fosfátového pufru PBS a v dalším kroku bylo do kultivační lahve (T-25) přidáno 0,5 ml trypsinu. Buňky s trypsinem se nechaly 5 minut inkubovat, aby došlo k deahderaci buněk ze dna kultivační nádoby. Působení trypsinu bylo zastaveno přidáním kultivačního média, které obsahovalo 10 % fetálního bovinního séra. Poté se přepipetovalo 0,5 ml roztoku do nové kultivační nádoby a ta se doplnila do obsahu 5 ml médiem. Všechny roztoky byly před použitím nahřáty na teplotu 37 °C.

Množství buněk bylo spočítáno automatickým čítačem a ty byly následně naředěny podle potřeby počtu buněk v jednotlivých jamkách kultivační destičky pro měření.

### 5.2.7 Průtoková cytometrie

Analýza toxicity i ovlivnění změn buněčného cyklu připravených nanočástic byla prováděná na průtokovém cytometru BD FACSVerse. Ke stanovení viability byl použit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit a pro analyzování buněčného cyklu BD Cycletest Plus DNA Kit. Pro obě měření bylo nejprve na 96-jamkovou kultivační destičku vyseto 7000 buněk na jamku, které byly po 24 hodinách naznačeny částicemi tak, aby jejich celková koncentrace byla 0, 25, 50, 100, 250 a 500  $\mu\text{g/ml}$ . Takto naznačené buňky se nechaly 24 hodin inkubovat. Z důvodu stanovení průměrné a standardní odchylky bylo každé měření prováděno v triplikátu.

Pro měření viability byly inkubované buňky následující den ošetřeny podobným procesem jako v případě pasážování, poté k nim byly z daného kitu přidány 2  $\mu\text{l}$  naředěného kalceinu-AM (2  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku ve 158  $\mu\text{l}$  DMSO) a 1  $\mu\text{l}$  propidium jodidu o koncentraci 1  $\text{mg/ml}$ . Po 20 min inkubaci v temnu se na průtokovém cytometru měřil fluorescenční signál při příslušných vlnových délkách. Nefluorescenční kalcein-AM se po průchodu buněčnou membránou živých buněk mění na kalcein a vykazuje tak zelenou fluorescenci. Propidium jodid je nepropustný pro živé buňky, a proto červený fluorescenční signál značí buňky mrtvé. Rozdělením signálů lze pak určit celkovou viabilitu/toxicitu zkoumaných buněk.

K analýze buněčného cyklu bylo z inkubovaných buněk odsáto médium a po opláchnutí roztokem PBS postupně přidány roztoky z příslušného kitu. Nejprve se přidalo 25  $\mu\text{l}$  roztoku A, což je trypsinový pufr, po 10 min inkubaci při pokojové teplotě se přidalo 20  $\mu\text{l}$  roztoku B obsahující inhibitor trypsinu a RNázu, která zajistí izolaci DNA, po další 10 min inkubaci se přidalo 20  $\mu\text{l}$  vychlazeného barvicího roztoku C, který obsahuje

propidium jodid. Po konečné 10 min inkubaci v ledničce byla vyizolovaná jádra připravena pro měření. Díky odlišené intenzitě červeného fluorescenčního signálu barviva bylo možné identifikovat jednotlivé fáze buněčného cyklu.

### **5.2.8 Měření ROS**

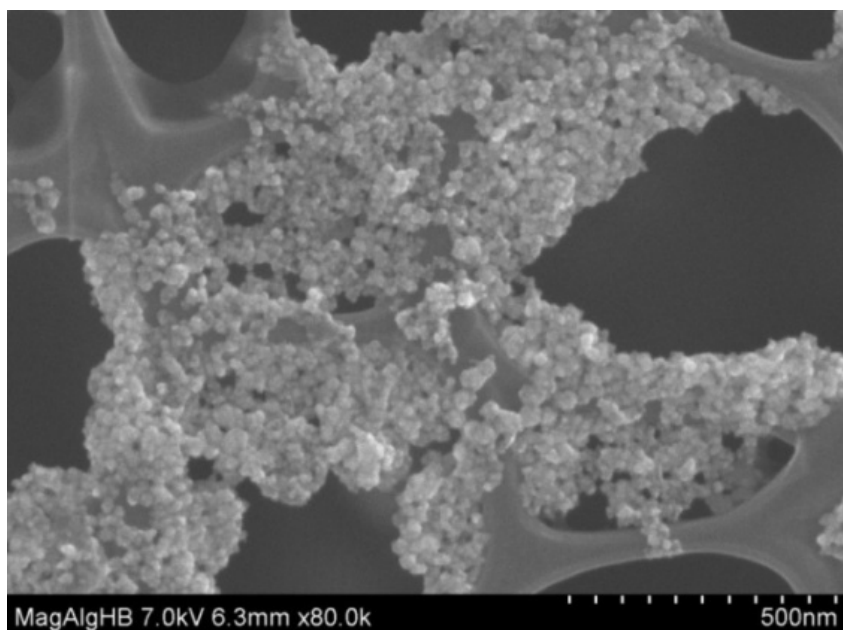
K detekci reaktivních forem kyslíku (ROS) byly připraveny buňky stejně jako v případě měření na průtokovém cytometru; buňky označené částicemi byly inkubovány po dobu 24 hod. Pro stanovení ROS byla použita fluorescenční sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA, která byla nejprve naředěna v roztoku DMSO (prášková sonda se rozpustila ve 173  $\mu$ l DMSO na koncentraci 0,5 mM). Z jamek kultivační destičky pak bylo odsáto médium a nahrazeno novým, obsahujícím fluorescenční sondu (2,45 ml média s obsahem 50  $\mu$ l naředěné sondy; finální koncentrace sondy v médiu byla 10  $\mu$ M). Destička byla vložena do multifunkčního modulárního readeru a skenováním fluorescenčního signálu byly zjištěny hodnoty ROS uvnitř buněk.

## 6 VÝSLEDKY

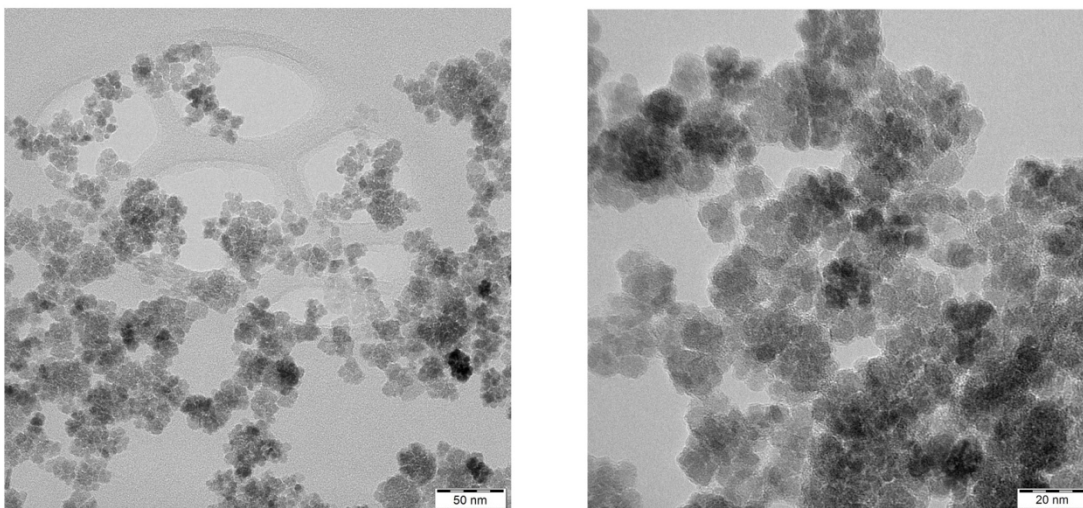
### 6.1 Fyzikálně-chemická charakterizace částic

#### 6.1.1 Elektronová mikroskopie

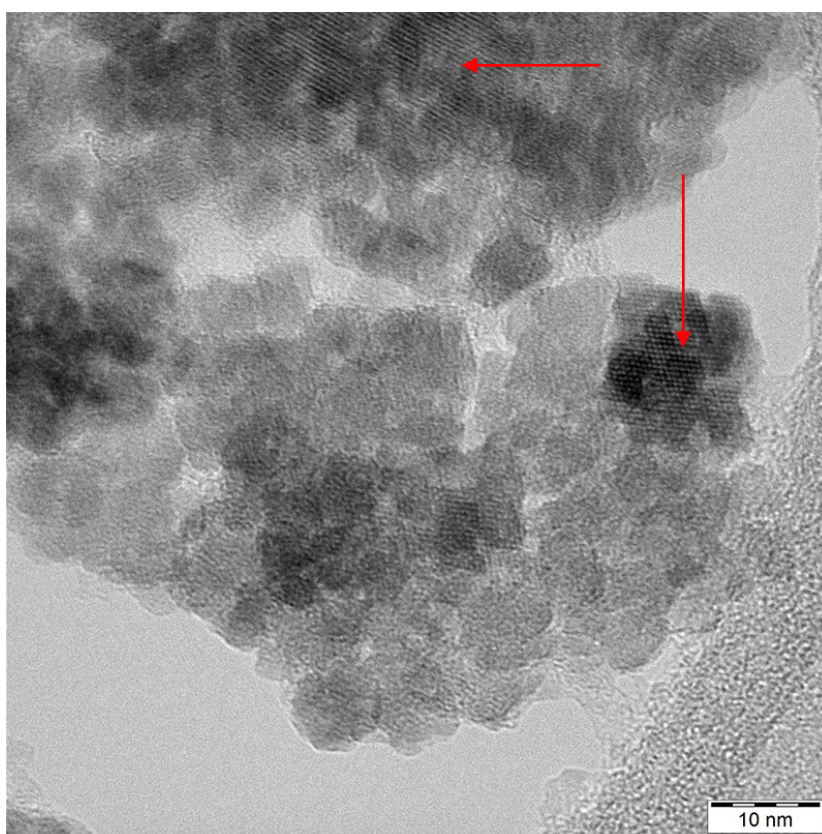
Morfologie nanočástic byla zkoumána elektronovou mikroskopií. Snímek Obr. 21 ze skenovacího elektronového mikroskopu vyobrazuje připravené MagAlg částice s jednotným sférickým tvarem; na některých místech lze pozorovat větší shluky částic, které se pravděpodobně vytvořily při vysychání vzorku pro samotné měření. Obr. 22 zobrazuje připravené částice pod transmisioním elektronovým mikroskopem. Nanočástice s navázaným polymerem byly podrobeny TEM analýze a jsou vyobrazeny na Obr. 23 a 24. Výsledky TEM analýzy prokazují, že magnetické nanočástice oxidů železa jsou uspořádány do klastrů. Modifikované nanočástice mají na sobě patrnou amorfní vrstvu PEGu. Na některých místech (označeno šipkou) jsou viditelné difrakční roviny nanočástic oxidů železa.



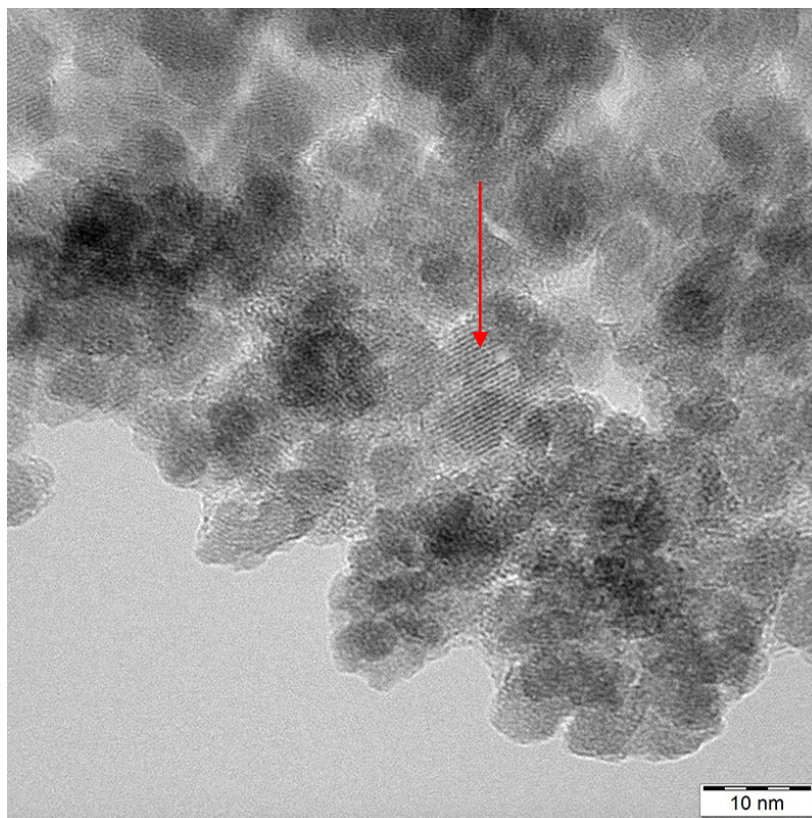
*Obr. 21: SEM snímek připravených MagAlg částic.*



**Obr. 22:** TEM snímky připravených MagAlg částic (měřítko 50 a 20 nm).



**Obr. 23:** TEM snímek modifikovaných MagAlg\_mPEG částic (měřítko 10 nm).



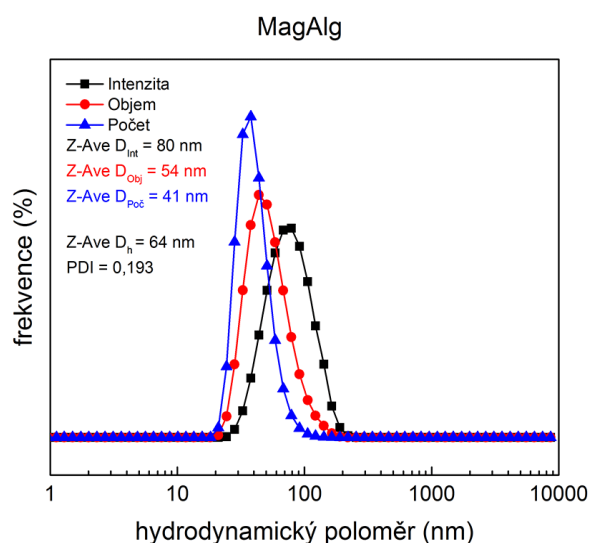
**Obr 24:** TEM snímek modifikovaných MagAlg\_cPEG částic (měřítko 10 nm).

## 6.1.2 DLS analýza

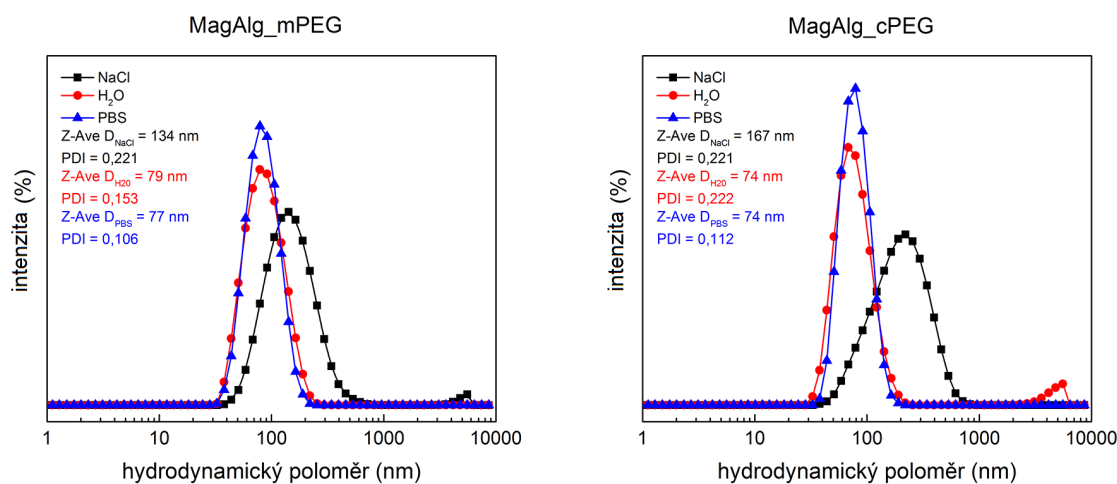
Velikost a stabilita připravených i modifikovaných nanočástic byla stanovena metodou DLS. Na Obr. 25 jsou zobrazeny výsledky analýzy syntetizovaných MagAlg částic; distribuce velikostí těchto částic je znázorněna na základě intenzity, objemu a počtu. U modifikovaných částic, MagAlg\_mPEG a MagAlg\_cPEG, je velikost distribuována podle intenzity v prostředí 0,5 M NaCl, vody a fyziologického pufovaného roztoku PBS. (Obr. 26) V grafech je uvedena velikost částic (tzv. Z-Average) a index polydisperzity (PDI).

Velikost připravených MagAlg částic (měřená v prostředí vody) distribuovaná podle intenzity je 80 nm, na základě objemu je to 54 nm a na základě počtu pak 41 nm. Velikost částic Z-Average byla stanovena na 64 nm s indexem polydisperzity 0,193. První typ modifikovaných částic, MagAlg\_mPEG, vykazuje v prostředí 0,5 M NaCl širší velikostní distribuci s průměrem 134 nm, ve vodě a v PBS je jejich velikost 79 nm, resp. 77 nm. Stejně tak se objevuje širší pík v roztoku soli i u částic MagAlg\_cPEG, kde je jejich Z-Average velikost 167 nm, v prostředí vody a PBS mají pak částice shodně 74 nm.



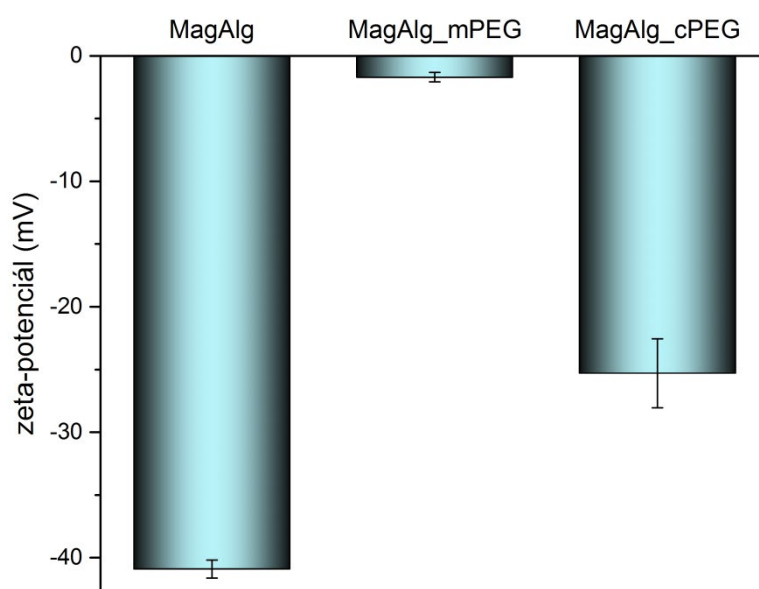


**Obr. 25:** Distribuce velikostí syntetizovaných MagAlg částic na základě intenzity (černě), objemu (červeně) a počtu (modře).



**Obr. 26:** Distribuce velikostí MagAlg\_mPEG (vlevo) a MagAlg\_cPEG (vpravo) částic podle intenzity v prostředí 0,5 M NaCl (černě), vody (červeně) a PBS (modře).

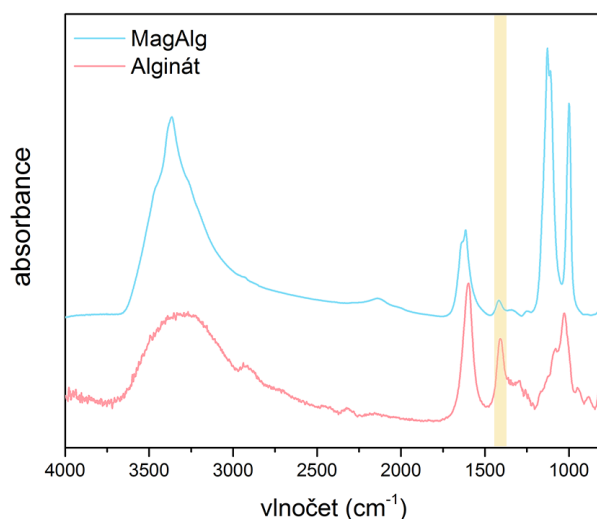
Stabilita nanočástic byla posuzována na základě měření zeta-potenciálu v prostředí vody o pH = 7,1 (Obr. 27). Ve všech případech se jedná o stabilní koloidní disperzi. Syntetizované MagAlg částice s hodnotou zeta-potenciálu -40,9 mV jsou stabilizovány elektrostaticky alginátem. I přesto, že je zeta-potenciál modifikovaných MagAlg\_mPEG částic jen -1,7 mV, jsou tyto částice stabilní díky stérickému působení polymeru. Druhý typ částic, MagAlg\_cPEG, má zeta-potenciál -25,3 mV.



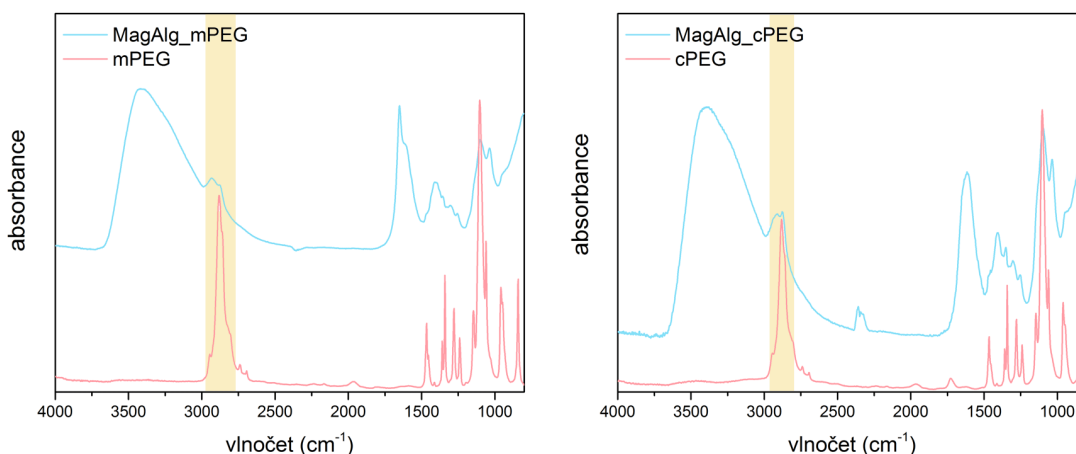
**Obr. 27:** Zeta-potenciál připravených (MagAlg) a modifikovaných nanočástic (MagAlg\_mPEG a MagAlg\_cPEG) měřený metodou DLS v prostředí vody o pH 7,1.

### 6.1.3 FT-IR analýza

Pro potvrzení úspěšného navázání polymerů  $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$  a  $\text{COOH-PEG-NH}_2$  byla provedena FT-IR analýza. Obr. 28 a 29 porovnává získaná spektra samostatných polymerů a spektra daných modifikovaných částic. Pro alginát je typický pík při vlnočtu  $\sim 1410\text{ cm}^{-1}$ , polymery  $\text{CH}_3\text{O-PEG-NH}_2$  a  $\text{COOH-PEG-NH}_2$  vykazují maximum při  $\sim 2878\text{ cm}^{-1}$ . Z grafů je přehledně vidět, že se dané polymery na povrchu částice nachází.



**Obr. 28:** FT-IR spektrum připravených MagAlg částic (modře) a samostatného čistého alginátu (červeně).

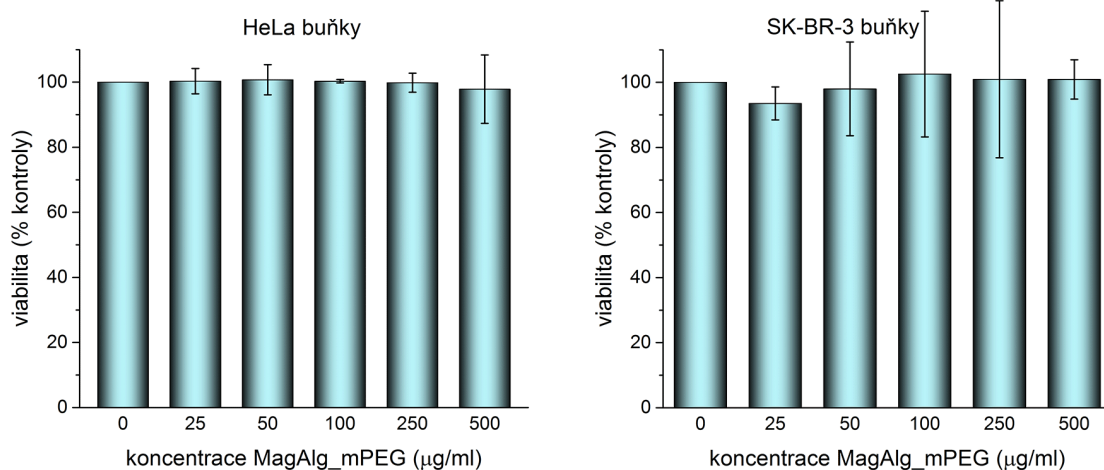


**Obr. 29:** FT-IR spektra *MagAlg\_mPEG* částic (vlevo) a *MagAlg\_cPEG* částic (vpravo). Modře jsou označeny jednotlivé typy částic, červeně pak samostatné čisté polymery.

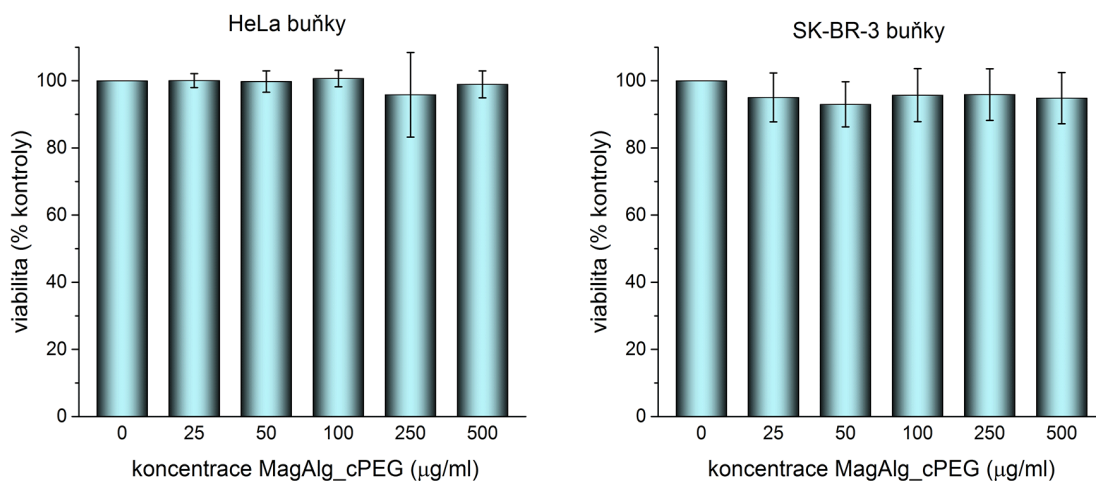
## 6.2 Výsledky biologických testů

### 6.2.1 Měření viability

Ke stanovení cytotoxicity částic byla použita metoda průtokové cytometrie zahrnující barvení buněk fluorescenčním propidium jodidem. Obě testované buněčné linie (HeLa i SK-BR-3) byly vystaveny různým koncentracím částic po dobu 24 hod. Obr. 30 a 31 znázorňuje cytotoxický účinek částic *MagAlg\_mPEG* resp. *MagAlg\_cPEG* na jednotlivé buněčné linie. Z grafů je patrné, že buňky nebyly negativně ovlivněny nanočásticemi; i při největší koncentraci (500  $\mu\text{g/ml}$ ) zůstala viabilita buněk ve srovnání s kontrolou větší než 95 %.



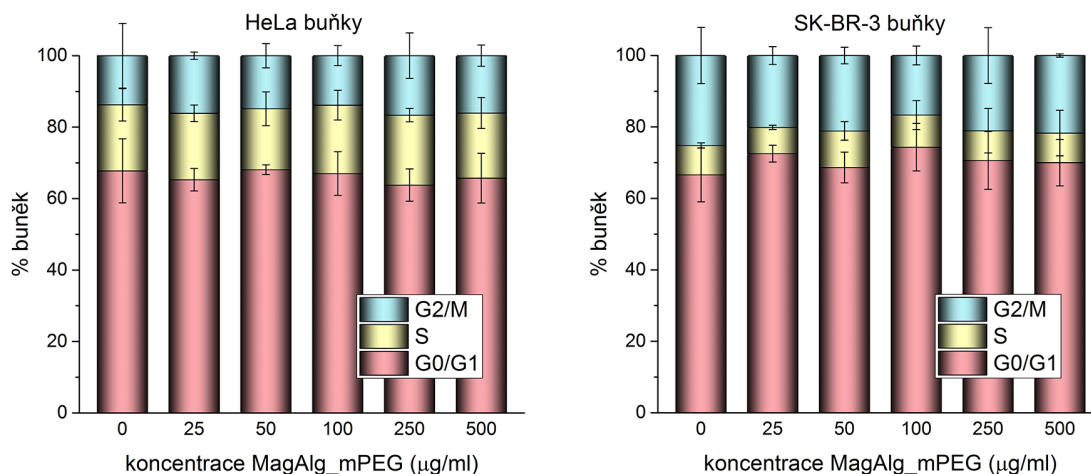
**Obr. 30:** Viabilita HeLa (vlevo) a SK-BR-3 (vpravo) buněk po 24 hod inkubaci s MagAlg\_mPEG o koncentraci 25 – 500 µg/ml.



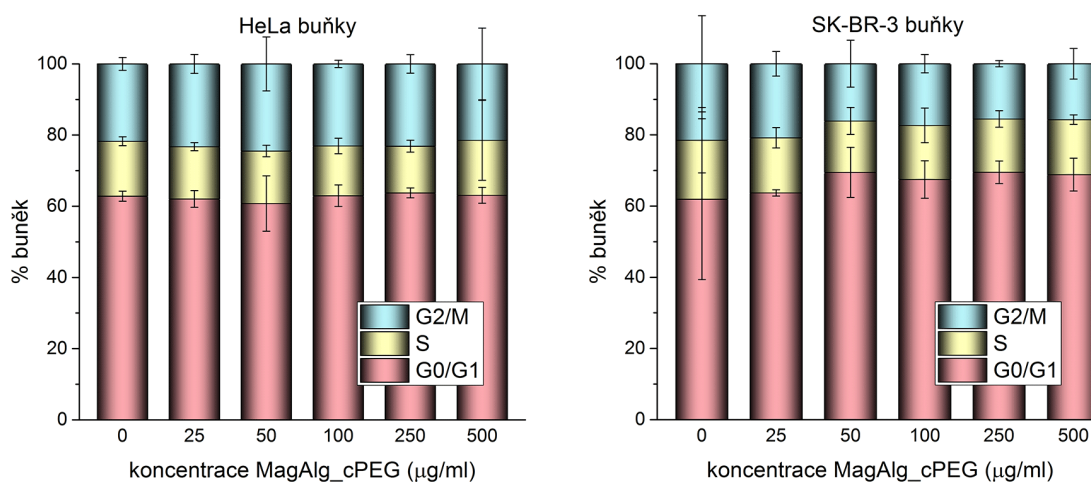
**Obr. 31:** Viabilita HeLa (vlevo) a SK-BR-3 (vpravo) buněk po 24 hod inkubaci s MagAlg\_cPEG o koncentraci 25 – 500 µg/ml.

## **6.2.2 Analýza buněčného cyklu**

Průtokovou cytometrií byl analyzován také vliv různých koncentrací nanočástic na buněčný růst, dělení a celkovou proliferaci po jejich 24 hodinové inkubaci. V G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu dochází k růstu buňky a kontrole DNA, která se při S fázi replikuje. G<sub>2</sub>/M fáze je charakterizována zdvojením organel, po kterém následuje vlastní dělení jádra a celé buňky. U obou typů částic byl dopad na změnu buněčného cyklu téměř zanedbatelný, a to i při nejvyšší koncentraci. (Obr. 32 a 33)



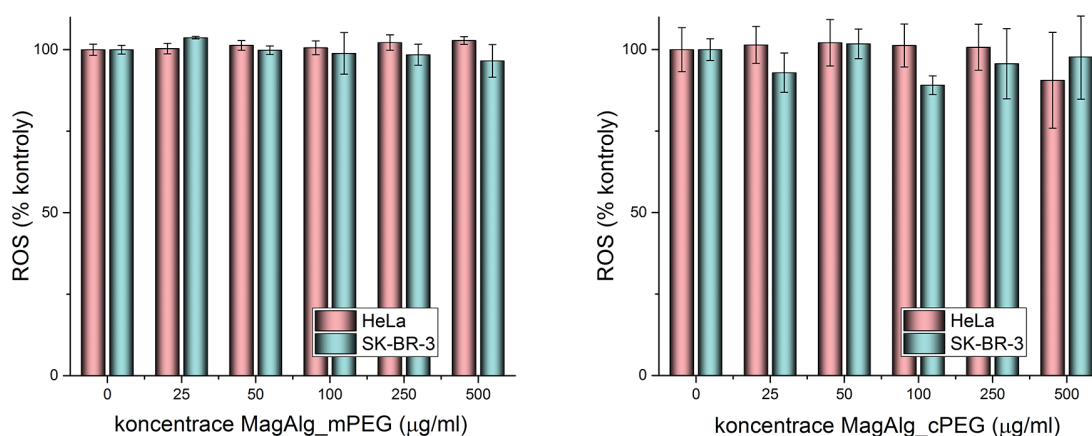
**Obr. 32:** Analýza buněčného cyklu HeLa (vlevo) a SK-BR-3 (vpravo) buněk po 24 hod inkubaci s MagAlg\_mPEG o koncentraci 25 – 500 µg/ml.



**Obr. 33:** Analýza buněčného cyklu HeLa (vlevo) a SK-BR-3 (vpravo) buněk po 24 hod inkubaci s MagAlg\_cPEG o koncentraci 25 – 500 µg/ml.

### 6.2.3 Vznik reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)

Pro detekci ROS byla použita fluorescenční sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA, která je citlivá na zvýšenou produkci různých reaktivních forem kyslíku, především se jedná o peroxid vodíku, hydroxylový radikál nebo radikály oxidu dusnatého a dusičitého. Tvorbu ROS u obou buněčných linií po 24 hod inkubaci s částicemi zobrazuje Obr. 34. Oba dva typy buněk vykazují menší či jen velmi mírně zvýšenou (v rozmezí max. 3 %) tvorbu ROS v porovnání s kontrolou.



**Obr. 34:** Tvorba ROS v buňkách HeLa a SK-BR-3 po 24 hod inkubaci s částicemi MagAlg\_mPEG (vlevo) a MagAlg\_cPEG (vpravo) v rozmezí koncentrací 25 – 500 µg/ml.



## 6.2.4 Optická mikroskopie

Na závěr byl analyzován optickým mikroskopem s fázovým kontrastem vliv modifikovaných MagAlg\_cPEG částic na morfologii testovaných buněk po jejich 24 hod inkubaci. Z Obr. 35 a 36 je patrné, že ani nejvyšší koncentrace MagAlg\_cPEG částic (500  $\mu\text{l/ml}$ ) nezpůsobuje morfologickou změnu HeLa či SK-BR-3 buněk, které jsou stále adherované tak jako buňky kontrolní. Pro pozorování bylo použito zvětšení 200 $\times$ .

HeLa buňky



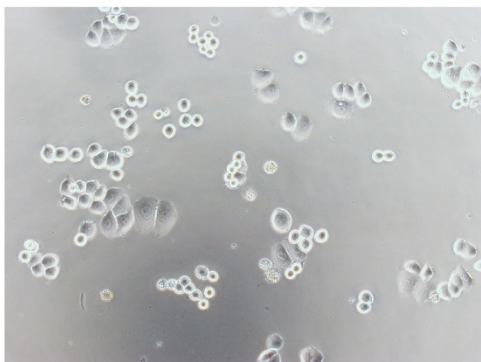
koncentrace MagAlg\_cPEG 0 µg/ml



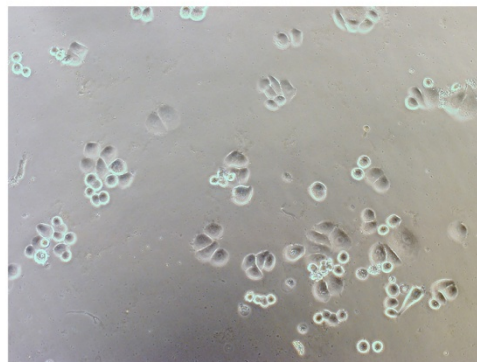
koncentrace MagAlg\_cPEG 500 µg/ml

**Obr. 35:** *Neznačené HeLa buňky (vlevo) a naznačené MagAlg\_cPEG částicemi o koncentraci 500 µg/ml po dobu 24 hod (vpravo) pod optickým mikroskopem.*

SK-BR-3 buňky



koncentrace MagAlg\_cPEG 0 µg/ml



koncentrace MagAlg\_cPEG 500 µg/ml

**Obr. 36:** *Neznačené SK-BR-3 buňky (vlevo) a naznačené MagAlg\_cPEG částicemi o koncentraci 500 µg/ml po dobu 24 hod (vpravo) pod optickým mikroskopem.*

## 7 DISKUZE

Tato bakalářská práce je zaměřena na vývoj systému na bázi nanočástic oxidů železa, který by potenciálně mohl sloužit jako multimodální zobrazovací sonda pro včasnou detekci nádorů. Pro takové aplikace je nutné, aby částice byly stabilní a netoxické. V experimentální části tak byly na základě publikace od G. Zoppellaro *et al.* připraveny stabilní kondenzované koloidní klastry nanočástic oxidů železa (MagAlg) pomocí alkalické precipitace iontů Fe (II) v přítomnosti alginátu.<sup>34</sup> Takto připravené nanočástice se v dané publikaci ukázaly jako vynikající substrát pro terapeutické aplikace, což autoři dokládají úspěšným navázáním cytostatika doxorubicinu, cytokompatibilitou a možností vizualizace částic uvnitř tkání pomocí MRI. Stabilitu námi připravených MagAlg částic potvrzuje měření zeta-potenciálu (Obr. 27, str. 50), který má pro tyto nanočástice vysoce zápornou hodnotu -40,9 mV v důsledku přítomnosti volných karboxylových skupin alginátu situovaných na povrchu částice. Tyto karboxylové skupiny alginátu interagují s povrchovými atomy železa, což dokládá např. FT-IR analýza publikovaná A. Bakandritsosem *et al.*, a tím dochází k jejich vzájemnému elektrostatickému odpuzování.<sup>53</sup> Celá alginátová slupka se pak na povrch nanočástic váže téměř nezvratně a působí jako hydrofilní obal, který umožňuje další chemickou modifikaci.

Pro chemickou derivatizaci povrchu nanočástic byly zvoleny dva heterobifunkční deriváty polyethylenglykolu (PEG) obsahující v obou případech na jednom konci aminoskupinu a na druhém konci stabilní methoxy, resp. reaktivní karboxylovou skupinu. Polyethylenglykol zajišťuje robustní stérickou stabilizaci disperze a díky přítomnosti

funkčních skupin umožňuje následné využití systému k navázání protilátky nebo jiné biologicky relevantní molekuly. C. Fang *et al.* popisuje PEGylaci jako účinnější modifikaci povrchu pro případné *in vivo* aplikace oproti jiným neutrálním polymerům jako je například dextran, protože PEGem obalené nanočástice vykazují nižší nespecifické vychytávání makrofágy.<sup>54</sup> Modifikace připravených nanočástic byla provedena podle postupu Y. Sarigiannise *et al.*<sup>52</sup> Modifikací byly připraveny dva druhy částic: MagAlg\_mPEG obsahující pouze polymer CH<sub>3</sub>O-PEG-NH<sub>2</sub>, který byl použit i ve zmíněném článku a dále MagAlg\_cPEG, u kterých byl předchozí polymer nahrazen v posledním modifikačním kroku polymerem COOH-PEG-NH<sub>2</sub>. Úspěšné navázání polymerů dokládají FT-IR spektra, ve kterých můžeme pozorovat pík o vlnočtu přibližně 2878 cm<sup>-1</sup> odpovídající vibracím C-H vazeb PEGu, kde je uhlík v hybridizaci sp<sup>3</sup> (Obr. 29 na str. 52). Na snímcích ze SEM a TEM mikroskopie (Obr. 21 – 24 na straně 45 – 47) je vidět globulární a pravidelný tvar nanočástic s velikostí jednotlivých krystalů oxidů železa cca 10 – 20 nm odpovídající velikosti částic ze článku G. Zoppellara *et al.*<sup>34</sup> Navíc je na snímcích patrná amorfní vrstva PEGu, která má stabilizační charakter a brání shlukování nanočástic a jejich degradaci v případě použití *in vivo*. Stabilita částic byla posuzována měřením velikosti a zeta-potenciálu metodou DLS, jejíž výsledky jsou na Obr. 26 (str. 49). Při měření velikosti v prostředí vody a fyziologického roztoku PBS vykazují částice úzkou velikostní distribuci, v prostředí 0,5 M roztoku NaCl se ovšem pík mírně posouvá do větších velikostí a rozšiřuje, což může být způsobeno interakcí nabitého povrchu částic s ionty soli; zhoršenou stabilitu PEGylovaných částic v roztoku NaCl potvrzuje i skupina Y. Sarigiannise.

Modifikované částice byly zkoumány hlavně pro jejich potencionální využití v *in vivo* aplikacích, konkrétně jako multimodální sondy pro MRI zobrazování nádorové tkáně rakoviny prsu doplněné optickým zobrazením díky fluorescenční protilátce s vysokou afinitou k HER2/neu receptoru, který je nadměrně produkován, mimo jiné, nádorovými SK-BR-3 buňkami. Pro potenciální využití nanočástic v *in vivo* je nezbytné, aby byly biokompatibilní a nezpůsobovaly žádné nežádoucí účinky při daných koncentracích. K testování toxicity a biokompatibility byly zvoleny dvě buněčné linie, a to zmíněné nádorové buňky rakoviny prsu SK-BR-3 a široce využívané nádorové buňky rakoviny děložního hrdla HeLa. V rámci cytotoxicitní studie byla stanovována viabilita buněk, analyzován buněčný cyklus a tvorba reaktivních kyslíkových radikálů. Buňky byly naznačeny částicemi o koncentracích 25, 50, 100, 250 a 500  $\mu\text{g/ml}$  a byly spolu inkubovány vždy po dobu 24 hod. Jako kontrola byly použity neznačené buňky (koncentrace 0  $\mu\text{g/ml}$ ). Z výše uvedených výsledků (Obr. 30 – 34, str. 53 – 56) je zřejmé, že oba druhy modifikovaných částic jsou s buňkami biokompatibilní v rámci celého rozmezí testovaných koncentrací. Částice neměly výrazný vliv na viabilitu buněk, buněčný cyklus ani produkci reaktivních kyslíkových radikálů vedoucích k oxidačnímu stresu buňky. Zásadním ukazatelem je také stabilita připravených nanočástic v prostředí, které se blíží skutečným fyziologickým podmínkám a kde je přítomno mnoho dalších látek včetně sérových proteinů, jež mohou mít na stabilitu negativní vliv. Pro pozorování buněk inkubovaných v přítomnosti námi připravených nanočástic MagAlg\_cPEG jsme proto použili optickou mikroskopii. U těchto částic jsme kvůli přítomnosti negativně nabitých karboxylových skupin na povrchu předpokládali, že budou ve fyziologických podmínkách vykazovat horší stabilitu než částice

MagAlg\_mPEG nesoucí pouze methoxy skupiny. Na obrázcích 35 a 36 na str. 58 si však můžeme povšimnout, že ani po 24 hodinové inkubaci obou typů testovaných buněk s vysokou koncentrací MagAlg\_cPEG (500 µg/ml) nepozorujeme pod mikroskopem (zvětšení 200×) žádné agregáty či aglomeráty. Oba typy buněk si zároveň zachovaly svou přirozenou morfologii, což dále dokládá biokompatibilní charakter těchto nanočástic.

## 8 ZÁVĚR

Nanočástice oxidů železa jsou obecně považovány díky svým magnetickým vlastnostem jako vhodný nanomateriál k použití v biomedicínských aplikacích. V této práci byly metodou alkalické precipitace syntetizovány stabilní nanočástice oxidů železa, které poté byly povrchově modifikovány biokompatibilními deriváty polyethylenglykolu (PEG). Použitím heterobifunkčních derivátů PEGu byly na povrch nanočástic zavedeny funkční skupiny umožňující navázání dalších molekul, například fluorescenčních barev nebo protilátky ke specifické detekci nádorových tkání. Nanočástice byly charakterizovány řadou fyzikálně-chemických metod a dále byl zkoumán jejich možný cytotoxický účinek na savčí buňky.

Snímky z elektronových mikroskopů prokázaly pravidelný sférický charakter nanočástic s patrnou amorfní vrstvou PEGu, kterou dokládá i FT-IR analýza. Velikost a stabilita částic byla zjišťována metodou DLS. Modifikované částice (MagAlg\_mPEG i MagAlg\_cPEG) tvoří stabilní koloidní disperzi s úzkou velikostní distribucí v prostředí fosfátového pufru PBS navozujícího fyziologické podmínky.

*In vitro* studie na dvou nádorových buněčných liniích, HeLa a SK-BR-3, zahrnovala testování viability buněk, sledování změn buněčného cyklu a produkci reaktivních kyslíkových radikálů. Z výsledků je patrné, že oba druhy modifikovaných částic vykazují nízkou toxicitu a skvělou biokompatibilitu v celém rozmezí testovaných koncentrací (25 – 500 µg/ml).

Na základě výše uvedeného je v plánu pokračovat s experimenty, a to navázáním fluorescenční protilátky s vysokou afinitou k HER2/neu receptoru, který je nadměrně produkován nádorovými buňkami

rakoviny prsu SK-BR-3 a následným ověřením úspěšného navázání systému na daný receptor.



## SUMMARY

Iron oxide nanoparticles are generally considered as a suitable nanomaterial for use in biomedicine due to their magnetic properties. In this thesis stable iron oxide nanoparticles were synthesized by alkaline precipitation and their surface was modified with biocompatible polyethyleneglycol (PEG) derivatives. The heterobifunctional PEG derivatives allow the binding of other molecules, such as fluorescent dyes or antibodies for specific detection of tumor tissues. The nanoparticles were characterized by a number of physicochemical methods and their possible cytotoxic effect on mammalian cells was further studied.

Electron microscope images showed the spherical character of the nanoparticles with a visible amorphous PEG layer, which was also confirmed by FT-IR analysis. Particle size and stability were determined by DLS. The modified particles (MagAlg\_mPEG and MagAlg\_cPEG) form a stable colloidal dispersion with a narrow size distribution in the environment of phosphate buffer PBS inducing physiological conditions.

*In vitro* study accomplished on two tumor cell lines, HeLa and SK-BR-3, included viability assay, analysis of cell cycle and reactive oxygen species detection assay. The results showed that both types of modified nanoparticles show low toxicity and excellent biocompatibility in the whole range of tested concentrations (25 – 500 µg/ml).

Based on these results, it is planned to continue with the experiment by binding a fluorescent antibody with high affinity to the HER2/neu receptor overexpressed by SK-BR-3 breast cancer tumor cells and a subsequent verification of the system-receptor binding.

## REFERENCE

1. Heiligtag, F. J. & Niederberger, M. The fascinating world of nanoparticle research. *Biochem. Pharmacol.* **16**, 262–271 (2013).
2. Gubin, S. P., Koksharov, Y. A., Khomutov, G. B. & Yurkov, G. Y. Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. *Russ. Chem. Rev.* **74**, 489–520 (2005).
3. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
4. Machala, L., Tuček, J. & Zbořil, R. Polymorphous transformations of nanometric iron(III) oxide: A review. *Chemistry of Materials* **23**, 3255–3272 (2011).
5. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. & Kim, W. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 023501 (2015).
6. Cornell, R. M. & Schwertmann, U. *The Iron Oxides*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/3527602097
7. Schmid, G. *Nanoparticles*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/3527602399
8. Klabunde, J. K. & Richards, M. R. *Nanoscale Materials in Chemistry*. (Wiley Blackwell, 2009).
9. Leslie-Pelecky, D. L. & Rieke, R. D. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of Materials* **8**, 1770–1783 (1996).
10. Wu, W. *et al.* One-pot reaction and subsequent annealing to synthesis hollow spherical magnetite and maghemite nanocages. *Nanoscale Res. Lett.* **4**, 926–931 (2009).
11. Demirer, G. S., Okur, A. C. & Kizilel, S. Synthesis and design of biologically inspired biocompatible iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* **3**, 7831–7849 (2015).
12. Thanh, N. T. *Magnetic Nanoparticles*. *CRC Press* **54**, (CRC Press, 2012).
13. Tajabadi, M. & Khosroshahi, M. E. Effect of Alkaline Media Concentration and Modification of Temperature on Magnetite Synthesis Method Using FeSO<sub>4</sub>/NH<sub>4</sub>OH. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 206–210 (2012). doi:10.7763/IJCEA.2012.V3.187
14. Lu, A. H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition* **46**, 1222–1244 (2007).

15. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
16. Lee, J., Isobe, T. & Senna, M. Magnetic properties of ultrafine magnetite particles and their slurries prepared via in-situ precipitation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **109**, 121–127 (1996).
17. López-Quintela, M. A., Tojo, C., Blanco, M. C., García Rio, L. & Leis, J. R. Microemulsion dynamics and reactions in microemulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **9**, 264–278 (2004).
18. Gupta, A. K. & Wells, S. Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *IEEE Trans. Nanobioscience* **3**, 66–73 (2004).
19. Eslamian, M. & Shekarriz, M. Recent Advances in Nanoparticle Preparation by Spray and Microemulsion Methods. *Recent Pat. Nanotechnol.* **3**, 99–115 (2009).
20. Park, J. *et al.* Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat. Mater.* **3**, 891–895 (2004).
21. Jeong, U., Teng, X., Wang, Y., Yang, H. & Xia, Y. Superparamagnetic Colloids: Controlled Synthesis and Niche Applications. *Adv. Mater.* **19**, 33–60 (2007).
22. Woo, K. *et al.* Easy synthesis and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Chem. Mater.* **16**, 2814–2818 (2004).
23. Egerton, R. F. *Physical Principles of Electron Microscopy. Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM, Second Edition* (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-39877-8
24. Shao, D., Smolianova, I., Tang, D. & Zhang, L. Novel core-shell structured Si/S-doped-carbon composite with buffering voids as high performance anode for Li-ion batteries. *RSC Adv.* **7**, 2407–2414 (2017).
25. Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X. & Low, S. C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 1–14 (2013).
26. Polčík, M. Analyzátory velikosti částic. *Chemagazín* 28–29 (2010).
27. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release* **235**, 337–351 (2016).
28. Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.* (Wiley Blackwell, 2004).
29. Klíč, A., Volka, K. & Dubcová, M. *Fourierova transformace s příklady z infračervené spektroskopie.* (2012).
30. Günzler, H. & Williams, A. *Handbook of Analytical Techniques. Handbook of Analytical Techniques 1–2,* (Wiley, 2001).

31. Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K. & Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J.Phys.D: Appl. Phys.* **36**, R167–R181 (2003).
32. Kim, H. S., Lee, C.-G. & Lee, E. Y. Alginate lyase: Structure, property, and application. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16**, 843–851 (2011).
33. Gomathi, T., Susi, S., Abirami, D. & Sudha, P. N. Size Optimization And Thermal Studies On Calcium Alginate Nanoparticles. *IOSR J. Pharm.* 2250–3013 (2017).
34. Zoppellaro, G. *et al.* Theranostics of epitaxially condensed colloidal nanocrystal clusters, through a soft biomineralization route. *Chem. Mater.* **26**, 2062–2074 (2014).
35. Owens, D. E. & Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **307**, 93–102 (2006).
36. Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.* **53**, 283–318 (2001).
37. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D. & Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte Chemie - International Edition* **49**, 6288–6308 (2010).
38. Zhang, Y., Kohler, N. & Zhang, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **23**, 1553–1561 (2002).
39. Levy, L., Sahoo, Y., Kim, K., Bergey, E. J. & Prasad, P. N. Nanochemistry: Synthesis and Characterization of Multifunctional Nanoclinics for Biological Applications. *Chem. Mater.* **14**, 3715–3721 (2002).
40. Ramanujan, R. V. Magnetic Particles for Biomedical Applications. in *Biomedical Materials* 477–491 (2009). doi:10.1007/978-0-387-84872-3
41. Orive, G., Hernández, R. M., Gascón, A. R., Domínguez-Gil, A. & Pedraz, J. L. Drug delivery in biotechnology: present and future. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 659–664 (2003).
42. Alexiou, C. *et al.* Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting. *Cancer Res.* **60**, 6641–6648 (2000).
43. Issa, B., Obaidat, I., Albiss, B. & Haik, Y. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 21266–21305 (2013).

44. Christophi, C., Winkworth, A., Muralihdaran, V. & Evans, P. The treatment of malignancy by hyperthermia. *Surg. Oncol.* **7**, 83–90 (1999).
45. Laurent, S. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **110**, 2574–2574 (2010).
46. Andrade, A., Ferreira, R., Fabris, J. & Domingues, R. Coating Nanomagnetic Particles for Biomedical Applications. in *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges* (ed. Fazel-Rezai, R.) 157–176 (InTech, 2011). doi:10.5772/19519
47. Dale, B. M., Brown, M. A. & Semelka, R. C. *MRI Basic Principles and Applications. MRI Basic Principles and Applications* (John Wiley & Sons, Ltd, 2015). doi:10.1002/9781119013068
48. Sun, C., Lee, S. H. J. & Zhang, M. Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery Conroy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1252–1265 (2009).
49. Corot, C., Robert, P., Idée, J. M. & Port, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**, 1471–1504 (2006).
50. Chen, F., Ward, J. & Robinson, P. . MR imaging of the liver and spleen: a comparison of the effects on signal intensity of two superparamagnetic iron oxide agents. *Magn. Reson. Imaging* **17**, 549–556 (1999).
51. Lavaud, P. & Andre, F. Strategies to overcome trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancers: focus on new data from clinical trials. *BMC Med.* **12**, 132 (2014).
52. Sarigiannis, Y. *et al.* Synthesis and evaluation of condensed magnetic nanocrystal clusters with in vivo multispectral optoacoustic tomography for tumour targeting. *Biomaterials* **91**, 128–139 (2016).
53. Bakandritsos, A. *et al.* Doxorubicin nanocarriers based on magnetic colloids with a bio-polyelectrolyte corona and high non-linear optical response: Synthesis, characterization, and properties. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 1465–1475 (2011).
54. Fang, C., Bhattarai, N., Sun, C. & Zhang, M. Functionalized Nanoparticles with Long-Term Stability in Biological Media. *Small* **5**, 1637–1641 (2009).