

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Příprava biologicky aktivních nanočástic oxidů
železa s laktoferinem a jejich vliv na cytotoxicitu
zdravých a nádorových buněčných linií**

Autor: **Nikola Mannová**

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

Studijní obor: **Nanotechnologie**

Forma studia: **Prezenční**

Rok: **2019**

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Nikola Mannová

Název práce: Příprava biologicky aktivních nanočástic oxidů železa s laktoferinem a jejich vliv na cytotoxicitu zdravých a nádorových buněčných linií

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra experimentální fyziky

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

Rok obhajoby práce: 2019

Počet stran: 81

Počet příloh: 1

Jazyk: čeština

Abstrakt:

Předložená diplomová práce se zabývá přípravou superparamagnetických nanočástic oxidů železa s navázaným proteinem laktoferinem pro biomedicínské využití. Teoretická část představuje přehled a aktuální poznatky o nanomateriálech, jejich toxicitě, biomedicínských aplikacích a také popisuje biologicky aktivní látku laktoferin, která má protizánětlivé a antikarcinogenní vlastnosti. V experimentální části je nejprve popsána příprava a charakterizace komplexu složeného ze superparamagnetických nanočástic oxidů železa s konjugovaným laktoferinem pomocí kovalentní vazby a poté jsou shrnuty výsledky nezávislých testů cytotoxicity na zdravých a nádorových buněčných liniích. Připravený systém složený z nanočástic magnetitu a laktoferinu je vysoce biokompatibilní a může být využit pro biomedicínské aplikace jako kontrastní látka pro magnetickou rezonanci s možnými terapeutickými účinky či afinitou k nádorovým či zánětlivým buňkám.

Klíčová slova: superparamagnetické oxidy železa, laktoferin, in vitro testování, viabilita

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Nikola Mannová

Title: The preparation of biologically active lactoferrin conjugated iron oxide nanoparticles and their influence on cytotoxicity of healthy and tumour cell lines

Type of thesis: master

Department: Department of Experimental Physics

Supervisor: Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.

Year of presentation: 2019

Number of pages: 81

Number of appendices: 1

Language: czech

Abstract:

The following master thesis is focused on a preparation of lactoferrin conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for a biomedical usage. The theoretical part begins with a summary and actual knowledge in the field of nanomaterials, their toxicity and a potential biomedical usage. Also, this part describes a biologically active protein lactoferrin, which has anti-inflammatory and anticarcinogenic properties.

The second experimental part of the thesis describes the preparation and characterization of a complex composed of lactoferrin conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a covalent bonding. After that thesis includes results of independent cytotoxicity assays on healthy and tumour cell lines. The prepared complex of magnetite nanoparticles and lactoferrin is highly biocompatible and it can be used for biomedical applications, mainly as contrast agent for magnetic resonance imaging. This contrast agent would also have an affinity to cancer or inflammatory cells and possible therapeutic effects.

Keywords: superparamagnetic iron oxide, lactoferrin, in-vitro testing, viability

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Kateřiny Polákové, Ph. D. 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.

OBSAH

ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1. NANOMATERIÁLY A NANOČÁSTICE	10
1.1. Specifické vlastnosti spojené s nanorozměrem	10
1.2. Superparamagnetické nanočástice oxidů železa	11
2. NANOTOXIKOLOGIE	13
2.1. Fyzikální a chemické vlastnosti ovlivňující toxicitu nanomateriálů	13
2.1.1. Závislost nanotoxicity na velikosti částic	13
2.1.2. Závislost nanotoxicity na tvaru nanočástic	15
2.1.3. Závislost nanotoxicity na prostředí	15
2.1.4. Závislost nanotoxicity na povrchovém náboji a obalu	16
2.2. Mechanismy nanotoxicity	16
2.2.1. Oxidační stres	16
2.2.2. Ekotoxicita	19
2.2.3. Genotoxicita	19
3. VYUŽITÍ NANOTECHNOLOGIÍ V MEDICÍNĚ	21
3.1. Nanotechnologie pro medicínské využití	21
3.2. Potenciální využití nanotechnologií v medicíně	21
3.2.1. Cílené doručování léčiv	22
3.2.2. Pokrok v diagnostice	22
3.3. Využití nanočástic oxidů železa v medicíně	23
3.3.1. Kontrastní látky pro zobrazování MRI	23
3.3.2. Doručování léčiv	24
3.3.3. Hypertermie	24
4. RAKOVINA A JEJÍ PODSTATA	26
4.1. Co je to rakovina?	26
4.2. Rakovina a buněčný cyklus	28
4.3. Genetická podstata rakoviny	30
5. MLÉKO A JEHO BÍLKOVINY	30

6. LAKTOFERIN.....	31
6.1. Historie výzkumu.....	31
6.2. Výskyt laktoferinu.....	31
6.3. Struktura laktoferinu	31
6.4. Vlastnosti a biologické aplikace laktoferinu.....	32
7. POTENCIÁLNÍ VYUŽITÍ KOMPLEXU SPIO-Lf	33
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
1. MATERIÁL A METODY	35
1.1. Použité materiály.....	35
1.1.1. Nanočástice	35
1.1.2. Laktoferin.....	36
1.2. Metody charakterizace nanočástic	36
1.2.1. Transmisní elektronová mikroskopie	36
1.2.2. Dynamický rozptyl světla.....	36
1.3. Imobilizace laktoferinu.....	39
1.4. Bradfordova metoda	40
1.5. Práce s buňkami.....	40
1.5.1. Kultivace buněk.....	41
1.5.2. Pasážování a rozesazování buněk	41
1.5.3. Počítání buněk	42
1.5.4. Značení buněk	42
1.6. Testy viability.....	43
1.6.1. MTT test.....	43
1.6.2. Měření oxidačního stresu.....	43
1.6.3. Měření viability pomocí průtokového cytometru.....	44
2. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	46
2.1. Transmisní elektronová mikroskopie.....	46
2.2. Dynamický rozptyl světla	49
2.3. Imobilizace laktoferinu.....	51
2.4. Bradfordova metoda	52
2.5. Značení buněk.....	53
2.6. MTT test	60

2.7. Měření hladiny ROS.....	64
2.8. Průtokový cytometr	66
ZÁVĚR.....	69
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	70
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	72
PŘÍLOHA	81

ÚVOD

Léčba nádorových onemocnění je stále velice aktuální téma, kterým se zabývá nespočet vědeckých odvětví. Rychle se rozvíjející obor nanotechnologií nabízí novou alternativu, která by mohla vést k účinnější léčbě nádorových onemocnění.

V této diplomové práci představujeme koncept léčivé a zároveň kontrastní látky propojující již známé antikarcinogenní účinky mléčného proteinu laktoferinu a výhody superparamagnetických nanočástic oxidů železa. Cílem práce je zjistit, zda námi připravený komplex vykazuje antikarcinogenní účinky *in vitro* či zda nemá vliv na viabilitu zdravých a nádorových buněčných linií.

Superparamagnetické nanočástice oxidů železa mohou být samy o sobě účinnou látkou v boji proti rakovinovým buňkám tzv. hypertermií. Nicméně v této práci byly použity jako magnetické nosiče léčivé látky, které se dají sledovat pomocí magnetické rezonance (MRI). Navázaný laktoferin má již prostudované antikarcinogenní účinky a zároveň schopnost zmírnění vedlejších účinků chemoterapií. [15][22][23][24] Navíc tento protein je stejně jako jemu podobný transferin schopen proniknout hematoencefalickou bariérou, čímž vzniká možnost pokroku v léčbě problematických gliomů, tedy nádorů mozku. Dále díky dobré odezvě magnetických nanočástic na vnější magnetické pole by bylo možné celý komplex pomocí magnetického pole navádět až k místu nádoru a zmírnily by se tím nežádoucí vedlejší účinky.

Potenciál tohoto komplexu v léčbě rakoviny je tedy velmi rozmanitý. Diplomová práce se nejdříve zabývá teoretickou rešerší a seznámením se s molekulární biologii nádorových buněk a fyzikální podstatou superparamagnetických nanočástic i se samotným laktoferinem. Následně se práce zmiňuje o výsledcích dosavadních studií u podobných komplexů.

Druhá část diplomové práce se věnuje přípravě a charakterizaci komplexu superparamagnetických nanočástic oxidů železa s laktoferinem a následně *in vitro* testování tohoto systému na zdravých a nádorových buněčných liniích.

TEORETICKÁ ČÁST

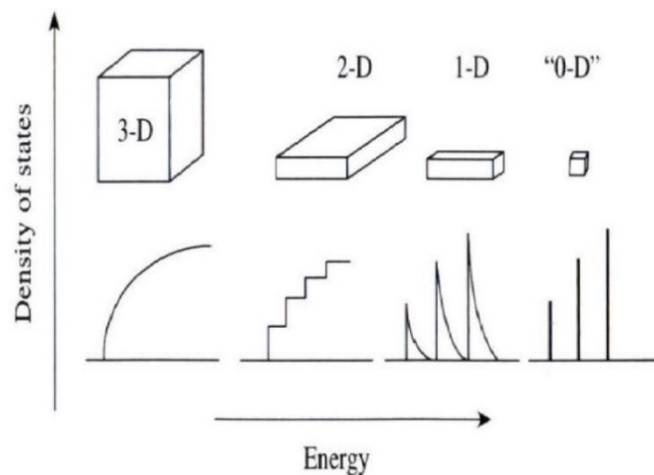
1. NANOMATERIÁLY A NANOČÁSTICE

Z definice Evropské agentury pro chemické látky ECHA (European Chemical Agency) pod pojmem nanomateriály rozumíme: „Chemické látky nebo materiály skládající se z částic, jejichž velikost se minimálně v jednom rozměru pohybuje od 1 do 100 nanometrů.“ [1]

Díky specifickým fyzikálně-chemickým změnám spojeným s nanorozměrem nanomateriály často vykazují jiné vlastnosti, než má jejich makroskopická verze. S touto změnou je spojena nutnost výzkumu těchto vlastností a s nimi spojená toxicita, nebezpečnost pro životní prostředí, degradabilita atd. [1][2]

1.1. Specifické vlastnosti spojené s nanorozměrem

Rozdílné vlastnosti nanomateriálů jsou způsobeny hlavně dvěma skupinami jevů. První skupinou jsou **jevy spojené s konečným rozměrem částic** neboli kvantové jevy, kam patří například superparamagnetismus či jednodomérovost. Jsou to jevy spojené s omezením pohyblivosti elektronu neboli omezení delokalizace elektronu. Buďto se jedná o omezení v jednom rozměru – nanofilmy a nanovrstvy, dvou rozměrech v případě nanodrátů či ve všech třech rozměrech, jak je tomu například u kvantových teček. V případě kvantových teček (popř. nanočástic se všemi třemi rozměry pod 100 nm) se tyto jevy projevují ve formě diskrétního energetického spektra, které reprezentuje jednotlivé dovolené energetické hladiny, na kterých se může elektron vyskytovat. To je další odlišnost od objemových verzí materiálů, které se vyznačují spojitým energetickým spektrem (obrázek č. 1). [3][4]



Obrázek č. 1: Hustota elektronových stavů pro makroskopickou verzi materiálu (3-D), nanofilmy (2-D), nanodráty (1-D) a kvantové tečky/nanočástice („0-D“). Převzato z [5].

Druhou skupinou jsou **povrchové jevy**. Projevují se zvýšením počtu atomů na povrchu se zmenšujícím se rozměrem částice či spinové vychýlení a vznik výměnné anizotropie. Zvýšení počtu atomů na povrchu má hned několik důsledků – zvýšení schopnosti adsorpce na povrch částic, porušení vnitřní struktury na povrchu, vyšší reaktivnost materiálu atd. [4]

1.2. Superparamagnetické nanočástice oxidů železa

Obecně se oxidy železa dělí na hydratované (minerály – goethit atd.) a nehydratované formy. Mezi nehydratované formy oxidů železa patří: [4]

- oxid železitý Fe_2O_3
 - $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit)
 - $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$
 - $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit)
 - $\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$
- oxid železnato-železitý Fe_3O_4 (magnetit)
- oxid železnatý FeO (wüstit)

Oxid železitý má čtyři fáze. V přírodě se ale vyskytuje pouze alfa a gama fáze, a to jak v podobě makroskopické, tak nanoskopické. Beta a epsilon fáze se dá syntetizovat v nanočásticové podobě. Syntéza je ale náročná a vzniklé nanočástice jsou teplotně nestabilní, tudíž se mají tendenci se vzrůstající teplotou modifikovat na teplotně stabilnější fázi. [4]

Nejvyužívanějšími oxidy železa v nanotechnologiích jsou maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a magnetit (Fe_3O_4). Díky jejich podobné struktuře (jediný rozdíl je obsah vakancí v krystalické struktuře maghemitu) vykazují i podobné vlastnosti a jejich využití je prakticky identické. Ve své makroskopické podobě se jedná o látky ferimagnetické. Avšak při přesunu do nanoskopického měřítko se magnetit i maghemit stávají za určitých podmínek látkami superparamagnetickými. [4]

Mezi jedny z nejdůležitějších magnetických nanomateriálů patří superparamagnetické nanočástice oxidů železa neboli SPION (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles). SPION nabízí široké spektrum aplikací v biomedicínské oblasti – např. zobrazování pomocí MRI, cílené doručování léčiv, značení buněk, zaměřování a oprava tkání, hypertermie. Současně mohou superparamagnetické nanočástice oxidů železa zvyšovat účinnost chemoterapeutických léčiv tím, že léčivo doručí a uvolní až v cílené oblasti. Avšak i SPION mají v této oblasti svá omezení. Mezi ně patří hlavně tendence vytvářet agregáty. Agregace totiž výrazně ovlivňuje biokompatibilitu a superparamagnetické vlastnosti a zvyšuje pravděpodobnost fagocytózy buňkami imunitního systému (opsonizace). Samotné nanočástice oxidů železa ještě výrazně zvyšují produkci volných kyslíkových radikálů (ROS – z angl. reactive oxygen species), čímž způsobuje oxidační stres. Tyto omezení se dají ale snadno obejít vhodným obalením nanočástice. [6]

Podle průměru se nanočástice dělí na několik kategorií: [7]

- **SPIO** – superparamagnetické nanočástice oxidů železa s průměrem větším jak 50 nm
- **USPIO** – ultramalé superparamagnetické nanočástice oxidů železa s průměrem mezi 10–50 nm
- **VSPIO** – velmi malé superparamagnetické nanočástice oxidů železa s průměrem pod 10 nm

Pro intravenózní podání nanočástic se udává jako neoptimálnější velikost nanočástic oxidů železa od 10 nm do 100 nm. Nanočástice s průměrem nad 200 nm bývají zpravidla odstraněny z krevního oběhu retikuloendotelovým systémem (RES). [6]

Obecně jsou superparamagnetické nanočástice oxidů železa díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a mnoha aplikačně atraktivním vlastnostem hojně využívané ve výzkumu využití nanomateriálů v medicíně – viz kapitola 3.3.

2. NANOTOXIKOLOGIE

Za nanotoxikologii považujeme vědní disciplínu, ve které dochází ke stanovení toxikologických vlastností nanomateriálů s úmyslem určit, zda a popřípadě v jaké míře může nanomateriál představovat hrozbu pro společnost i životní prostředí. Díky malé velikosti mají nanomateriály jedinečné chemické a fyzikální vlastnosti jako například vlastnosti magnetické, optické, elektrické a mechanické. Tyto nové vlastnosti vytváří možnost využití v mnoha aplikacích, ve kterých jsou jejich objemové protějšky nepoužitelné nebo přinejmenším nevýhodné. Zmíněné využití lze nalézt např. v medicíně, elektronice, optice, energetice a v mnoha konzumních přípravcích. Ale i právě kvůli těmto nově nabytým vlastnostem přichází nová rizika pro společnost a životní prostředí. [8]

2.1. Fyzikální a chemické vlastnosti ovlivňující toxicitu nanomateriálů

Chování nanočástic v různých prostředích je velmi komplexní a zahrnuje mnoho procesů. Velký vliv na výsledné chování a toxicitu nanomateriálu mají právě jeho specifické vlastnosti. Mezi vlastnosti, u kterých je známo, že ovlivňují toxicitu nanomateriálu, patří: [8]

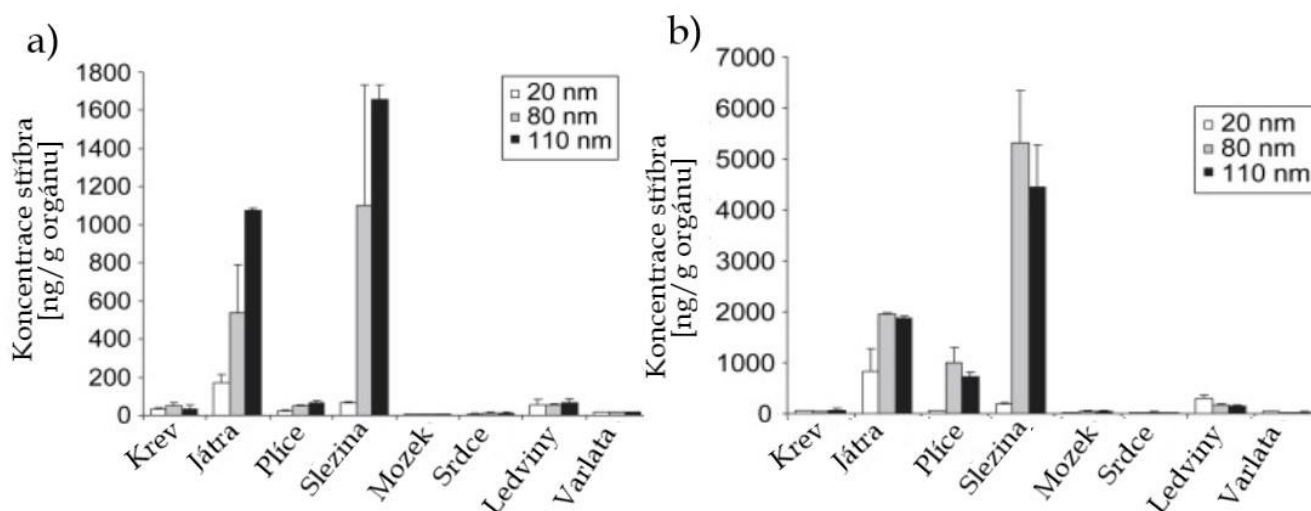
- velikost nanočástic
- obalový materiál nanočástic
- specifická velikost povrchu a povrchový náboj
- tvar a struktura
- rozpustnost

2.1.1. Závislost nanotoxicity na velikosti částic

Nanočástice dokáží díky své malé velikosti proniknout buněčnými membránami a jinými biologickými bariérami do živých organismů a poškodit buňky. Jelikož většina studií potvrdila zvýšenou toxicitu nanočástic oproti jejich makroskopickým protějškům, automaticky se začalo předpokládat, že nano-verze materiálu má větší potenciál způsobit škody. [8]

Doktorka Lankveld a kol. ve své studii potvrdili důležitost vlivu velikosti částice (konkrétně u stříbrných nanočástic) na jejich distribuci ve tkáni. Akumulace nanočástic v určitém orgánu může výrazně zvýšit jejich toxické účinky. Ve studii

byla vyzpozorována největší akumulace nanočástic o velikosti 20 nm v játrech a následně v ledvinách a slezině. Zato u nanočástic o velikostech 80 nm a 110 nm akumulace proběhla hlavně ve slezině a následně játrech a plicích. U ostatních orgánů nebyl pozorován vliv velikosti nanočástic. Studie byla provedena na kryších. Výsledné grafy popisující distribuci nanočástic v jednotlivých orgánech po jedné injekci (obrázek č. 2a) a po pěti po sobě následujících injekcích (obrázek č. 2b) jsou vyobrazeny na obrázku č. 2. [9]



Obrázek č. 2: Průměrná koncentrace stříbra v jednotlivých orgánech kryš a) po jedné injekci, b) po pěti po sobě následujících injekcích. Převzato a upraveno z [9].

Studie provedená doktorkou T. M. Scownovou a kol. zase ukazuje, že nejnižší potenciál k agregaci mají nanočástice stříbra s nejmenší velikostí (konkrétně se ve studii porovnávali výsledky pro velikosti – 10 nm, 35 nm a 600–1600 nm). Současně ale právě tyto nejmenší nanočástice se v největší koncentraci vyskytovaly po provedení testu v žábřích a játrech zkoumaných ryb – Pstruhů duhových. [10]

Další studie provedená doktorkou B. K. Gaiserovou a kol. zase porovnávala akutní a chronickou toxicitu mikročástic a nanočástic stříbra a oxidu ceričitého (CeO_2). Výsledky studie stanovují tyto úmrtnosti. Pro stříbro v mikroskopické velikosti pro koncentraci 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ činila úmrtnost 13 %, zatímco pro koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ úmrtnost byla už 80 %. Pro nanočástice stříbra jsou ale hodnoty jiné – pro koncentraci 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ byla naměřena úmrtnost 57 % a pro koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se úmrtnost vyšplhala až ke 100 %. Zatímco nanočástice i mikročástice CeO_2 se při těchto hodnotách neprojevily toxické. Měření bylo prováděno na Hrotnatkách velkých neboli *Daphnia magna*. Ve studii se následně provádělo cytotoxické měření na lidských hepatocytech a na hepatocytech pstruha, kde se měřila nejnižší koncentrace, u které se na buňkách projevila toxicita materiálu. Pro lidské hepatocyty koncentrace byly 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro nanočástice stříbra, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro mikročástice stříbra a více jak 1 mg/ml pro nanočástice i mikročástice CeO_2 .

U hepatocytů pstruha se hodnoty lišily. Nejnižší toxické koncentrace byly 1 mg/ml pro nanočástice stříbra a více jak 1 mg/ml pro mikročástice stříbra a nanočástice i mikročástice CeO₂. [11]

2.1.2. Závislost nanotoxicity na tvaru nanočástic

Ačkoliv velikost částic hraje nejvýznamnější roli ve výsledné toxicitě nanomateriálu, dalším důležitým faktorem je tvar a morfologie nanomateriálu. Morfologie hraje i významnou roli v kinetice nanočástic a jejich transportu v daném prostředí. [8]

Význam vlivu tvaru nanočástice na toxicitě byl ukázán ve studii pod vedením doktora Pala, kde bylo ukázáno, že trojúhelníkové nanopláty stříbra byly více toxické a měly větší inhibiční účinky na *Escherichia coli* než sférické či tyčinkovité nanočástice stříbra. Tento výsledek lze přiřadit větší reaktivitě a vyšší hustotě atomů na povrchu trojúhelníkových nanoplátů. [12][13]

2.1.3. Závislost nanotoxicity na prostředí

Agregace a rozklad nanomateriálu v prostředí jsou klíčové procesy pro chování a výslednou toxicitu materiálu – hlavně tedy ve vodních prostředích. Tyto procesy jsou z velké části ovlivněny už zmíněnou velikostí a povrchovými vlastnostmi nanomateriálu, ale také se na nich významně podílí stabilita okolního prostředí. Ta může být ovlivněna hned několika faktory jako je například teplota, pH a iontová síla. [8]

Studie vedená doktorkou Römerovou a kol. měřila stabilitu stříbrných nanočástic. Výsledkem bylo zjištění, že s rostoucí iontovou silou rapidně stoupá agregace nanočástic v médiu. [14]

Doktorka Chavon R. Waltersová a kol. z Jihoafrické republiky zase poukázali v jejich měření na fakt, že při rostoucích teplotách dochází k vyšší toxicitě právě kvůli tvorbě menších agregátů. [15][16]

Těmito, a i jinými studiemi [17] byl potvrzen vliv schopnosti agregace na schopnosti proniknout nanočástic do organismu a tím i na toxicitu materiálu. [8]

Už výše zmíněná studie provedená skupinou vedenou doktorkou Waltersovou ukazuje význam teploty na výslednou toxicitu nanomateriálu. [16][17] K podobným výsledkům došla i studie vedená doktorkou Jingyu Liu a doktorem Robertem Hurtem z Brownovy univerzity, která zas ukazuje větší rozpustnost

(rozklad) nanočástic stříbra se zvyšující se teplotou, což má za důsledek opět zvýšenou toxicitu. [18]

2.1.4. Závislost nanotoxicity na povrchovém náboji a obalu

Povrchový náboj je rozhodujícím faktorem pro disperzitu a koloidní stabilitu nanočástic a významně ovlivňuje adsorpci iontů a biomolekul na povrch nanočástice. [19]

Doktor Baalousha ve své studii ukazuje, že s rostoucím povrchovým nábojem dochází k desagregaci nanočástic FeO. [20] Podobný vliv nasvědčuje i studie provedená doktorem Badawy a kol., která jasně ukazuje závislost toxicity nanočástic stříbra na velikosti povrchového náboje. [21]

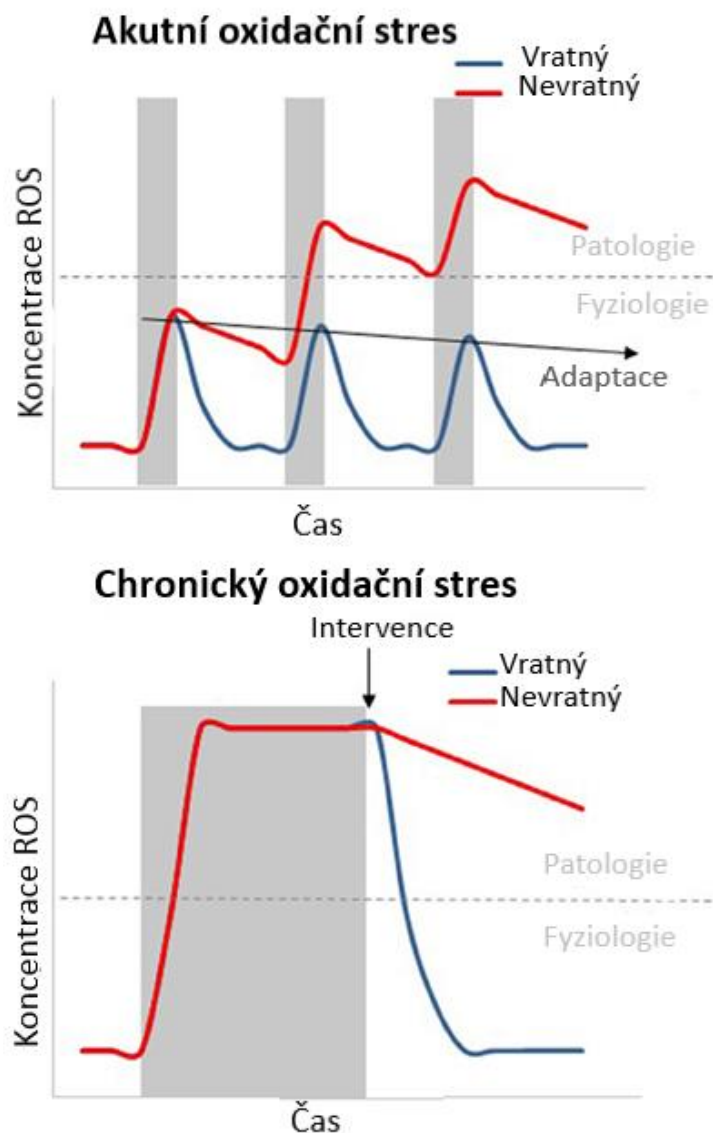
S povrchovým nábojem je nepřímě spojen i faktor obalu nanočástice. Mnoho nanočástic se právě pro zamezení agregace a rozkladu, zmírnění reaktivnosti a obecně zvýšení biokompatibility obalují. [8]

2.2. Mechanismy nanotoxicity

Toxicita nanomateriálů byla proměřena v mnoha studiích in vitro se zjištěním, že nanomateriály mohou mít několik negativních efektů na funkčnost buňky od narušení základních fyziologických funkcí po narušení stavby buňky. Měřené jsou efekty letální, kdy dochází k měření úmrtnosti buněk, tak efekty subletální, kdy se proměřují vlivy toxicity na vývoj buňky, růst, expresi genů, dýchání, malformaci buňky a např. i míru oxidačního stresu. [8]

2.2.1. Oxidační stres

Volné kyslíkové radikály (ROS) jsou přirozená reakce buňky na nepříznivé vlivy i vedlejší produkty několika buněčných reakcí. V malém množství se nejedná o žádný problém a antioxidanty typu - vitamín C, vitamín E, zinek, selen apod. jsou schopny tyto radikály vychytat. V tu chvíli se jedná o tzv. *vratný oxidační stres*. Bohužel pokud je produkce kyslíkových radikálů příliš velká či je snižená obranná funkce buňky (malé množství antioxidantů apod.) dochází k imbalanci, která už je nezvratitelná neboli k *oxidačnímu stresu nevratnému*. Typy oxidačního stresu v závislosti na koncentraci ROS, době a typu působení ROS jsou vyobrazeny na obrázku č. 3. [8][22]



Obrázek č. 3: Grafy zobrazující typy oxidačních stresů v závislosti na koncentraci volných kyslíkových radikálů a jejich typu působení. Převzato a upraveno z [23].

Nadbytečná produkce volných kyslíkových radikálů může mít několik negativních důsledků na fyziologické funkce buňky - např. oxidativní modifikace proteinů (ztráta funkčnosti), vznik proteinových radikálů [24], lipidová peroxidace (poškození membrán) [25], zlomy na DNA a následná modifikace nukleových kyselin (oxidace DNA, mutace) [26], ovlivnění exprese genů [27]. Všechny tyto důsledky následně vedou ke genotoxicitě či úplné apoptóze buňky. [8][28]

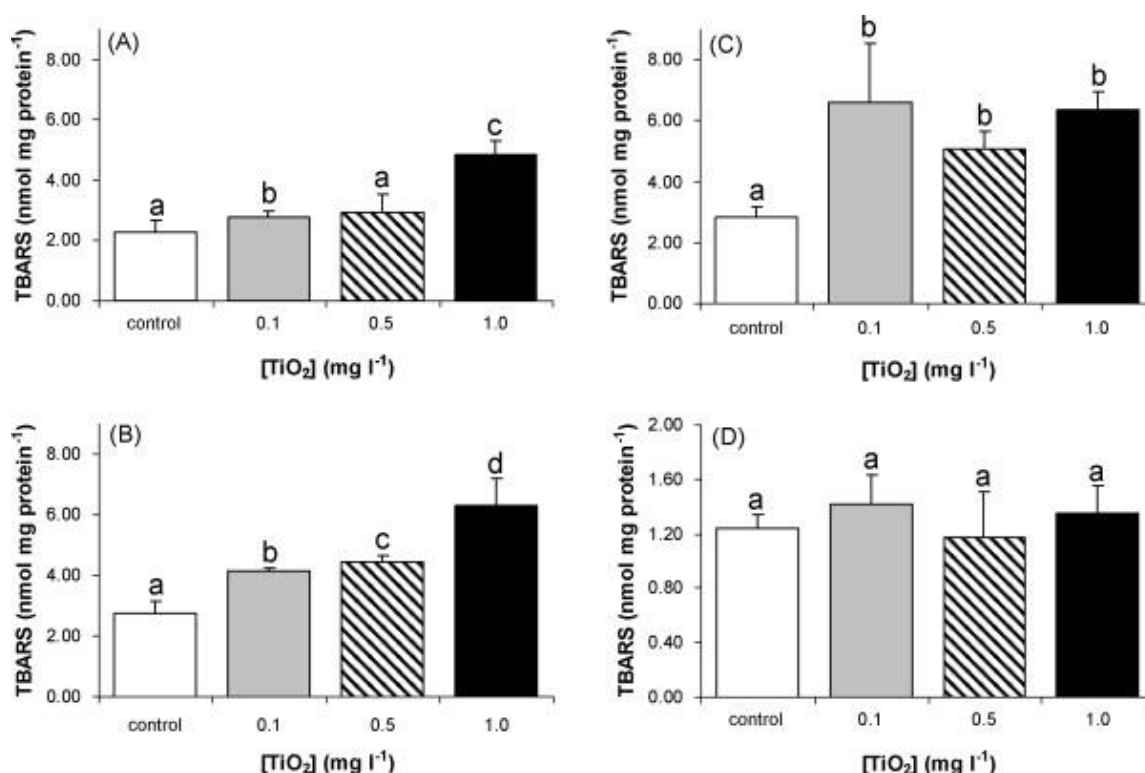
Potenciální role oxidačního stresu jako mechanismu toxicity byla tedy prozkoumána hned několika autory. Například už dříve zmíněná studie vedená doktorkou Waltersovou a kol. zkoumá oxidační stres (konkrétně enzymovou

aktivitu antioxidantů) při sedmidenním vystavení stříbrným nanočásticím o velikosti přibližně 100 nm a koncentracích 10 µg/ml a 100 µg/ml. Autoři zjistili jasnou závislost míry oxidačního stresu na koncentraci nanočástic. [16]

Další studie pod vedením doktorky Gillian Federici zkoumá míru oxidačního stresu při dvoutýdenním vystavení nanočásticím TiO₂ o velikosti přibližně 21 nm a koncentracím 100 µg/ml, 500 µg/ml a 1000 µg/ml. [29]

Počet kyslíkových radikálů byl měřen konkrétně přes množství potencionálního mutagenu MDA (malondialdehyd) vznikajícího při lipidové peroxidaci. Množství MDA se dá totiž velmi jednoduše stanovit spektrofotoskopicky pomocí metody měření TBARS (z angl. thiobarbituric acid reactive substances = reaktivní sloučeniny kyseliny thiobarbiturové), kdy při reakci kyseliny thiobarbiturové a malondialdehydu vznikají barevné adukty, jejichž množství se spektrofotoskopicky vyhodnotí. [8][30]

Z grafů na obrázku č. 4 lze vyčíst hodnoty kyslíkových radikálů (konkrétně TBARS) v a) žábřách, b) střevu, c) mozku a d) játrech Pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), kde je jasně znázorněna závislost na koncentraci nanočástic TiO₂. [29]



Obrázek č. 4: Závislost koncentrace reaktivních sloučenin kyseliny thiobarbiturové (TBARS) na koncentraci nanočástic TiO₂ v (A) žábřách, (B) střevu, (C) mozku a (D) játrech Pstruha duhového po dvoutýdenním vystavení 0 µg/ml (bílý sloupec), 100 µg/ml (šedý sloupec), 500 µg/ml (šrafovaný sloupec) a 1000 µg/ml (černý sloupec). Převzato z [29].

2.2.2. Ekotoxicita

Potenciál ekotoxicity nanomateriálů vzbudil obecný zájem veřejnosti a odstartoval mnoho vědeckých debat o rizicích a benefitech těchto materiálů. Díky tomu v posledních letech vzniklo mnoho studií na zjištění ekotoxikologických efektů používaných nanomateriálů. Podstatná část se soustředila na vliv nanomateriálů na vodní organismy. Bylo zjištěno, že nanomateriály (v tomto případě konkrétně nanočástice) mohou být toxické pro bakterie, řasy, bezobratlé, ryby i savce. Bohužel díky provádění testů na omezeném množství druhů živočichů je spektrum výsledků měření ekotoxicity nanomateriálů velmi úzké. Většina nyní prováděných ekotoxikologických testů se provádí na Hrotnatkách velkých (*Daphnia magna*). Tyto korýši totiž představují most mezi řasami a rybami, tudíž se zvyšuje obecná relevantnost studie. [8]

Obecně se studie shodují, že nanomateriály vykazují vyšší ekotoxicitu než jejich makroskopické protějšky, což vedlo k předpokladu, že nanomateriály představují větší potenciální hrozbu pro životní prostředí. [8]

Jedna z těchto studií například ukazuje rozdíl v toxicitě pro nanoskopické a mikroskopické verze několika materiálů. Autoři měřili koncentraci, při které dochází k úhynu 50 % Hád'átek obecných (*Caenorhabditis elegans*) z kmene hlístnic po 24 hodinách od naznačení. Pro nanočástice Al_2O_3 je tato koncentrace 82 $\mu\text{g}/\text{ml}$, zatímco pro mikroskopické Al_2O_3 je koncentrace téměř dvojnásobná - 153 $\mu\text{g}/\text{ml}$. U oxidu titaničitého TiO_2 zas nanočástice dosahovaly koncentrace 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a mikroskopické částice až 136 $\mu\text{g}/\text{ml}$. [31]

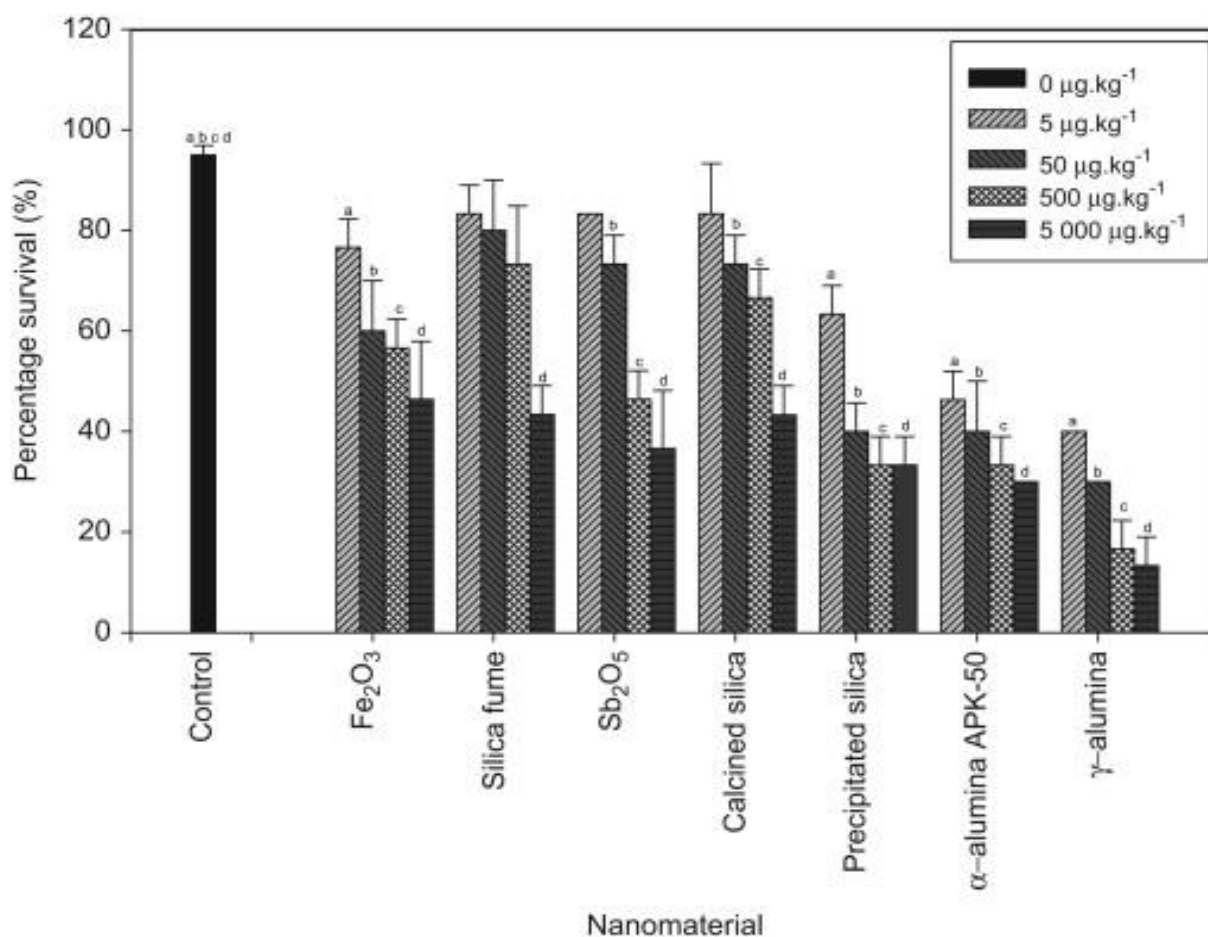
2.2.3. Genotoxicita

Díky schopnosti nanočástic proniknout buněčnými membránami, mají nanočástice schopnost poškodit genetický materiál buňky. [7][8] Právě z tohoto důvodu bylo provedeno nespočet in vitro studií pro definování možné genotoxicity nanomateriálů. Mezi zjištěné genotoxické efekty nanomateriálů se řadí např. fragmentace chromozomů, zlomy na DNA, bodové (genové) mutace, adukty na DNA a alterace v expresi genů, které mohou spustit či podpořit mutagenezi a karcinogenezi. [32]

Genotoxicita se dělí na: [32]

- **primární** – tedy vznikající při přímé interakci nanomateriálu s DNA po internalizaci nanomateriálu do buňky
- **sekundární** – vznikající jako důsledek oxidačního stresu a generace vysokého množství ROS

Studie provedená doktorem Paul J. Oberholsterem a kol. se zabývá měřením genotoxicity a její závislost na koncentraci u několika typů nanomateriálů. Měření bylo provedeno na larvách pakomárů *Chironomus tentans*. V této studii byly měřeny zlomy na DNA jako indikátory genotoxicity. Pouze čtyři z vybraných nanomateriálů nevykazovaly toxicitu. Jedná se o amorfnní Fe_2O_3 při koncentraci $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, silica fume (při koncentracích $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ a $50 \mu\text{g}/\text{kg}$), Sb_2O_5 (koncentrace $5 \mu\text{g}/\text{kg}$) a kalcinovaný křemen (koncentrace $5 \mu\text{g}/\text{kg}$). Zato nejnižší viabilita (13%) byla naměřena pro vzorek γ -alumina při nejvyšší koncentraci $5000 \mu\text{g}/\text{kg}$. Výsledků si můžete povšimnout na obrázku č. 5. [33]



Obrázek č. 5: Graf viability pro jednotlivé nanomateriály a koncentrace. Převzato z [33].

Koncentrace není jediné, co ovlivňuje výslednou genotoxicitu. Vliv má například také velikost nanočástice. Bylo provedeno několik studií, které poukazují, že menší nanočástice (např. 10 nm TiO₂ nanočástice) způsobují větší chromozomální škody než nanočástice větších rozměrů (např. 200 nm TiO₂). [8][34] Tento efekt není pouze způsoben schopností menších nanočástic proniknout do buňky a do jádra, ale i zvýšenou reaktivitou menších nanočástic. [35][36]

Dalším faktorem ovlivňující genotoxicitu je obal nanočástice. Na tomto efektu postavil svou studii doktor Hong a kol., ve které naměřili zvýšené zlomy v DNA při obalení superparamagnetických nanočástic oxidů železa obalem s pozitivním nábojem. Zato u obalů s negativním nábojem byl vliv na genotoxicitu zanedbatelný. [37]

Podobně studie vedená doktorem Lui a kol. ukazuje hned několik genotoxických výsledků u nanočástic oxidů železa podle jednotlivých obalení nanočástic. Polyethylenglykol (PEG) vykazoval zvýšenou genotoxicitu vedoucí až k mutagenезi, zatímco např. interfáze pevných elektrolytů (SEI) nezpůsobila žádné zvýšení genotoxicity. [38]

3. VYUŽITÍ NANOTECHNOLOGIÍ V MEDICÍNĚ

3.1. Nanotechnologie pro medicínské využití

Nanotechnologie jsou přímo spojeny s rozvojem medicíny. Hlavním důvodem je, že většina pro medicínu relevantních procesů probíhá právě v nanoměřítku – např. buněčné signály, aktivita enzymů a buněčný cyklus. Nanotechnologie poskytují nástroje pro pochopení struktury tkání, tudíž nabízí i možnost syntézy biomateriálů pro jejich léčbu či úplnou náhradu. [39]

Všechny tyto výhody poskytnuté rozvojem nanotechnologií umožňují i vytvářet cílené léky, které přesně reagují s jednotlivými proteiny a nukleovými kyselinami zodpovídajícími za danou poruchu či onemocnění. Další možností je doprava organických makromolekul na jejich dané reakční místo a jejich ochrana před degradací a imunitní odpovědí těla. [39]

3.2. Potenciální využití nanotechnologií v medicíně

Ačkoliv představy neodborné veřejnosti na budoucí využití nanotechnologií v medicíně jsou zatím nereálné (nanoboti provádějící operace atd.), potenciál nanotechnologií v tomto odvětví je obrovský. Ať už se jedná o snižování nákladů

a zvyšování efektivity již existujících léků, pokrok v diagnostice či výzkum nových léčiv. [39]

3.2.1. Cílené doručování léčiv

Existuje mnoho možností, jak zvýšit efektivitu léčiv a omezit vedlejší účinky léčiv pomocí nanotechnologií. Příkladem můžou být: [39]

- enkapsulace nanočástic pomocí polymerů s absorbovaným léčivem
- větvené nanočásticové systémy s kovalentně navázanými léčivy
- umělé či přírodní micely (lipozómy) obsahující nanodávky nerozpustného či toxického léčiva

Navíc díky možnosti kontrolování velikosti a obalu nanočástic je možné optimalizovat nanočástice jako nosiče nerozpustných a hydrofóbních léčiv. [39]

Velikost částic mezi 10 nm a 100 nm je totiž pro doručování léčiv ideální. Částice menší než 10 nm bývají odstraněny z krve filtrací v ledvinách a částice nad 100 nm se zase zpravidla akumuluje v orgánech jako jsou játra nebo žlučník. U větších částic může také docházet k zablokování krevních kapilár v plicích či jiných orgánech a ke vzniku embolie. [39]

Následné uvolnění léčiva může být kontrolováno pomocí pH s využitím faktu, že pH v nádorových tkáních je nižší než pH tkání zdravých. Další možností je funkcionalizace povrchu nanočástice specifickými látkami, které umožní lokalizaci nanočástic v nádoru či jiné cílené tkáni. Po doručení léčiva do vybrané oblasti dojde k uvolnění pomocí aplikace určité části spektra elektromagnetického záření. [39]

Konkrétní studie provedené na nanočásticích oxidů železa jsou popsány v kapitole č. 3.3.2.

3.2.2. Pokrok v diagnostice

Kontrolovatelná syntéza nanočástic poskytuje možnost vytváření nových kontrastních látek a nástrojů k diagnostice. Ty zpravidla poskytují více citlivé a selektivní zobrazování až na úroveň buněčných procesů. [39]

Velký pokrok byl zaznamenán hlavně u magnetických nanočástic – viz kapitola č. 3.3.1

3.3. Využití nanočástic oxidů železa v medicíně

Je obecně známo, že nanočástice oxidů železa mají vhodné vlastnosti pro jejich využití v medicíně. Mezi tyto vlastnosti spadá: [7][40]

- potenciál proniknout neporušenou hematoencefalickou bariérou
- prodloužený plazmový poločas
- minimální nežádoucí účinky - nízká toxicita
- možnost funkcionalizace povrchu
- superparamagnetické vlastnosti
- schopnost být pohlceny fagocytujícími buňkami

3.3.1. Kontrastní látky pro zobrazování MRI

Na rozdíl od ostatních kontrastních látek pro zobrazování pomocí MRI magnetické nanočástice oxidů železa se dají zobrazit nejen pomocí magnetické rezonance, ale i pomocí světla či elektronové mikroskopie, což umožňuje přesnou lokalizaci v tkáni (např. nervové tkáni). Bylo provedeno několik studií na porovnání kontrastních látek založených na paramagnetických vlastnostech gadolinia a kontrastních látek obsahujících nanočástice oxidů železa, konkrétně například komerčně dostupné nanočástice Ferumoxtran-10 (USPIO potažené dextranem). Jejich výsledkem byl viditelný zvýšený signál získaný z nádorových tkání, které nebyly s činidlem obsahujícím gadolinium viditelné. To je pravděpodobně způsobeno prodlouženým plazmovým poločasem a efektivním usazováním a akumulací v buňkách. [7]

S nanočásticemi oxidů železa byly také provedeny studie na pacientech po prodělání ischemické cévní mozkové příhody. Například klinické testy provedené skupinou vědců pod vedením Andrese Saleha ukazují zvýšení kontrastu na hranici poškozené části mozkové tkáně. Zvýšení signálu je důsledkem intravaskulární retence (udržení média uvnitř cév) a omezení extravazace (únik média mimo cévu), které zajišťují lepší kontrast mezi cévou a okolní částí s minimálními nežádoucími účinky. [41]

3.3.2. Doručování léčiv

Další studie využívají nanočástic jako nosičů doxorubicinu (Dox) v léčbě nádorů např. mozku. Doxorubicin je chemoterapeutická léčivá látka, která zastavuje syntézu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA). Bohužel díky svému náboji je velmi limitován její průchod přes hematoencefalickou bariéru po intravenózním podání. Biodistribuce nanočástic obalených PBCA (jedním z používaných poly(alkyl-kyanoakrylátů)) s navázaným doxorubicinem byla studována několika vědeckými skupinami. [7]

Doktor Couvreur a kol. ukázali, že díky PBCA-SPIO dochází k menší akumulaci Dox v srdci. Což je velmi důležitý důsledek, jelikož vysoká kardiotoxicita je jedna z hlavních nevýhod pro in vivo využití samotného doxorubicinu. [42]

Stejně skupina doktora Alexandra E. Gulyaeva demonstrovala, že nanočástice potažené PBCA dokáží po intravenózním podání dopravit vysoké koncentrace doxorubicinu do mozku. Zajímavé je, že oproti nanočásticím bez obalu, PBCA-SPIO prokazují menší akumulaci v orgánech retikuloendotelového systému (systému fagocytujících buněk rozmístěných po těle) – jako jsou např. játra, slezina a lymfatické uzliny. [43]

Efektivnost léčby pomocí PBCA-SPIO ukazuje studie provedená doktorem Sebastianem C.J. Steinigerem a kol. Výsledkem této studie je fakt, že více jak 20 % zvířat, konkrétně krys s intrakraniálním (nitrolebečním) glioblastomem, léčených intravenózně pomocí Dox-PBCA-SPIO přežilo přes 180 dní. Zatímco neléčená kontrolní skupina se dožívala v průměru 10–20 dní. [44]

3.3.3. Hypertermie

Metoda hypertermie spočívá v aplikaci střídavých magnetických polí na nanočástice, čímž se díky magnetickým ztrátám generuje teplo. Ke generaci tepla dochází v místě nádoru, kde se teplota udržuje většinou mezi 42–46°C. Výsledkem je zvýšení citlivosti nádorových buněk na léčbu (chemoterapeutickou, radioterapeutickou) až po smrt nádorové buňky. Díky angiogenezi (jednomu ze charakteristických znaků nádorových buněk – viz níže) mají nádorové tkáně jinou krevní stavbu než tkáně zdravé, což nádorům poskytuje dostatek živin pro jejich neustálé dělení, ale zároveň je činí citlivějšími na zvýšenou teplotu. [40][45]

Nanočástice oxidů železa získaly velkou pozornost jako možné médium pro léčbu nádorů hypertermií. [45] Existuje celá řada dalších materiálů, která se v dnešní

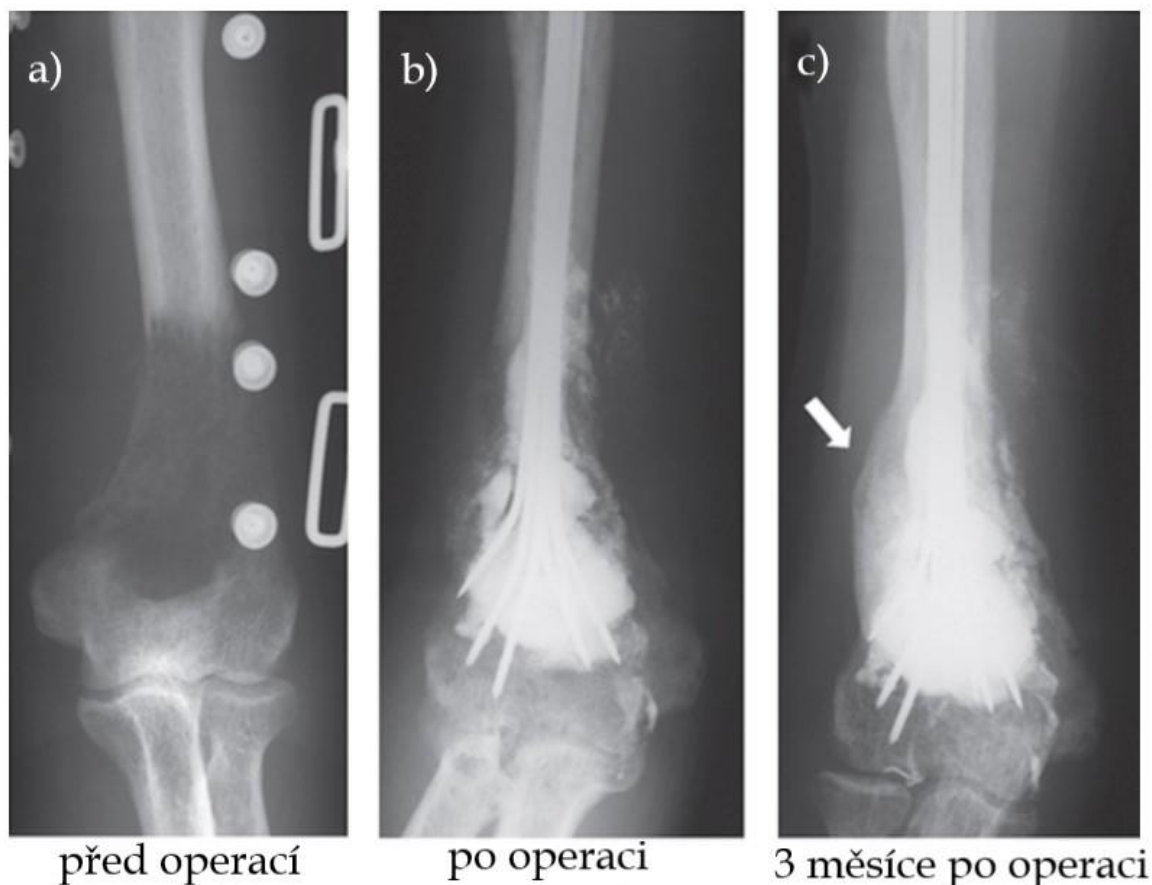
době testují jako potenciální média na léčbu hypertermií – např. FePt, ferity kobaltu, sloučeniny NdFeB atd. Avšak výhody maghemitu a magnetitu jsou zřejmé: [46]

- větší odolnost proti oxidaci oproti kovovým nanočásticím
- vysoká magnetizace
- produkce menšího množství ROS (biokompatibilita)
- relativně známý metabolismus (biodegradabilita)

Superparamagnetické nanočástice jsou vhodně obaleny (např. dextran) pro zabránění agregace a rozsuspendovány ve fyziologickém roztoku (0,9% roztok NaCl). Následně jsou vpíchnuty do cílené tkáně, kde jsou zahřívány. Navíc SPION slouží jako kontrastní média pro MRI (viz výše), čímž vzniká duální léčivo, které při terapii poskytuje rovněž možnost diagnostiky. [45]

Výhodou hypertermie také je, že na rozdíl od užití blízkého infračerveného záření pro záhřev, metoda hypertermie není negativně ovlivněna hloubkou cílené oblasti, jelikož tělo je obecně zcela transparentní pro magnetické pole. [45]

Doktor Matsumine a kol. provedli jednu z prvních klinických studií na aplikaci hypertermie u pacientů s kostními metastázemi. Léčba spočívala v prvotním chirurgickém zákroku, následovaném implantováním kostního cementu na bázi fosforečnanu vápenatého (CPC – z angl. calcium phosphate cement) smíchaného s magnetickými nanočásticemi. Studie byla provedena na 23 pacientech prezentujících 25 kostních metastáz. Ti byli léčeni metodou hypertermie každé dva dny po dobu 15 minut začínající osmým dnem po chirurgickém zákroku (byl použit generátor magnetického pole o výstupní frekvenci 1,5 MHz). Výsledkem studie bylo zjištěno, že 32 % metastáz bylo redukováno a byl u nich dokonce pozorován nárůst nové kostní hmoty (obrázek č. 6). U 64 % metastáz nebyl zaznamenán žádný růst či tvoření nových metastáz po více jak tři měsíce. A pouze u 4 % metastáz byla zaznamenána slabá odpověď na léčbu. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s výsledky léčby propojující chirurgický zákrok s radioterapií, tudíž poukazují na potenciál léčby hypertermií. [47]



Obrázek č. 6: Rentgenové snímky metastází rakoviny močového měchýře v pažní kosti - a) před operací, b) po odstranění léze, vyztužení dráty a vyplnění CPC s nanočásticemi magnetitu, c) po tříměsíční léčbě hypertermií - tvorba nové kostní hmoty je zvýrazněna šipkou. Převzato a upraveno z [47].

Byly provedeny i další studie, kde byl potvrzen pozitivní efekt hypertermie na redukci nádorů či prodloužení doby života pacientů (např. u multiformního glioblastomu či rakoviny prostaty). [46][48]

4. RAKOVINA A JEJÍ PODSTATA

4.1. Co je to rakovina?

Rakovina je skupina onemocnění charakteristická neregulovatelným buněčným dělením. Je známo více jak 100 druhů rakoviny. O který druh se jedná, určuje tkáň, ve které nádorové bujení primárně vzniklo - např. rakovina plic, prsu, prostaty atd. [49][50]

Přibližně 85 % nádorových onemocnění mají svůj původ v epiteliálních buňkách. Takto vysoká hodnota je způsobena častým dělením buněk epitelu. Pravděpodobnost mutace genu a následného vzniku nádoru je tedy logicky větší než u buněk, které se prakticky nedělí, jako jsou například nervové a svalové buňky. Nádorová onemocnění vzniklá v epiteliálních buňkách se nazývají **karcinomy**. Další kategorií nádorových onemocnění jsou **sarkomy**, které mají svůj původ v mezodermálních buňkách neboli v buňkách pojivové tkáně (kost, sval atd.). Poslední kategorií jsou **adenokarcinomy**, které vychází z glandulárních (žlázových) buněk (např. rakovina prsu). Na původní tkáni onemocnění také závisí vhodný postup léčby a většinou i příčina vzniku nádoru. [49][50]

Přes veškerou odlišnost jednotlivých kategorií nádorových onemocnění lze definovat šest základních charakteristických znaků nádorových buněk:

1. Autonomie v produkci růstových signálů nádorových buněk

Zdravé buňky k dělení potřebují vnější růstové signály. Tato potřeba ale u nádorových buněk mizí, což přispívá k neregulovatelnosti buněčného dělení.

2. Snížená citlivost na inhibiční růstové signály

Inhibiční růstové signály zajišťují u zdravých buněk homeostázu neboli schopnost udržovat stabilní vnitřní prostředí. Další roli mají v zastavení buněčného dělení u poškozených buněk. U buněk nádorových ale selhávají.

3. Poruchy apoptózy

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, tedy mechanismus sloužící ke zničení buněk s poškozenou genetickou informací či buněk napadených patogenem.

4. Bezprahový replikační potenciál (imortalizace)

Zdravé buňky mají konečný omezený počet dělení. Toto konečné číslo je dáno zkracováním telomer (konců chromozomů) při replikaci DNA. U buněk nádorových, ale vlivem mutace ke zkracování telomer nedochází. Jedná se o hlavní příčinu neregulovatelnosti buněčného dělení.

5. Angiogeneze

Angiogeneze neboli neokapilarizace je proces novotvorby krevních kapilár. Nádorové buňky stimulují okolní tkáň k růstu cév pro dostatek živin ke svému neustálému dělení.

6. Schopnost tkáňové invazivity a metastázování

Zdravé buňky zůstávají (většinou) ve své původní tkáni a nemigrují po těle. Buňky nádorové mohou mít schopnost migrace mezi tkáněmi. Díky této vlastnosti lze rozlišit dva typy nádorů: [49]

- **maligní** – nádor putuje po těle a vytváří metastáze
- **benigní** – nádor nemá schopnost migrovat

4.2. Rakovina a buněčný cyklus

Buněčný cyklus je cyklus, kterým si prochází buňka od jednoho dělení po další. Skládá se z několika přípravných fází (interfáze) a následného buněčného dělení (nejčastěji mitóza). Obecně se buněčný cyklus dělí na 4 základní fáze: [50]

- **G₁ fáze**

Zde dochází k růstu buňky (zdvojnásobení buněčné hmoty) a obecně se připravují nukleotidy a enzymy pro replikaci DNA v S fázi. Na konci této fáze se nachází důležitý kontrolní bod, kde buňka pomocí signálních drah kontroluje dostatek živin a neporušenost DNA pro replikaci. Pokud buňka zjistí jakékoliv poškození, cyklus přechází do G₀ fáze, tedy proces dělení je zastaven.

- **S fáze**

Dochází k replikaci DNA.

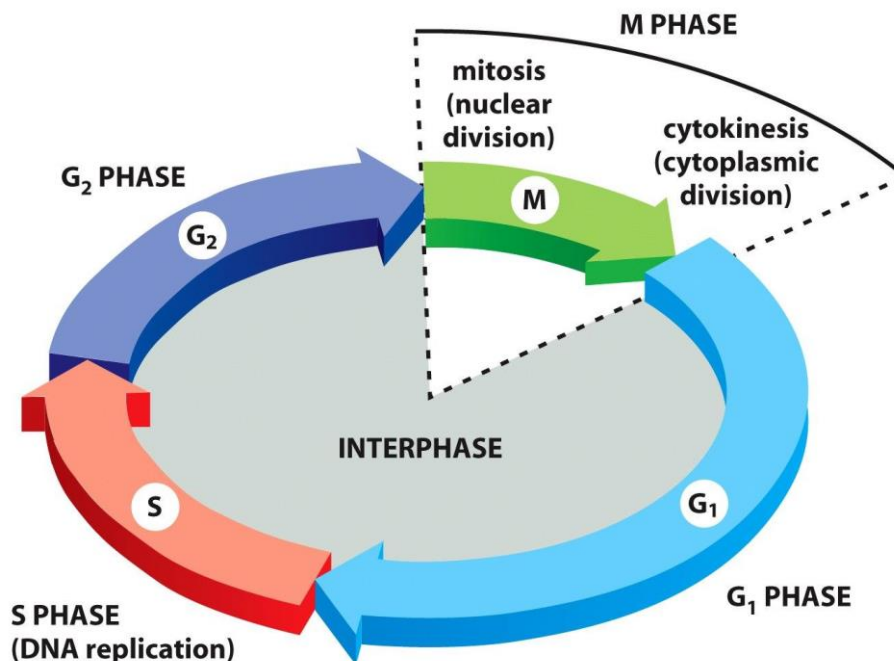
- **G₂ fáze**

V této fázi se zdvojují organely a tvoří se struktury nutné pro dělení (např. mitotické vřeténko).

- **mitóza**

Samotné dělení buňky. Skládá se z karyokineze (dělení jádra) a cytokineze (dělení cytoplazmy).

Přechody mezi fázemi jsou řízeny vnitřními a vnějšími chemickými signály. Pokud dojde k nesprávné interpretaci signálu či neschopnosti na něj řádně zareagovat, může dojít k transformaci buňky zdravé na buňku nádorovou. Regulace buněčného cyklu spočívá v kontrolních bodech mezi fázemi. V těchto bodech dochází ke spouštění signálních drah, které kontrolují aspekty nutné pro zdravé buněčné dělení – dostatek živin, DNA bez poškození atd. Pokud se zjistí problém, dochází k zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě. [50]



Obrázek č. 7: Schéma buněčného cyklu. Převzato z [51].

Důležitou roli zde hrají dva druhy proteinů - **cykliny** a **cyklin dependentní kinázy** (CDK). Ty tvorbou komplexů mezi sebou zajišťují postup kontrolními body a přechod do další fáze buněčného cyklu. CDK jsou katalyticky aktivní složky, které regulují aktivitu proteinů přenesením fosfátové skupiny. Schopnost této fosforylace závisí na přítomnosti cyklinů. Bez cyklinů se nemůže vytvořit komplex cyklin-CDK a CDK zůstává neaktivní. Lze tedy říci, že pro správnou funkčnost buněčného cyklu je nutný střídavý vznik a rozpad komplexu cyklin-CDK. U nádorových buněk ale tento mechanismus nefunguje. To může být způsobeno například mutací v genech kódující cykliny nebo CDK či v genech kódujících proteiny, které jsou zodpovědné za řádnou reakci na komplex cyklin-CDK nebo za regulaci množství vznikajících komplexů cyklin-CDK. Může dojít i k několika mutacím současně. Výsledek ale zůstává stejný, buňka není schopná regulovat svůj buněčný cyklus a stává se nádorovou. [50]

Jedním z nejdůležitějších kontrolních bodů je **START** neboli **bod restrikce** nacházející se na konci G₁ fáze před vstupem do fáze replikace DNA (S fáze). Právě v tomto bodě inhibiční proteiny, které mají schopnost vnímat poškození DNA nebo nedostatek živin, jsou schopny zabrzdit komplex cyklin-CDK a zabránit vstupu buňky do S fáze, dokud nebude DNA opravena či buňka dostatečně vyživena. Tím se zabrání replikaci a přenosu poškozené DNA do dceřiné buňky. Nádorová buňka

má tento kontrolní bod nefunkční, a proto dochází k replikaci poškozené DNA do buněk dceřiných, tudíž všechny buňky z ní vzniklé jsou také buňky nádorové. Během několika buněčných cyklů může docházet k akumulaci mutací a způsobení další deregulace buněčného cyklu. [50]

4.3. Genetická podstata rakoviny

Dnes díky pokroku v oblasti molekulární genetiky víme, že rakovina má genetické příčiny. Ale i dříve existovalo několik důkazů nasvědčujících, že všechny buňky vzniklé z buňky nádorové jsou také nádorové. Nebo že existují viry či látky způsobující mutace DNA, které mohou indukovat tvorbu nádorového bujení. A v poslední řadě i dědičnost určitých typů nádorových onemocnění v rodinách.

V 80. letech byly poprvé vysledovány specifické genetické defekty, které zapříčiňují nádorové onemocnění. Zjistilo se, že pro transformaci zdravé buňky v nádorovou je potřeba hned několik genetických defektů. Posléze se identifikovaly dvě skupiny genů, které při mutaci přispívají ke vzniku nádorového onemocnění. První skupinou jsou geny, které po mutaci aktivně podporují buněčný cyklus a nazývají se **onkogeny**. Druhou skupinou jsou **nádorové supresorové geny**, které po zmutování selhávají v regulaci (potlačení) buněčného cyklu. [50]

5. MLÉKO A JEHO BÍLKOVINY

Výživová hodnota mléka spočívá hlavně ve zdroji proteinů, aminokyselin, lipidů, laktózy, vitamínů, minerálů... atd. [40]

Mléčné bílkoviny se dělí do dvou skupin – **syrovátkové bílkoviny** a **kaseiny**, tyto skupiny se liší chováním při okyselování (snižování pH) mléka. [52]

Kaseiny tvoří asi 80 % všech mléčných proteinů a jsou ve vodě nerozpustné. Zato syrovátkové proteiny jsou rozpustné a patří mezi ně například β -laktoglobulin, α -laktalbumin, imunoglobuliny, sérový albumin a laktoferin. Sirovátkovým proteinům také lze přiřadit tyto biologické funkce – prevence rakoviny (rakoviny prsu či střev), zvýšení hodnot glutathionu (zvýšení zranitelnosti nádorových buněk, léčení pacientů s HIV), antimikrobiální účinky atd. [53]

6. LAKTOFERIN

6.1. Historie výzkumu

Laktoferin byl poprvé separován z kravského mléka v roce 1939 jako neznámá *červená složka*. V roce 1960 byl tento červený protein charakterizován jako transferinu podobný glykoprotein (jak pro bovinní Lf - bLf, tak pro lidský Lf - hLf). V dalších letech došlo k podrobnému prozkoumání jeho 3D struktury a byly zjištěny jeho antimikrobiální a antikarcinogenní účinky. [54]

6.2. Výskyt laktoferinu

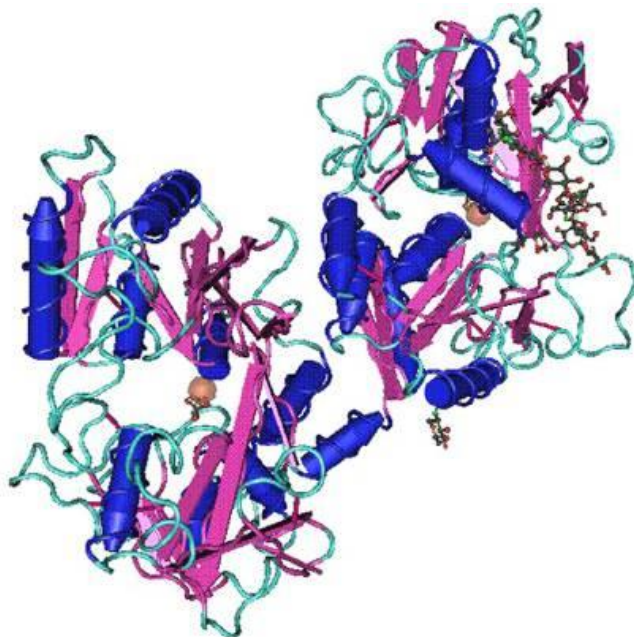
Laktoferin lze převážně najít jako produkt endokrinních žláz, které se nachází u vstupů či výstupů trávicí, dýchací a rozmnožovací soustavy. Laktoferin zde zastupuje roli nespecifické obrany proti invazním patogenům. Tudíž nejenže lze nalézt laktoferin v mateřském mléce, ale také v slzách, v kloubním mazivu, ve slinách či ve vaginálním a semenném sekretu. Laktoferin se může vyskytovat i v krvi. [55]

6.3. Struktura laktoferinu

Laktoferin je mléčný protein vázající železo, někdy nazývaný laktotransferin. Díky podobné struktuře a velikosti ho mnozí řadí mezi transferiny, což je skupina dalších železo vázajících proteinů. [56]

Jedná se o glykoprotein složený z cca 700 aminokyselin, který se vyznačuje vysokou homologií mezi druhy. Jedná se o jednoduchý polypeptidový řetězec dělí se na 2 symetrické podjednotky - **N** a **C podjednotky**. Tyto jednotky se také vyznačují vysokou shodností, jsou spojené „kloubem“ (v hLf se nachází mezi aminokyselinami 333 a 343), který je tvořen částmi α -helixu a dodává určitou flexibilitu molekule. Polypeptidický řetězec laktoferinu je tedy složen z aminokyselin 1-332 pro N podjednotku a 344-703 pro C podjednotku a je tvořen strukturami α -helixu a β -skládaného listu. Tyto struktury vytváří dvě domény (označovány I a II) pro každou podjednotku. Každá podjednotka je schopná navázat iont železa - Fe^{2+} , Fe^{3+} . Bylo zaznamenáno navázání také iontů jiných kovů - Cu^{2+} , Zn^{2+} a Mn^{2+} . Díky schopnosti laktoferinu reverzně vázat Fe^{3+} iont, existují dvě strukturní formy laktoferinu - **apolaktoferin**, otevřená struktura se vzájemně vzdálenými

podjednotkami, která je zcela bez iontů Fe a **hololaktoferin**, což je saturovaná forma se zcela uzavřenou molekulou a větší rezistencí vůči proteolýze. [57]



Obrázek č. 8: 3D struktura bLf s dvěma navázanými ionty Fe (rozlišení při 2,8 Å).
Převzato z [57].

6.4. Vlastnosti a biologické aplikace laktoferinu

Laktoferin s jeho antibakteriálními, protizánětlivými a antikarcinogenními účinky lze považovat za klíčovou složku imunitní obrany proti fyziologickým a vnějším změnám. [57]

Výše zmíněné antibakteriální účinky se u laktoferinu projevují hned ve dvou formách – **bakteriostatické** (= zastavení růstu bakterií vlivem nedostatku železa) a **baktericidní** (= usmrcení bakterií pomocí poškození buněčné stěny). Tyto účinky se vztahují na bakterie, viry, parazity, houby, kvasinky. [52]

Nejlépe zdokumentované jsou účinky právě na bakterie. Zde došlo k experimentům *in vitro* i *in vivo*, a to na Gram⁺, Gram⁻ bakteriích a na kyselinám a alkoholům odolným bakteriích. Mezi Gram⁺ bakterie, u kterých byl potvrzen efekt Lf, spadá: rod *Clostridium* (způsobující např. botulismus, průjem, tetanus), *Staphylococcus aureus* (způsobující onemocnění od mírných zánětů kůže a měkké tkáně až po život ohrožující sepse), *Streptococcus mutans* (bakterie napadající zuby), *Listeria monocytogenes* (původce listeriózy). Mezi Gram⁻ bakterie s potvrzeným Lf efektem patří: *Escherichia coli* (součást střevní mikroflóry teplokrevných živočichů), *Helicobacter pylori* (původce gastritidy), *Vibrio cholerae* (původce cholery).

Další potvrzenou bakterií (patřící mezi kyselinám a alkoholům odolným bakterií), na kterou Lf působí, je *Mycobacterium tuberculosis* (původce většiny případů tuberkulózy). [57]

U laktoferinu byly také potvrzeny antivirové (virus *herpes simplex*, virus hepatitidy B, C), fungicidní (*Candida albicans*) a antiparazitní účinky (*Toxoplasma gondii*). [40]

Co se týče jeho antikarcinogenních účinků, byly prokázány účinky na nádory plic, jazyka a močového měchýře. [40]

Za zmínění také stojí studie, která ukazuje, že bLf podávaný spolu s chemoterapií pacientům s kolorektálním karcinomem (rakovina tlustého střeva a konečníku) zlepšuje symptomy onemocnění (anémie) a snižuje vedlejší účinky chemoterapie (např. chrání játra a ledviny před toxickými látkami chemoterapie a tím zvyšuje jejich funkčnost). [58]

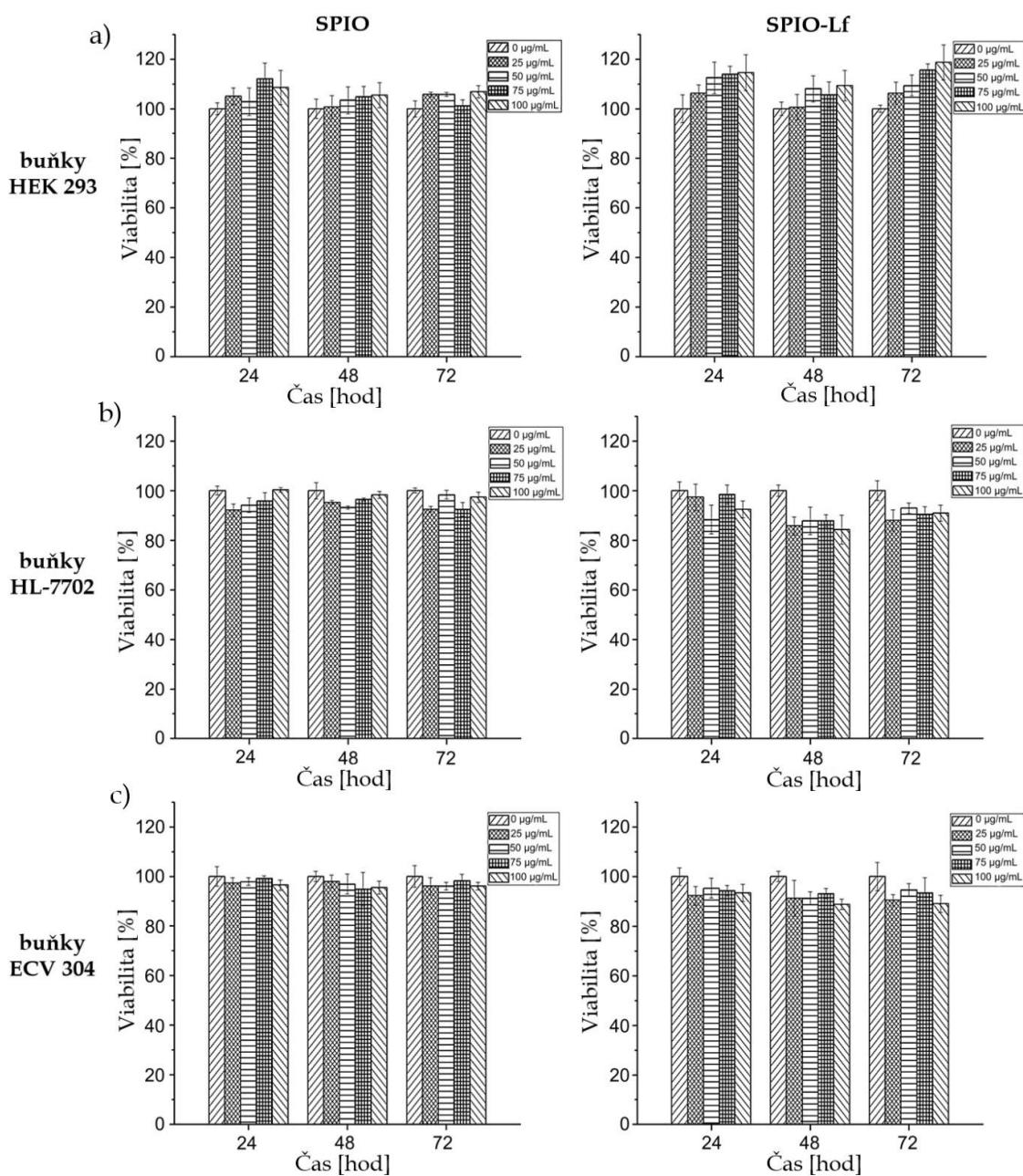
Další studie zase ukazuje zastavení růstu tumorů v plicích myši laktoferinem a zabránění dalšímu šíření. [59]

Jako poslední lze zmínit vliv bLf na tvorbu rakoviny tlustého střeva pozorované u krys. Zde byl zaznamenán rapidní pokles počtu nádorů i jejich rozsahu působení vlivem bLf bez jakékoliv navýšení toxicity. [60]

7. POTENCIÁLNÍ VYUŽITÍ KOMPLEXU SPIO-Lf

Jedním z potenciálních využití komplexu SPIO-Lf je terapeutická aplikace, kde nanočástice magnetitu slouží jako kontrastní látka a laktoferin současně zabíjí nádorové buňky. V rámci studie *in vivo* (na krysách) byla demonstrována velká citlivost tohoto činidla a tím vzniklá rozlišitelnost zdravé tkáně od nádorové. Studie konkrétně zkoumala účinky SPIO-Lf při zobrazování gliomů (nádorů mozku). SPIO-Lf se selektivně a přesně navázaly pouze na buňky gliomu. Touto akumulací pouze na nádorových buňkách vznikl při zobrazování vysoký kontrast mezi buňkami nádorovými a zdravou mozkovou tkání, a to po dobu 48 hodin. Lze tedy říci, že SPIO-Lf by byly užitečné jak při předoperačním, tak pooperačním obrazu mozkové tkáně. Zároveň provedená studie *in vitro* neukázala u vzorků SPIO a SPIO-Lf žádný efekt na metabolickou aktivitu buněk. Prováděn byl MTT test na několika typech zdravých buněk - lidských embryonálních renálních buňkách (HEK 293), lidských hepatocytech (HL-7702) a lidských endoteliálních buňkách pupečnickové žíly (ECV 304). [61]

Biokompatibilitu vzorků SPIO a SPIO-Lf pro koncentrace 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml a 100 µg/ml lze vyčíst z grafů závislosti viability buněk na čase působení uvedených na obrázku č. 9.



Obrázek č. 9: Grafy závislosti viability na čase působení pro jednotlivé koncentrace – 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml a 100 µg/ml vzorků SPIO a SPIO-Lf. Měření byla provedena po časech působení 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin na zdravých lidských buňkách: a) embryonálních renálních buňkách (HEK 293), b) hepatocytech (HL-7702) a c) endoteliálních buňkách pupečnickové žíly (ECV 304). Převzato a upraveno z [61].

Mimo gliomy by SPIO-Lf mohly být v budoucnu využity v diagnóze Alzheimerovy choroby či jiných karcinogenních onemocnění. [61]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. MATERIÁL A METODY

1.1. Použité materiály

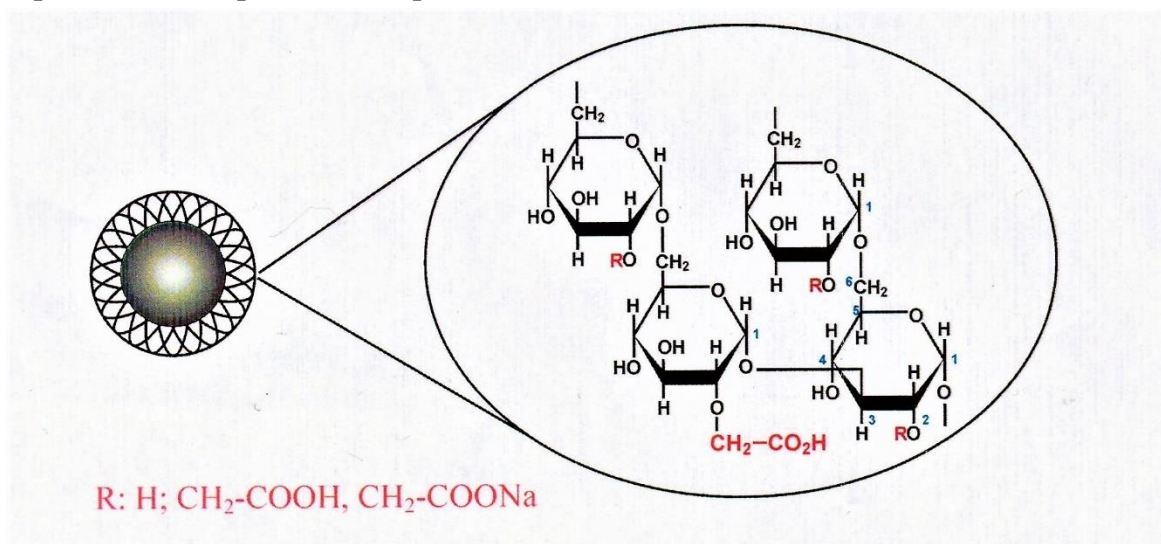
1.1.1. Nanočástice

V experimentu se používaly komerční superparamagnetické nanočástice magnetitu od německé firmy Chemicell. Konkrétně se jednalo se o *fluidMAG-CMX* nanočástice.

Nanočástice měly od výrobce uvedeny tyto parametry:

- hydrodynamický poloměr: 200 nm
- složení jádra: magnetit (během času pravděpodobná oxidace na maghemit)
- složení obalu: karboxymethyl-dextran
- médium: ultračistá voda
- funkční skupina: karboxylát sodíku $-\text{COO}^- \text{Na}^+$ (obrázek č. 10).

Všechny další parametry a informace o nanočásticích jsou uvedeny v produktovém protokolu v příloze.



Obrázek č. 10: Schéma obalu a jeho funkčních skupin používaných nanočástic.
Převzato z produktového protokolu od firmy Chemicell [Příloha].

1.1.2. Laktoferin

Pro měření byl použit komerční laktoferin separovaný z kravského mléka (bovinní laktoferin) od firmy Sigma-Aldrich.

1.2. Metody charakterizace nanočástic

1.2.1. Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je nedestruktivní metoda popisující velikost a morfologii nanomateriálů.

Transmisní elektronový mikroskop je typem elektronového mikroskopu. Obraz se tvoří na stínítku průchodem svazku elektronů zkoumaným vzorkem. Zdrojem elektronů je žhavená kovová elektroda. Z té je proud elektronů urychlován pomocí elektrického pole (50–200 kV). Následně jsou elektrony soustředěny na pozorovaný vzorek pomocí elektronové čočky, která je tvořena elektrickým (speciální kondenzátor) nebo magnetickým polem (cívka). Jelikož u transmisní mikroskopie se obraz získává průchodem elektronů vzorkem, je důležité mít vzorek dostatečně tenký (1 μm). Po průchodu vzorkem proud elektronů prochází objektivem (další elektronovou čočkou) a vytváří prvotní elektronový obraz, jehož část se projektivem (další elektronovou čočkou) znovu zvětší a vytváří výsledný obraz na stínítku. [62]

V experimentu byl použit transmisní elektronový mikroskop JEOL 2100.

1.2.2. Dynamický rozptyl světla

Pro přesné ověření velikosti SPIO a změření hydrodynamického průměru částic u vzorku s navázaným laktoferinem byla použita nedestruktivní metoda dynamického rozptylu světla neboli DLS (Dynamic Light Scattering). Metoda spočívá v měření fluktuací intenzity rozptýleného světla laserového svazku, kterým se osvětluje vzorek. Intenzita fluktuuje díky Brownovu pohybu částic – náhodný pohyb částic způsobený neustálými srážkami částic mezi sebou a molekulami média. Pro větší nanočástice je Brownův pohyb pomalejší, a tudíž i intenzita bude fluktuovat pomaleji. Oproti tomu menší částice se pohybují rychleji a jejich intenzita se bude měnit rychleji. [63]

Naměřené fluktuace se následně pomocí korelační funkce dají do vztahu s velikostí nanočástic v závislosti na intenzitě, objemu či počtu. [63]

Měřením hydrodynamického průměru pomocí DLS se získává i veličina zvaná stupeň polydisperzity (PDI - z angl. polydispersity index). Tato bezrozměrná veličina charakterizuje šířku distribuční křivky a udává kolik velikostí nanočástic se v koloidu vyskytuje. Její hodnota se pohybuje mezi 0-1 a dělí vzorky na: [64]

- PDI <0,05: velmi monodisperzní
- PDI <0,08: téměř monodisperzní
- PDI = 0,08-0,7: polydisperzní
- PDI >0,7: silně polydisperzní

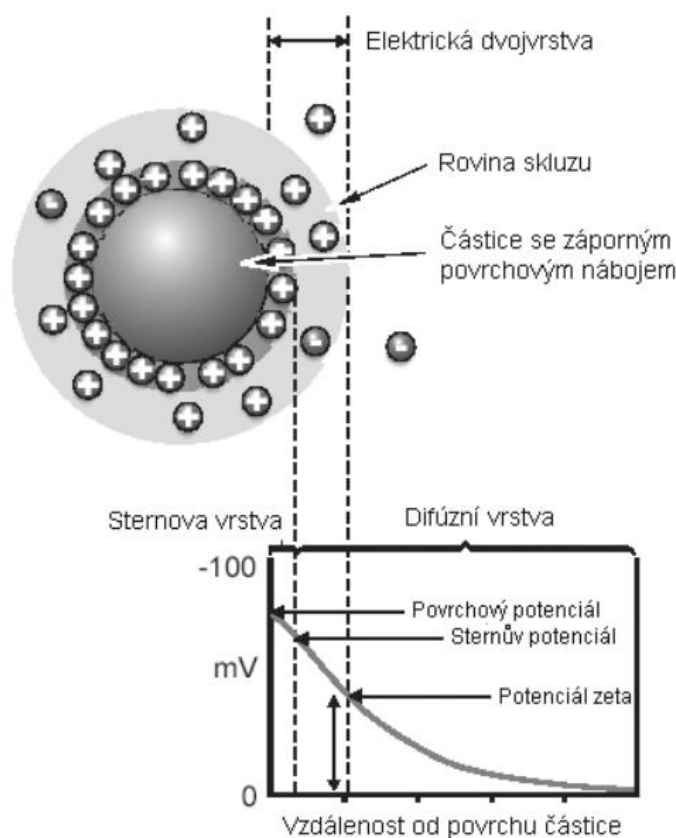
Další veličinu, kterou lze získat měřením pomocí metody dynamického rozptylu světla je zeta potenciál.

Zeta potenciál je elektrokinetický potenciál v koloidech, který působí mezi iontovou povrchovou vrstvou částice a okolní kapalinou. Iontová povrchová vrstva částice je tenká vrstva opačných iontů poutaná k povrchu. Na její hranici dochází k poklesu potenciálu. [65]

Vrstvu kapaliny obklopující částici lze rozdělit na dvě části:

- **Sternova vrstva** - vnitřní oblast se silně navázanými ionty
- **difúzní oblast** - vnější část vrstvy

Uvnitř difúzní oblasti se nachází hranice tzv. *rovina skluzu*. Před touto hranicí se ionty spolu s částicí považují za stabilní jednotku. A právě potenciál na této hranici se nazývá **zeta potenciál**. [65]



Obrázek č. 11: Zobrazení částice a její elektrické dvojvrstvy a jí odpovídajícím potenciálům. Převzato z [65].

Velikost zeta potenciálu vypovídá o stabilitě koloidu. Pokud všechny částice v koloidu mají velký záporný či kladný zeta potenciál, budou se navzájem odpuzovat a nebude docházet ke shlukování částic a tvorbě agregátů či aglomerátů. Za hranici mezi stabilním a nestabilním koloidem se obecně uznává hodnota ± 30 mV. Tedy nanočástice s menším zeta potenciálem než -30 mV a nanočástice se zeta potenciálem větší než 30 mV se považují za stabilní. [65]

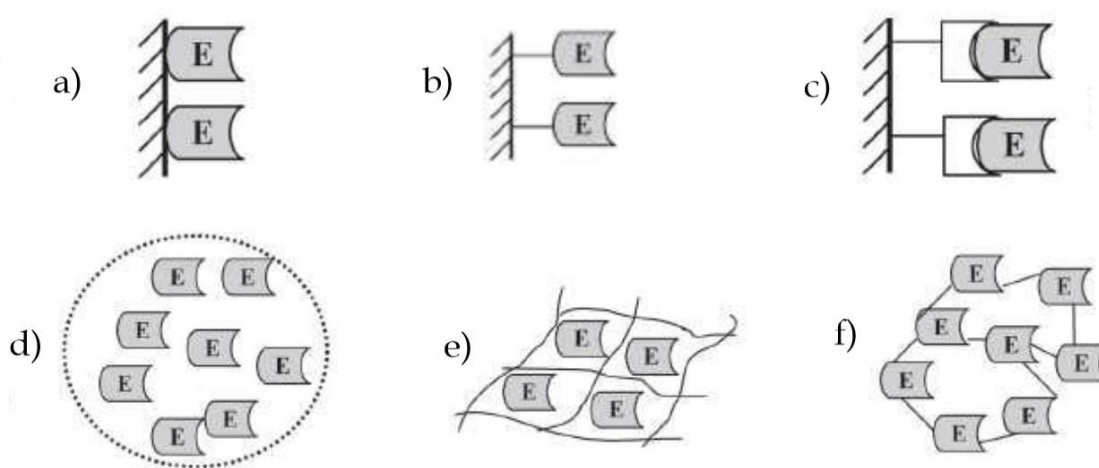
V experimentu na změření hydrodynamického poloměru, polydisperzity a zeta potenciálu byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS od společnosti Malvern Panalytical Ltd.

1.3. Imobilizace laktoferinu

Existuje hned několik metod, jak je možné imobilizovat protein na částici. Tyto techniky se dělí dle typu vazby na: [66]

- fyzikální imobilizace
- chemická imobilizace

Mezi fyzikální lze zařadit například přímou adsorpci na povrch částice, enkapsulaci či inkluzi do gelů. Kovalentní imobilizace na nerozpustné nosiče a retikulace enzymů bifunkčními činidly se řadí zase mezi chemické metody. Na obrázku č. 12 jsou znázorněny nejčastější imobilizační techniky. [66]



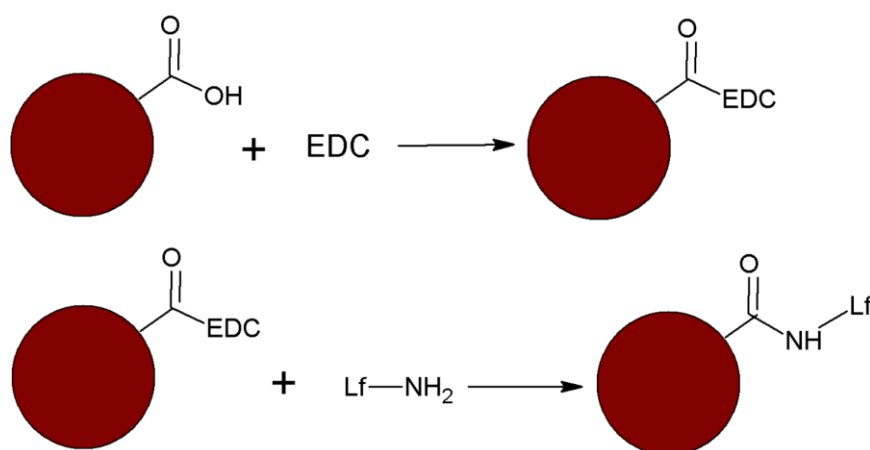
Obrázek č. 12: Schéma nejčastějších imobilizačních technik – a) přímá adsorpce, b) kovalentní vazba, c) bioafinitní vazba, d) enkapsulace, e) zachycení v polymeru (gelu), f) zesíťování.

Převzato a upraveno z [66].

I když se metoda přímé adsorpce zdá nejjednodušší, nejvyužívanější technikou bývá imobilizace pomocí kovalentní vazby. Tato metoda je spolehlivější a stabilnější. Pro vznik kovalentní vazby se vyžaduje přítomnost funkčních skupin částice – spíše obalu částice ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ či $-\text{CONH}_2$) a obdobně funkčních skupin proteinů. Podle funkčních skupin se určuje vhodné aktivační činidlo. [66]

Používané nanočástice mají funkční karboxyskupinu. Vhodným aktivačním činidlem jsou karbodiimidy (CDI). Konkrétně jsme využili 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid neboli EDC. [66]

Zjednodušené schéma navázání laktoferinu pomocí EDC je znázorněno na obrázku č. 13.



Obrázek č. 13: Schéma navazování laktoferinu na nanočástici magnetitu.
Převzato z [40].

1.4. Bradfordova metoda

Ke stanovení množství navázaného laktoferinu na nanočástice se užila **Bradfordova metoda**. Jedná se o metodu spektrofotometrickou, která spočívá ve změně barvy Bradfordova činidla (etanol, H_3PO_4 , barvivo Coomassie-Brilliant-Blue G-250) při navázání na protein. Principiálně se jedná o to, že výše uvedené barvivo CBB, které je součástí Bradfordova činidla má v kyselém prostředí kyseliny fosforečné červenohnědou barvu, tedy maximum absorpance na 465 nm. Zato po navázání barviva na protein se změni barva na modrou a maximum se posune na hodnotu 595 nm. Hodnota absorpance při 595 nm je tedy přímo úměrná množství navázaného barviva na protein neboli množství proteinu. [40]

Na samostatné měření absorpance se užíval klasický spektrofotometr Biochrom WPA Lightwave II. Absorpance byla měřena pro vlnovou délku 595 nm.

1.5. Práce s buňkami

Testy byly prováděny na zdravých a nádorových buňkách.

Jako nádorové buňky byly užívány buňky HeLa. HeLa jsou epiteliální buňky z tzv. *nesmrtelné buněčné linie* izolované z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacksové v roce 1951. Jedná se o nejstarší a nejužívanější lidskou linii. V roce 1953 byly tyto buňky jako první lidské buňky klonovány. [67]

Jako zdravé buňky se užívaly fibroblasty z myších embryí NIH Swiss. Tato buněčná linie byla založena v roce 1962 Georgem Todarem a Howardem Greenem v New Yorku. Buňky byly původně kultivovány tzv. *3T3 protokolem* – v průběhu buněčného dělení dochází k přenosu (*T*- z angl. transfer) kultivovaného vzorku každé tři dny (první 3 v názvu) až do nárůstu 300 000 buněk na misce (druhá 3 v názvu). Odtud tedy pochází název NIH 3T3. [68]

1.5.1. Kultivace buněk

Buňky se kultivují v malých či velkých kultivačních lahvích v médiu, které je vytvořené pro každé buňky na míru, aby jim přineslo dostatečný zdroj živin (cukrů, aminokyselin a bílkovin). Součástí média bývá i antibiotikum pro zabránění kontaminace buněk bakteriemi. Kultivace buněk probíhá za stálých inkubačních podmínek, tedy podmínek, které co nejvíce připomínají prostředí lidského či zvířecího těla. Inkubátor tedy zajišťuje stálou teplotu 37 °C a o 5 % CO₂ obohacenou atmosféru. [69]

HeLa a NIH 3T3 jsou typy buněk, které rostou adherované na dně kultivační láhve. Je tedy důležitá pravidelná kontrola nárůstu buněk a při více jak 80% nárůstu je potřeba buňky pasážovat, aby se zabránilo kontaktní inhibici. Ta nastává v případě, kdy buňky už nemají prostor na adhezaci a růst, tedy se deadherují a umírají. [69]

Veškerá práce s buňkami se provádí ve sterilním prostředí laminárního boxu (flow-boxu), kde neustálý proud vzduchu a jeho filtrace zajišťují co největší sterilitu pro zamezení kontaminace buněčných linií.

1.5.2. Pasážování a rozesazování buněk

Při vysokém nárůstu buněk či nutnosti rozesadit buňky z kultivační lahve do potřebného kultivačního panelu pro měření se užívá metody pasážování.

Ta spočívá v zahřátí PBS, vhodného média a trypsinu na 37°C. Trypsin je štěpící enzym, který štěpí peptidickou vazbu mezi aminokyselinami v proteinech. V našem případě slouží k deadheraci (odlepení) buněk ode dna kultivační láhve pro pozdější manipulaci. Z kultivační láhve se odsaje veškeré médium. Buňky se následně promyjí PBS pro odstranění zbytků média (zlepšení štěpícího účinku trypsinu), přidá se trypsin a láhev se opět vloží na několik minut zpátky do inkubátoru. Úspěšnou deadheraci lze pozorovat pod světelným mikroskopem, kdy buňky jsou kulaté a „plavou“ v trypsinu. Pro zastavení procesu štěpení se k buňkám opět přidá

médium. Následně lze část buněk odsát a doplnit médium do potřebného objemu a láhev opět vložit do inkubátoru (pasážování) či část buněk přepipetovat do zkumavky, ze které se pak buňky rozesadí do potřebného kultivačního panelu (rozesazování buněk). [69]

1.5.3. Počítání buněk

Pro dosažení správných a použitelných výsledků v testech viability je nutné mít, pokud možno stejný počet buněk v každé jamce kultivačního panelu. To se dá zajistit dostatečným rozsuspendováním média s buňkami a napočítáním buněk. Existuje hned několik metod, jak spočítat přibližné množství buněk v médiu.

Jednou z metod, které se využilo, je metoda manuální, která využívá tzv. *Bürkerovu komůrku*. Bürkerova komůrka je speciální podložní sklíčko s vyrytou mikroskopickou mřížkou. Na toto podložní sklíčko se přiloží sklíčko krycí a nejdřív pod a poté nad něj se nakápně 10 μ l buněčné suspenze. Následně pod optickým mikroskopem se počítá množství buněk v pěti čtvercích horní a v pěti čtvercích dolní poloviny mřížky. Takto napočítané hodnoty se sečtou, vydělí deseti a vynásobí 10^5 . Tím se získá finální hodnota udávající počet buněk v mililitru suspenze.

Jednodušší metodou je využití automatizovaného počítadla buněk. V prováděném experimentu se použil Automated Cell Counter TC20™ od firmy BIO-RAD. Nevýhodou těchto počítadel je, že ne vždy jsou přesná. Pro zvýšení přesnosti je vhodné změřit počet buněk i pro zředěnou buněčnou suspenzi.

Potřebný počet buněk se odvíjí od používaného kultivačního panelu. Pro zvolené koncentrace a vzorky byl užit kultivační panel s 96 jamkami. Zde ideální množství buněk pro měření je 10 000 buněk na jamku či 20 000 buněk na jamku.

Po výpočtu množství buněk v mililitru se pomocí trojčlenky dopočítá potřebné množství pro vysazení buněk do vybraných jamek. Toto množství se následně doplní médiem do potřebného objemu – je nutné mít v každé jamce 100 μ l suspenze. Poté už se jednoduše rozesadí buněčná suspenze pomocí multikanálové pipety do kultivačního panelu a vloží se na 24 hodin do inkubátoru pro opětovnou adhezi buněk.

1.5.4. Značení buněk

Po uplynutí 24 hodin v inkubátoru se jednotlivé jamky v kultivačním panelu značí danými vzorky nanočástic v předem rozmyšlených koncentracích. V našem experimentu jsou zvolené koncentrace 50–700 μ g Fe_3O_4 /ml.

1.6. Testy viability

1.6.1. MTT test

MTT test je jedním z nejvyžívanějších testů cytotoxicity. 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 odpovídající živým buňkám redukují žlutý MTT roztok na nerozpustný tmavě modrý (fialový) formazan. Test se vyhodnocuje spektrofotometricky měřením absorbance. Měření probíhá při vlnové délce 570 nm.

U MTT testu je i jednoduché určit toxickou dávku materiálu, která odpovídá koncentraci, při které nastane buněčná smrt u poloviny buněk. Nevýhodou MTT testu je ale možné zkreslení dat kvůli probíhajícímu metabolismu buňky. Metabolická aktivita buňky se mění i bez přítomnosti přidané látky. [69][70]

Pro měření byl použit spektrofotometr TECAN I Control, Infinite 200Pro.

1.6.2. Měření oxidačního stresu

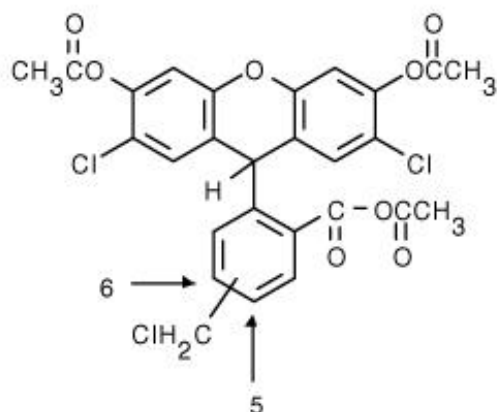
Oxidační stres je reakce buňky na zvýšenou produkci volných kyslíkových radikálů (ROS), jak už je zmíněno v kapitole 2.2.1.

Měření míry oxidačního stresu se dá provádět hned několika způsoby: [71]

- měřením množství volných kyslíkových radikálů (ROS)
- měřením množství antioxidantů
- měřením specifického markeru evokující poškození biomolekul

Nejčastěji se pro měření hladiny ROS využívá fluoroforů (fluorescenčních barviv). To jsou redukovaná barviva, která se reakcí s ROS zoxidují a začnou emitovat fluorescenci. Existuje celá řada fluorescenčních barviv, které specificky reagují s určitým kyslíkovým radikálem. [71]

V našem experimentu se využívalo fluoroforu CM-H2DCFDA ($C_{27}H_{19}Cl_3O_8$), jehož vzorec je zobrazen na obrázku č. 14.



Obrázek č. 14: Vzorec fluoroforu CM-H2DCFDA. Převzato z [72].

Fluorescence se měřila pro excitační vlnovou délku 492 nm, emisní vlnovou délku 527 nm a použit byl opět spektrofotometr TECAN I Control, Infinite 200Pro.

1.6.3. Měření viability pomocí průtokového cytometru

Průtoková cytometrie je měřicí metoda umožňující charakterizaci a analýzu vlastností buněk na úrovni i jedné buňky. Výhodami této metody jsou její rychlost a možnost pracovat s velkým množstvím buněk. [73]

Průtokový cytometr se skládá z: [73]

- fluidiky
- optiky
- elektroniky

Buňky jsou nasávány a odnášeny proudem nosné kapaliny do měřícího prostředí. Pomocí hydrodynamické fokusace se omezuje tok buněk (pokud možno na jednotlivé buňky za sebou). Hydrodynamická fokusace je způsobena rozdílem tlaku mezi vzorkem a nosnou kapalinou. Čím je rozdíl tlaku menší, tím je proud vzorku užší a můžou se analyzovat i jednotlivé buňky. [73][74]

Optickou částí cytometru je zdroj záření, soustava filtrů a zrcadel a detektory. Zdrojem záření nejčastěji bývají lasery. Průtokové cytometry bývají dvoulaserové (Ar^+ , He-Ne) či třílaserové (navíc fialový či UV laser). [73][74]

Při dopadu záření na buňky dochází k rozptylu, kdy se měří záření rozptýlené kolmo na svazek zdroje a záření nerozptýlené. A to pomocí dvou detektorů: [73]

- **FSC** (z angl. forward scatter) – detektor umístěný v ose dopadajícího svazku
- **SSC** (z angl. side scatter) – detektor umístěný pod úhlem 90°

Intenzita FSC je přímo úměrná velikosti a členitosti buňky, čímž lze rozlišovat živé a mrtvé buňky. Za to intenzita SSC je úměrná granularitě buňky (granulózní a ngranulózní buňky). Zároveň se detekuje fluorescence, a to díky značení buněk fluorofory. [73]

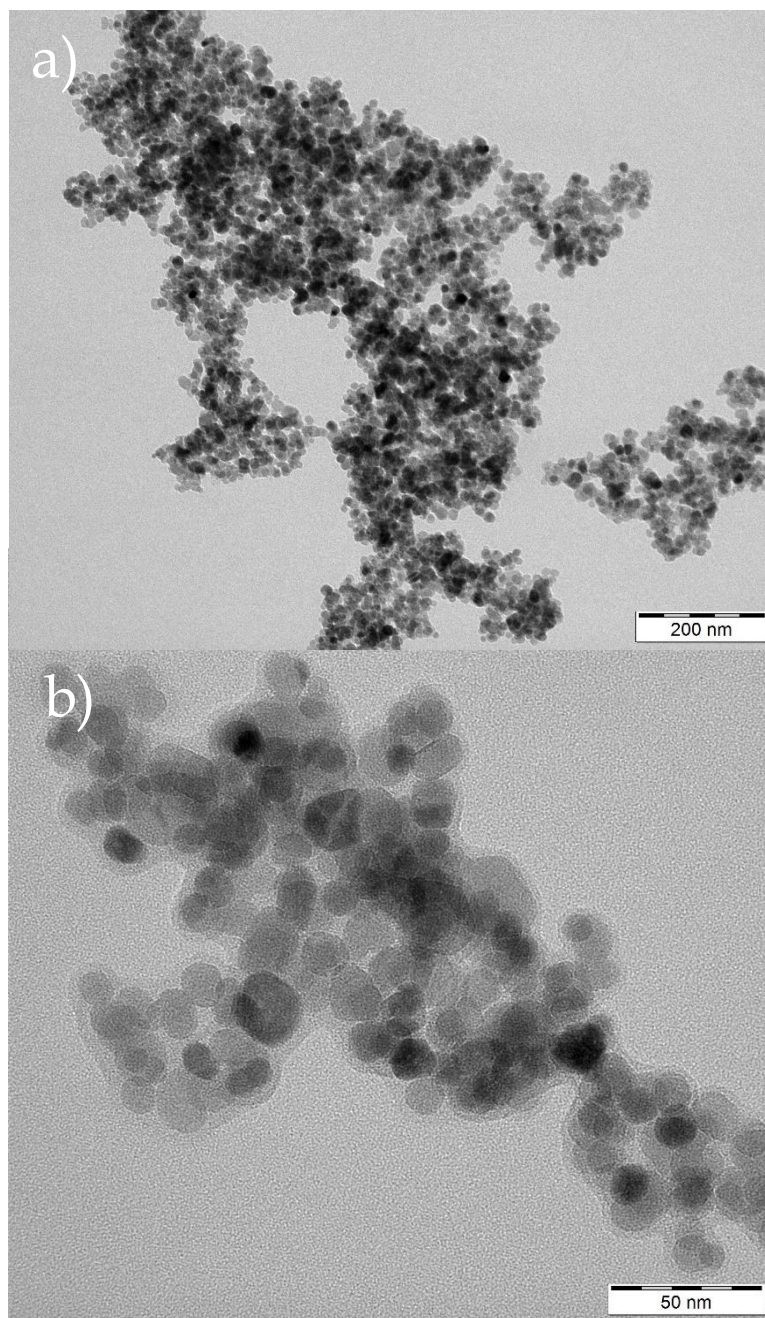
V našem experimentu se jako fluorescenční barviva použily propidium jodid (PI) a kalcein ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$). Propidium jodid ($C_{27}H_{34}I_2N_4$) jasně označí mrtvé buňky, jelikož projde jen poškozenou membránou a váže se na nukleovou kyselinu. Jeho excitační vlnová délka je 493 nm a emisní vlnová délka 632 nm (svítí červeně). Za to kalcein prochází i neporušenou buněčnou membránou a díky aktivitě intracelulárních esteráz mění svou strukturu. Touto změnou začíná vykazovat silnou zelenou fluorescenci, čímž zase značí buňky živé. Jeho excitační vlnová délka je 495 nm a emisní 515 nm. [74]

Pro měření byl použit průtokový cytometr BD FACSLyric™ od firmy BD Biosciences.

2. VÝSLEDKY A DISKUZE

2.1. Transmisní elektronová mikroskopie

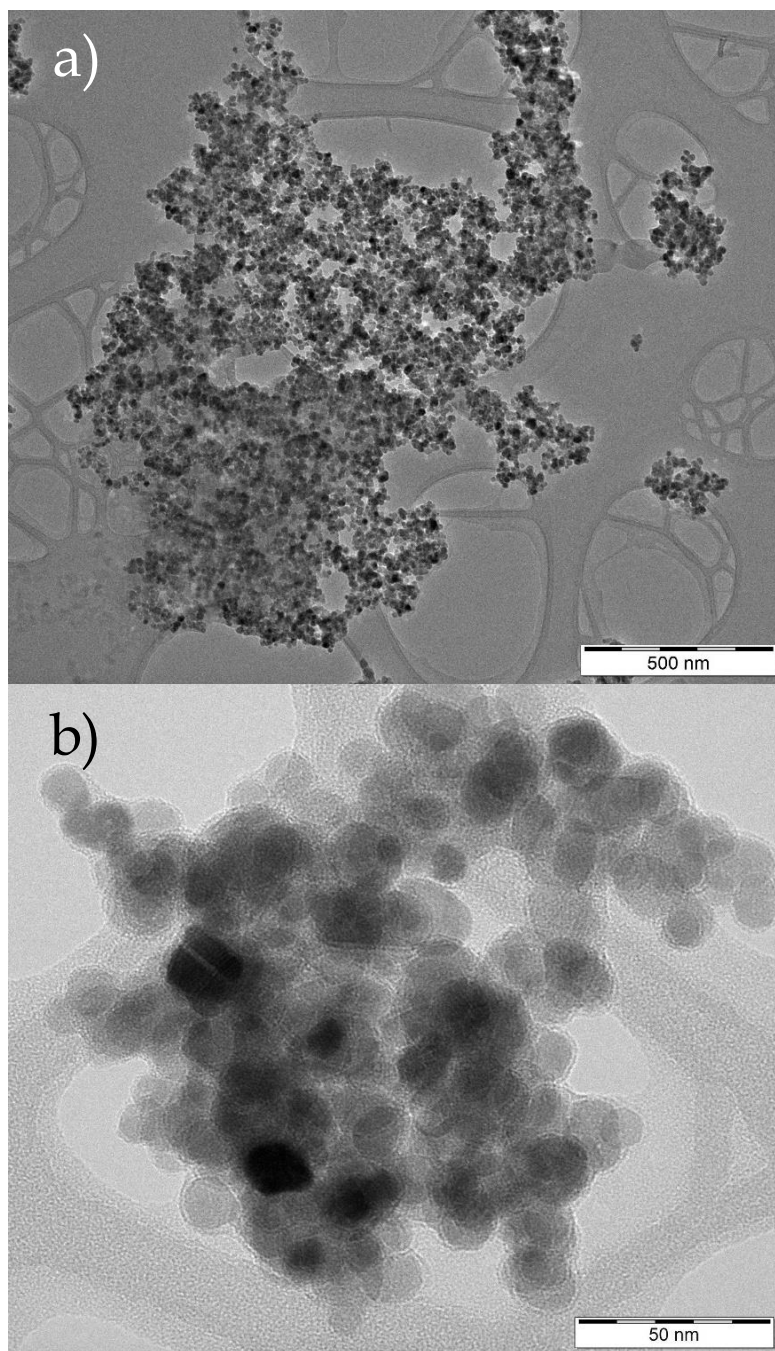
V rámci charakterizace a pro zjištění velikosti nanočástic bylo provedeno několik snímků transmisním elektronovým mikroskopem. A to jak pro vzorek bez laktoferinu, tak s laktoferinem.



Obrázek č. 15: TEM snímky používaných superparamagnetických nanočástic – a) s měřítkem 200 nm a b) s měřítkem 50 nm.

Na obrázku č. 15 jsou znázorněny snímky z transmisního elektronového mikroskopu superparamagnetických nanočástic. Z těchto snímků lze vyčíst kulovitý tvar nanočástic a jejich přibližný průměr okolo 20–25 nm. Ten se liší od hydrodynamického průměru uvedeného od výrobce a potvrzeného pomocí metody DLS (viz níže), který je přibližně 200 nm. Hydrodynamický poloměr udává poloměr nejen částice ale i jejího solvatačního obalu či jiné naadsorbované vrstvy na povrchu. [64]

Lze si povšimnout i tendence nanočástic agregovat, což ale může být způsobeno i přípravou vzorku na měření pomocí TEM (vysychání vzorku). Zároveň je na obrázku s větším zvětšením patrná amorfnní vrstva pokrývající povrch nanočástic, kterou tvoří polymer karboxymethyl-dextran.



Obrázek č. 16: TEM snímky superparamagnetických nanočástic s navázaným laktoferinem – a) s měřítkem 500 nm a b) s měřítkem 50 nm.

Obrázek č. 16 zobrazuje TEM snímky komplexu SPIO-Lf. Zde lze vidět, že po navázání laktoferinu mají nanočástice poněkud větší tendenci agregovat. To bylo potvrzeno i měřením DLS (viz níže). Vrstva navázaného laktoferinu bohužel není dobře vidět, protože polymer karboxymethyl-dextran zřejmě tvoří větší podíl amorfnní fáze než nakonjugovaný protein laktoferin.

2.2. Dynamický rozptyl světla

Naměřené hodnoty maximálního hydrodynamického průměru d_{\max} , průměrného hydrodynamického průměru $d_{\text{prům}}$ a stupně polydisperzity (PDI) pro superparamagnetické nanočástice SPIO a nanočástice s navázaným laktoferinem SPIO-Lf jsou uvedeny v tabulce č. 1.

vzorek	d_{\max} [nm]	$d_{\text{prům}}$ [nm]	PDI
SPIO	210,833	193,467	0,126
SPIO-Lf	270,567	264,067	0,253

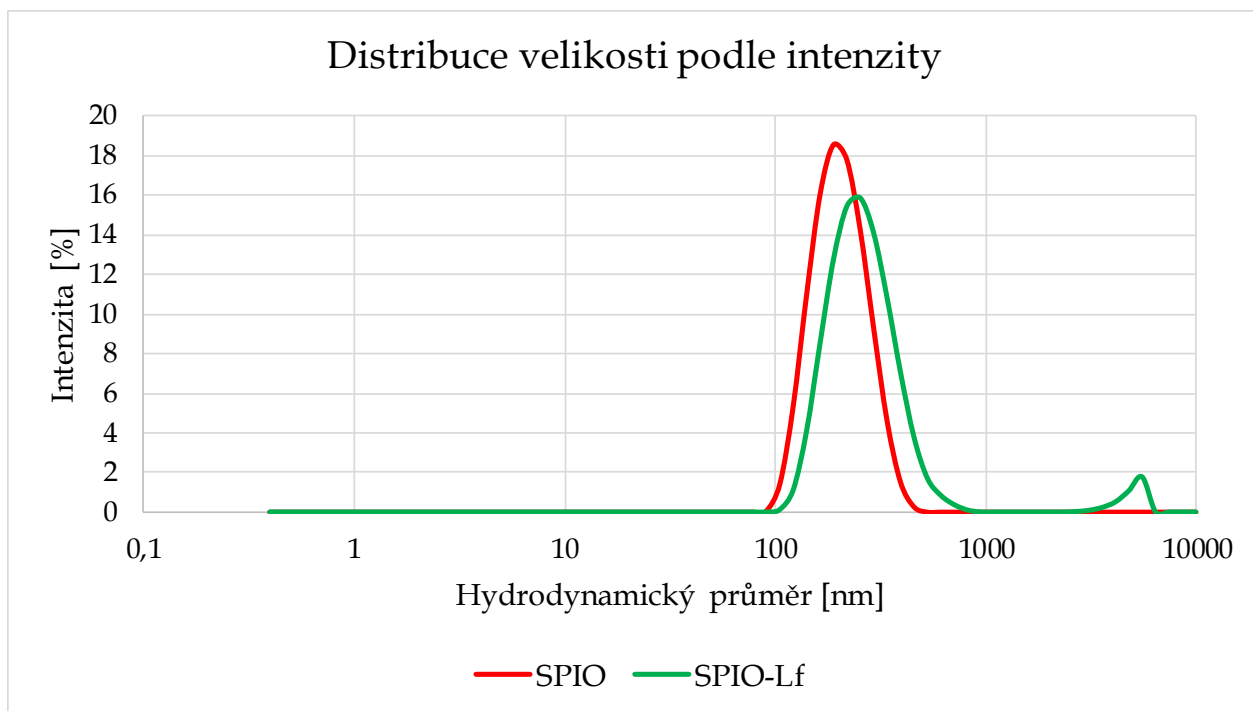
Tabulka č. 1: Naměřené hodnoty hydrodynamických velikostí nanočástic pro SPIO a SPIO-Lf. V druhém sloupci nalezneme naměřené hodnoty maximálního průměru.

V třetím hodnoty průměrné. A v posledním sloupci máme jednotlivé hodnoty polydisperzity.

Z tabulky č. 1 si lze povšimnout, že velikost 200 nm, jak udává výrobce, je opravdu reálná. Za to po navázání laktoferinu se velikost zvýšila o přibližně 60–70 nm, tento posun lze brát také jako potvrzení navázání laktoferinu.

V posledním sloupečku jsou uvedeny hodnoty polydisperzity. Z hodnot lze určit, že oba vzorky se řadí mezi polydisperzní, avšak jejich hodnoty PDI jsou stále velmi malé, tedy distribuce velikostí bude úzká.

Tento závěr lze potvrdit i ze změřeného grafu závislosti intenzity rozptýleného světla na velikosti nanočástic uvedeného na obrázku č. 17. Šířky distribučních píků jsou úzké (hlavně u vzorku SPIO). Z grafu je možné i odvodit maximální množství částic o daném hydrodynamickém průměru, kdy je intenzita pro daný vzorek největší.



Obrázek č. 17: Graf závislosti intenzity rozptýleného světla na velikosti nanočástic – pro vzorek samostatných nanočástic (červeně) i vzorek s navázaným laktoferinem (zeleně).

Naměřené hodnoty zeta potenciálu a konduktivity pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce č. 2. Konduktivita neboli měrná elektrická vodivost je veličina popisující schopnost látky vést elektrický proud.

vzorek	ζ potenciál [mV]	konduktivita [mS/cm]
SPIO	-10,66	0,015
SPIO-Lf	-9,84	0,362

Tabulka č. 2: Naměřené hodnoty zeta potenciálu a konduktivity pro jednotlivé vzorky.

Z tabulky č. 2 vyplývá, že koloid nanočástic se nedá považovat za příliš stabilní systém a nanočástice budou mít tendenci postupně agregovat či aglomerovat. Pro vzorek s laktoferinem i bez laktoferinu se hodnoty pohybují okolo -10 mV. Zajímavostí je výrazné zvýšení konduktivity po navázání laktoferinu.

2.3. Imobilizace laktoferinu

Navazování laktoferinu na nanočástice bylo prováděno v poměru 1:5. Tedy na 2 mg nanočástic SPIO se do roztoku přidávalo 400 µg laktoferinu. Koncentrace nanočástic je uvedená v protokolu od výrobce (viz příloha) a její hodnota je 25 mg/ml.

V dalším kroku bylo nutné vytvořit si roztoky laktoferinu a EDC. Laktoferin se po navážce smíchal s ultračistou vodou (ddH₂O) a pro usnadnění rozpouštění se vložil na chvíli do rotátoru. Cílem bylo vytvořit roztok o koncentraci 1,5–3 mg/ml, kdy podle výsledné koncentrace se dopočítalo množství, jaké je potřeba k nanočásticím přidat pro zachování hmotnostního poměru. Roztok laktoferinu se před použitím ještě přefiltroval přes 200 nanometrový filtr pro odstranění nežádoucích nečistot či možné kontaminace samotného laktoferinu.

Roztok EDC se vytvářel obdobně. Po navážce (10 mg) se EDC smíchalo s 100 µl fosfátového pufru či PBS (fosfátový pufr s 0,15 M NaCl – pufovaný fyziologický roztok).

Následně se už roztoky jen smíchaly v daném poměru. Pro výsledný vzorek o koncentraci 4 mg SPIO/ml se smíchaly tyto objemy:

- 80 µl SPIO
- 4 µl roztoku EDC
- 167 µl roztoku laktoferinu (koncentrace roztoku Lf – 2,4 mg/ml)
- 249 µl PBS

Tím vznikl celkový objem výsledného roztoku 500 µl a výsledná koncentrace činí 4 mg SPIO/800 µg Lf/ml. Po smíchání se výsledný roztok SPIO-Lf vložil na 24 hodin do chladničky (12 °C) a rotátoru (Biosan Multi Bio RS-24).

Po 24 hodinách byla provedena centrifugace roztoku (10 minut, 9 000 rpm, 20°C). Po centrifugaci se odebral supernatant a k nanočásticím se opět přidal 1 ml PBS. V případě potřeby se centrifugace opakovala pro zajištění důkladného promytí a odstranění volného nenavázaného laktoferinu. Po promytí byl roztok ultrasonifikován pro dosažení homogenního koloidu.

Důležité je podotknout, že v rámci využití vzorku pro bioaplikace, bylo nutné provádět veškeré manipulace se vzorkem ve sterilním prostředí (flow-box) a za užití sterilních nástrojů i roztoků.

2.4. Bradfordova metoda

Pro zjištění množství laktoferinu v odpipetovaném supernatantu je důležité vytvoření kalibrační křivky měřením absorbance (při 595 nm) kalibračních roztoků o přesných koncentracích laktoferinu – 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml a 40 µg/ml.

Ve většině případech ale množství laktoferinu vloženého do reakce přesahovalo oblast kalibrační křivky danou koncentracemi kalibračních roztoků (5–40 µg/ml) a bylo nutné supernatant zředit.

Výpočet nutného zředění byl proveden za předpokladu, že koncentrace laktoferinu v supernatantu je rovna koncentraci laktoferinu vloženého do reakce. Tedy pro výše zmíněné navazování bylo do reakce vloženo 400 µg laktoferinu na 500 µl roztoku. Supernatant bylo tedy potřeba zředit dvacetkrát, aby se hodnotou dostalo na horní hranici oblasti kalibrační křivky (40 µg/ml).

Do tří až čtyř zkumavek se smíchal roztok 25 µl supernatantu, 475 µl PBS a 500 µl Bradfordova činidla. Do dvou zkumavek se připravil slepý (kontrolní) vzorek, tedy roztok 500 µl PBS a 500 µl Bradfordova činidla. Všechny připravené zkumavky se vložily na chvíli míchat do už výše zmíněného rotátoru v chladničce pro zajištění dostatečného smíchání roztoků.

Jako první se na spektrofotometru změřila absorbance pro 1 ml PBS pro stanovení nulové hodnoty absorbance (referenční vzorek). Posléze se v kyvetách změřily všechny připravené roztoky supernatantů a slepých vzorků.

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 3.

vzorek	absorbance	průměr
supernatant	0,190	0,192
	0,180	
	0,213	
	0,186	
slepý	0,135	0,134
	0,133	

Tabulka č. 3: Naměřené hodnoty absorbance pro supernatant a slepý vzorek.

Pro reálnou hodnotu absorbance supernatantu se od průměrného hodnoty absorbance všech vzorků supernatantu odečte průměrná hodnota absorbance slepého vzorku – viz rovnice (1), (2).

$$A = \bar{A} - \bar{A}_s \quad (1)$$

$$A = 0,058 \quad (2)$$

Rovnice kalibrační křivky (3) vypočítaná pomocí měření kalibračních roztoků a převzatá z [40] je

$$y = 0,0113 \cdot x + 0,027, \quad (3)$$

kde y je absorbance a x koncentrace. Po dosazení do rovnice (3) koncentrace vychází

$$c = \frac{0,058 - 0,027}{0,0113} = 2,73 \text{ } \mu\text{g/ml}. \quad (4)$$

Hodnota koncentrace v (4) je ale koncentrace laktoferinu po zředění. Tedy správná koncentrace laktoferinu v supernatantu je

$$c_s = (2,73 \cdot 20) \text{ } \mu\text{g/ml} = 54,6 \text{ } \mu\text{g/ml}. \quad (5)$$

Po výpočtu množství laktoferinu v supernatantu je výpočet množství navázaného laktoferinu na nanočástice jednoduchý.

Do reakce bylo vloženo 400 μg Lf (800 $\mu\text{g/ml}$). V supernatantu je ale pouze 54,6 $\mu\text{g/ml}$. Jednoduchým odečtením vychází, že množství Lf na nanočásticích je **745,4 μg Lf na 4 mg SPIO na 1 ml roztoku.**

Tedy v namíchaném množství 500 μl je na nanočásticích navázáno 372,7 μg laktoferinu z 400 μg vložených do reakce. Navázalo se **93,2 %** laktoferinu.

Tento postup byl opakován pro všechny testy. Procentuální úspěšnost navázání laktoferinu pro jednotlivé testy je uvedena v tabulce č. 4.

měření	$m_{\text{celk}}(\text{Lf})$	$m_{\text{SPIO}}(\text{Lf})$	%
1	400	372,7	93,2
2	800	767,3	95,9
3	400	386,6	96,7
4	800	531,9	66,5

Tabulka č. 4: Tabulka s uvedenými hodnotami množství laktoferinu v μg vloženého do reakce ($m_{\text{celk}}(\text{Lf})$) a množství navázaného na nanočástice ($m_{\text{SPIO}}(\text{Lf})$) a procentuální úspěšnost navázání (%) pro všechna provedená měření.

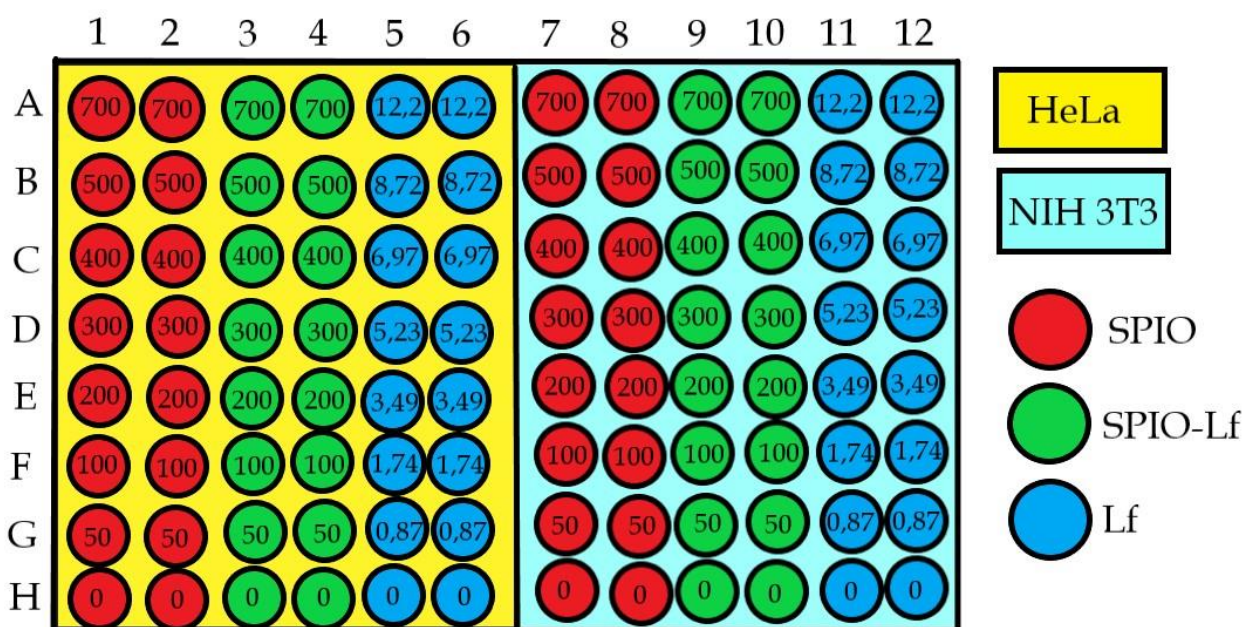
2.5. Značení buněk

Pro vybrané koncentrace se trojčlenkou spočítá, jaký objem vzorku je potřeba k buňkám dodat pro její dosažení. Jelikož používané nanočástice SPIO byly velmi koncentrované (25 mg/ml), musely by se pipetovat velmi malé objemy, což bývá

mnohdy nesnadné a nepřesné. Prvním krokem bylo zředění nanočástic na přívětivější koncentraci – 4 mg/ml. Pak tedy například pro dosažení koncentrace 700 µg/ml se vypočítá požadovaný objem vzorku x pomocí rovnice (6)

$$x = \frac{700}{4000} = 0,175 \text{ ml} = 175 \text{ µl.} \quad (6)$$

Jelikož se ale jedná o jamku o objemu 100 µl výsledný objem se musí vydělit deseti. Tedy pro dosažení koncentrace 700 µg/ml v 100 µl jamce je potřeba 17,5 µl roztoku SPIO nanočástic o koncentraci 4 mg/ml. Při značení se nejprve odebere odpovídající objem média a následně se přidá požadované množství roztoku. Příklad rozložení koncentrací jednotlivých vzorků pro zvolených 96 jamek je uveden na obrázku č. 18.

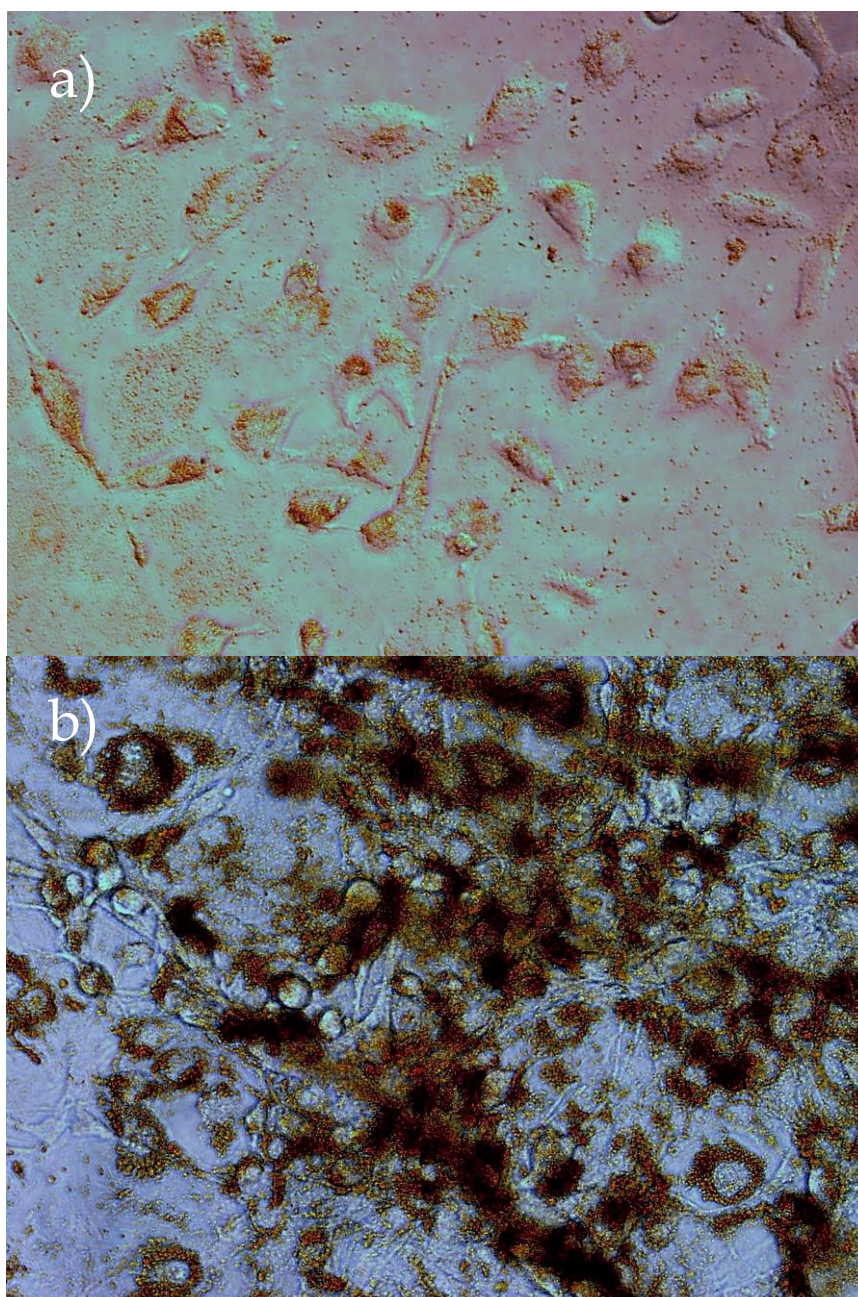


Obrázek č. 18: Schéma naznačeného kultivačního panelu, kde hodnoty v jamkách pro vzorky SPIO a SPIO-Lf udávají koncentraci v µg/ml a pro vzorek Lf hodnoty udávají hmotnost přidaného laktoferinu v µg.

Pro vzorek samostatného laktoferinu byl výpočet lehce složitější. Nešlo totiž o shodnou koncentraci, ale o možnost srovnat výsledky viabilit pro vzorek SPIO-Lf a Lf. Tudíž se muselo shodovat množství laktoferinu v obou vzorcích. Pomocí Bradfordovy metody se vypočítalo množství laktoferinu navázaného na nanočástice pro jednotlivá měření (viz výše). Pak už se snadno pomocí přímé úměry zjistilo, jaké množství laktoferinu se vlastně přidává k buňkám pro koncentrace SPIO-Lf

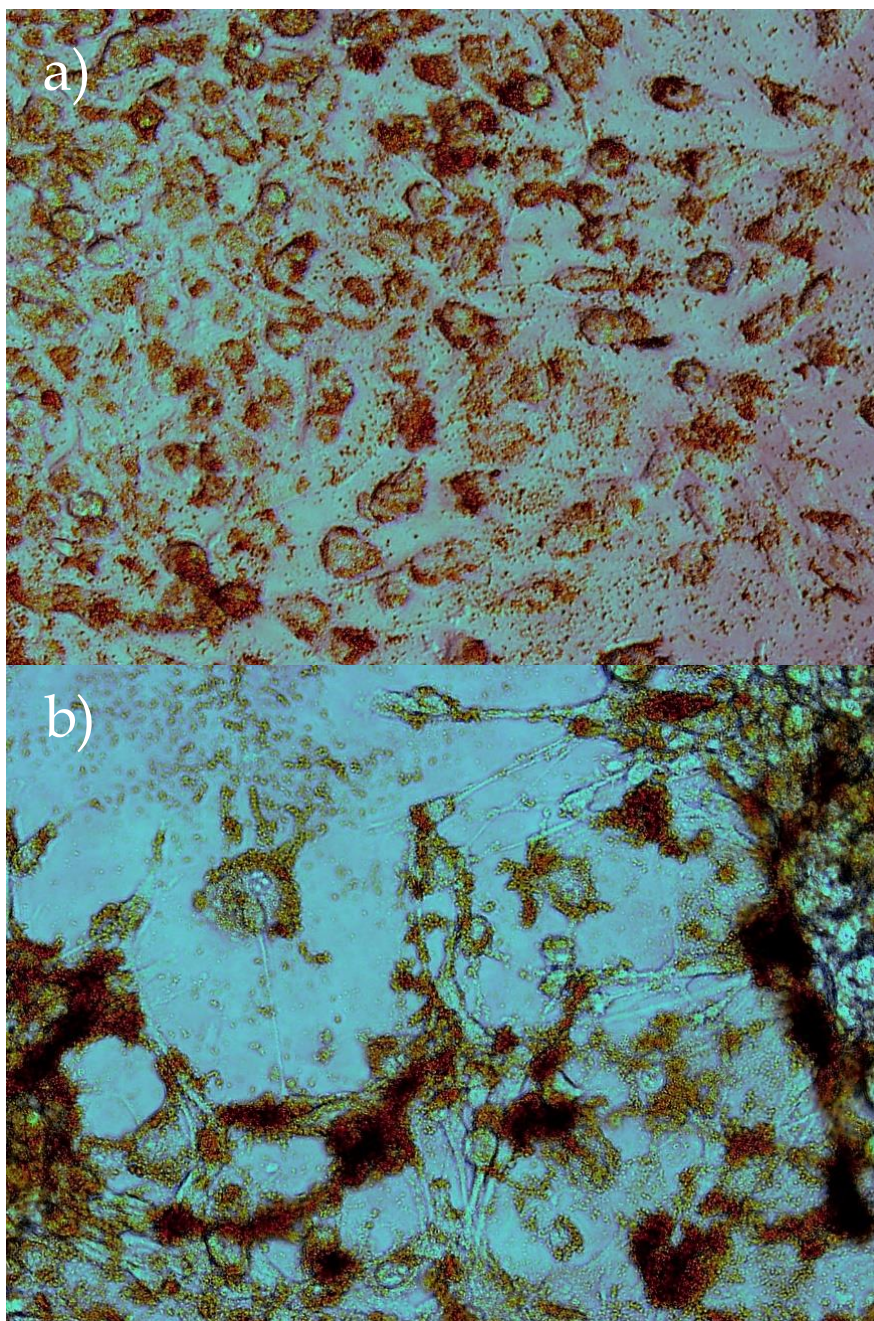
50–700 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A opětovně se jednoduchým výpočtem zjistí objem roztoku laktoferinu, který odpovídá stejné hmotnosti laktoferinu.

Po naznačení se opět kultivační panel vloží na 24 hodin do inkubátoru. Po uplynutí této doby byly pořízeny snímky optickým mikroskopem pro každý vzorek a jeho vybrané koncentrace – viz obrázek č. 19–21. Pro vzorky SPIO a SPIO-Lf se použilo zvětšení objektivu 40x, pro vzorek samostatného Lf pouze zvětšení 20x.



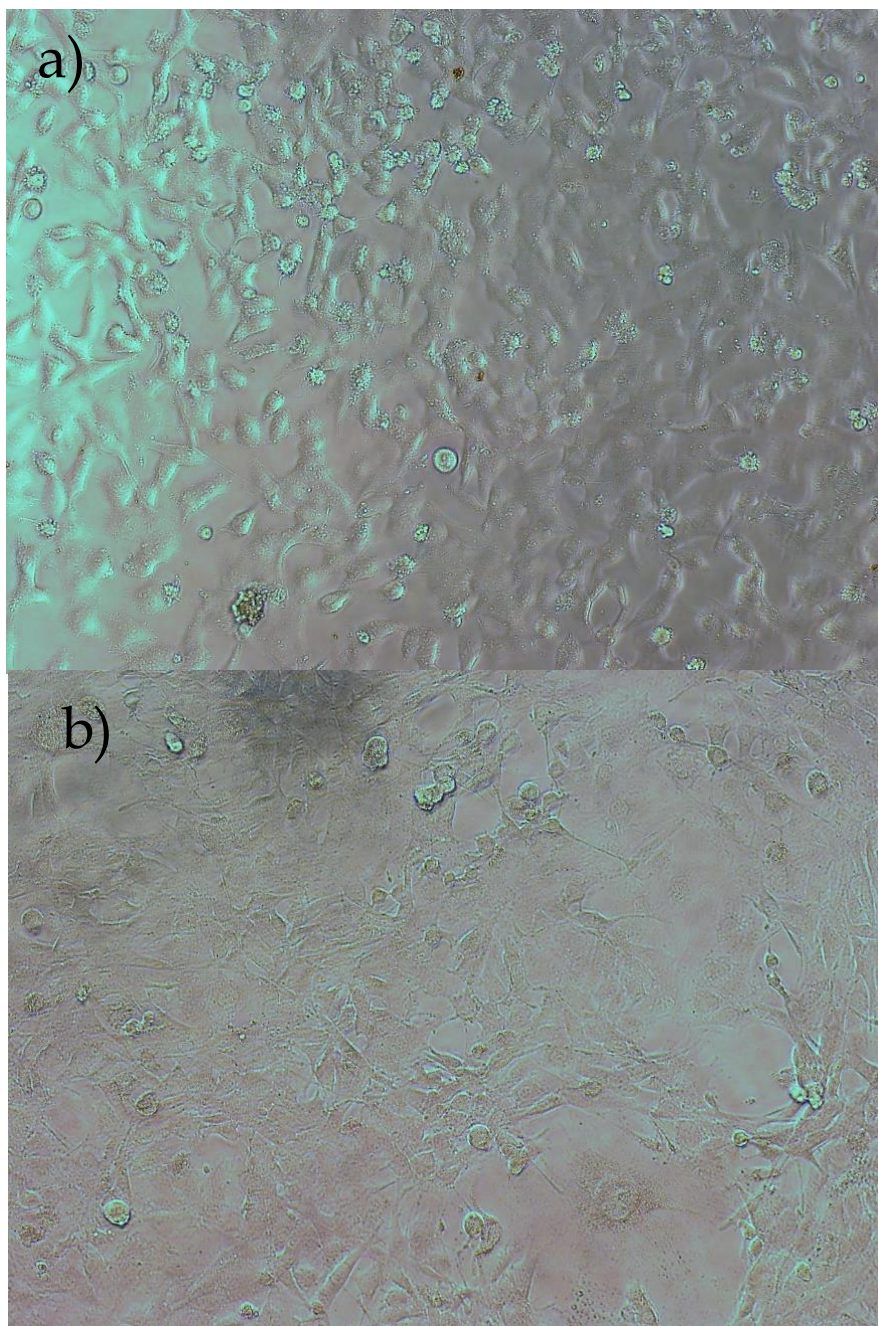
Obrázek č. 19: Snímek naznačených buněk vzorkem SPIO nanočástic o koncentraci 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – a) HeLa, b) NIH 3T3.

Na obrázku č. 19 si lze povšimnout, jak pro stejný vzorek a stejnou koncentraci se nanočástice chovaly u jednotlivých buněk zcela odlišně. U nádorových buněk (HeLa) lze zcela jasně zpozorovat, že část nanočástic pronikla do buněk a zbytek nanočástic zůstal v koloidní formě v médiu. Zato u buněk zdravých (NIH 3T3) vzorek, který se nedostal do buněk, vytvořil shluky nad buňkami.



Obrázek č. 20: Snímek naznačených buněk vzorkem SPIO-Lf o koncentraci 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ –
a) HeLa, b) NIH 3T3.

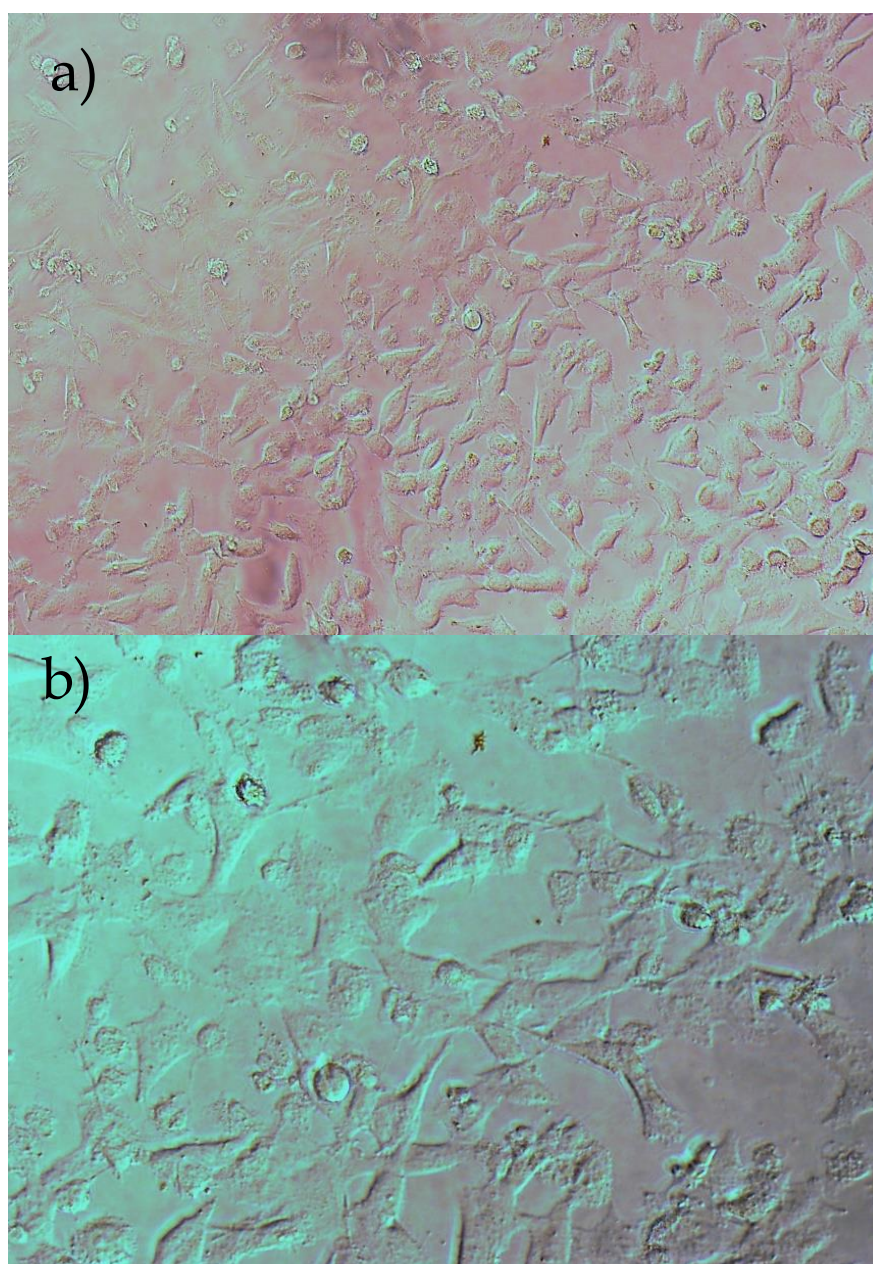
Ke stejnému závěru lze dojít i při pohledu na obrázek č. 20. Zde je snadno viditelný rozdíl mezi chováním nanočástic s laktoferinem u jednotlivých buněk. Při porovnání obrázku č. 19 a č. 20 si lze povšimnout, že přítomnost laktoferinu ještě umocňuje tendenci agregovat, jak bylo viditelné i na TEM snímcích (obrázky č. 15–16) či z tabulky u DLS (tabulka č. 1). Proto i u HeLa buněk si lze povšimnout shluků nanočástic na povrchu buněk. Větší tendence se shlukovat by se daly odvodit i z menší hodnoty zeta potenciálu pro nanočástice s laktoferinem SPIO-Lf.



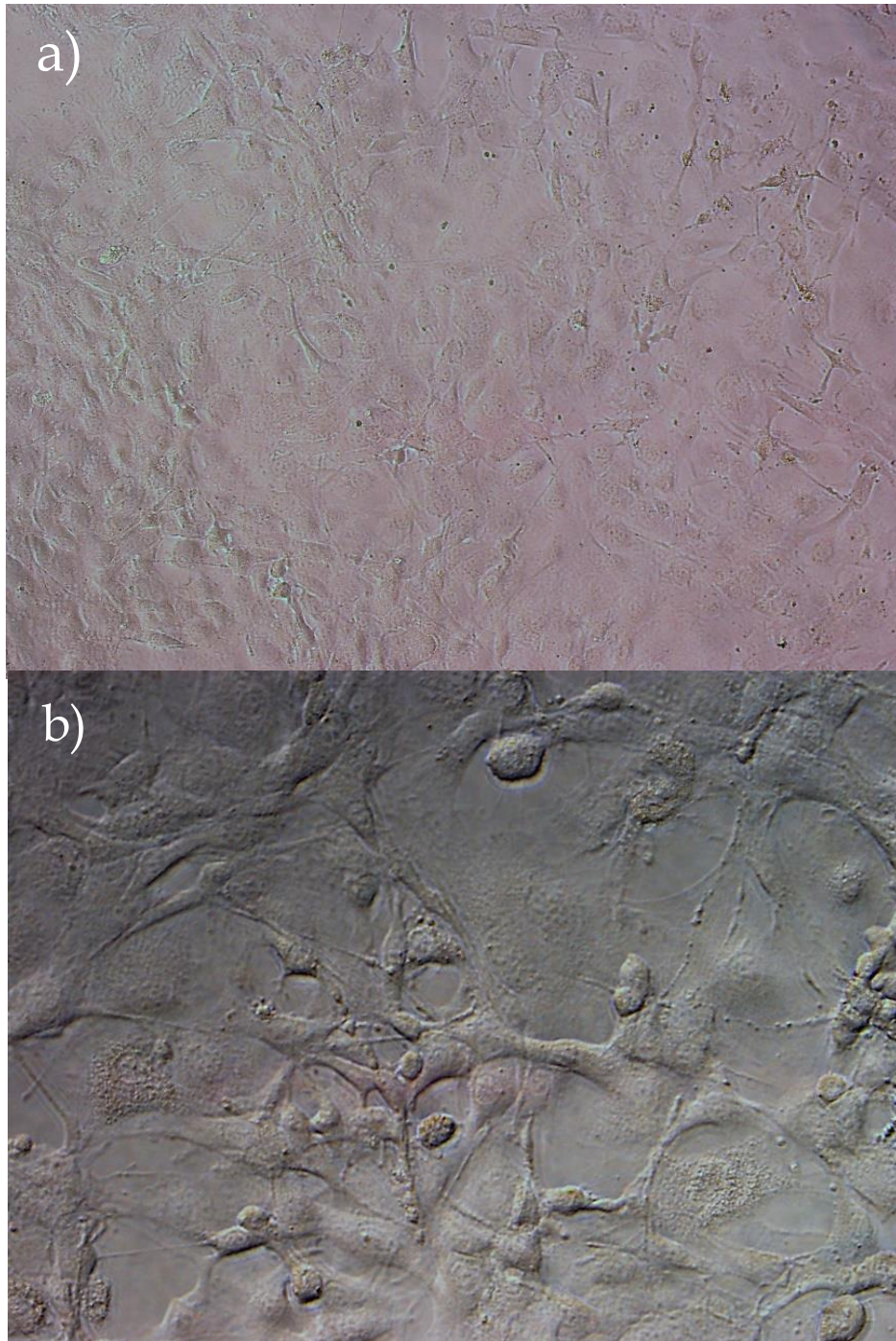
Obrázek č. 21: Snímek naznačených buněk vzorkem laktoferinu o hmotnosti Lf 0,87 μg (odpovídající koncentraci SPIO-Lf 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) – a) HeLa, b) NIH 3T3.

Na obrázku č. 21 jsou uvedeny snímky buněk naznačených samostatným laktoferinem. Z nich se toho díky narůžovělé barvě roztoku laktoferinu nedá moc odvodit, ale lze si povšimnout i několika mrtvých buněk (kulatý tvar) a to více u nádorových buněk než u zdravých.

Na následujících snímcích (obrázek č. 22–23) jsou zobrazeny snímky kontrolních (nenaznačených) jamek pro nádorové buňky (obrázek č. 22) a buňky zdravé (obrázek č. 23). I zde si lze povšimnout mrtvých buněk, které indikují, že reálná viabilita kontrolních buněk nebude stoprocentní. Díky tomu ve většině testech viability vyvstává nutnost normování výsledných hodnot viability podle reálné (nestoprocentní) viability kontrolních buněk.



Obrázek č. 22: Snímky kontrolních jamek pro nádorové buňky HeLa – a) zvětšení objektivu 20x, b) zvětšení objektivu 40x.



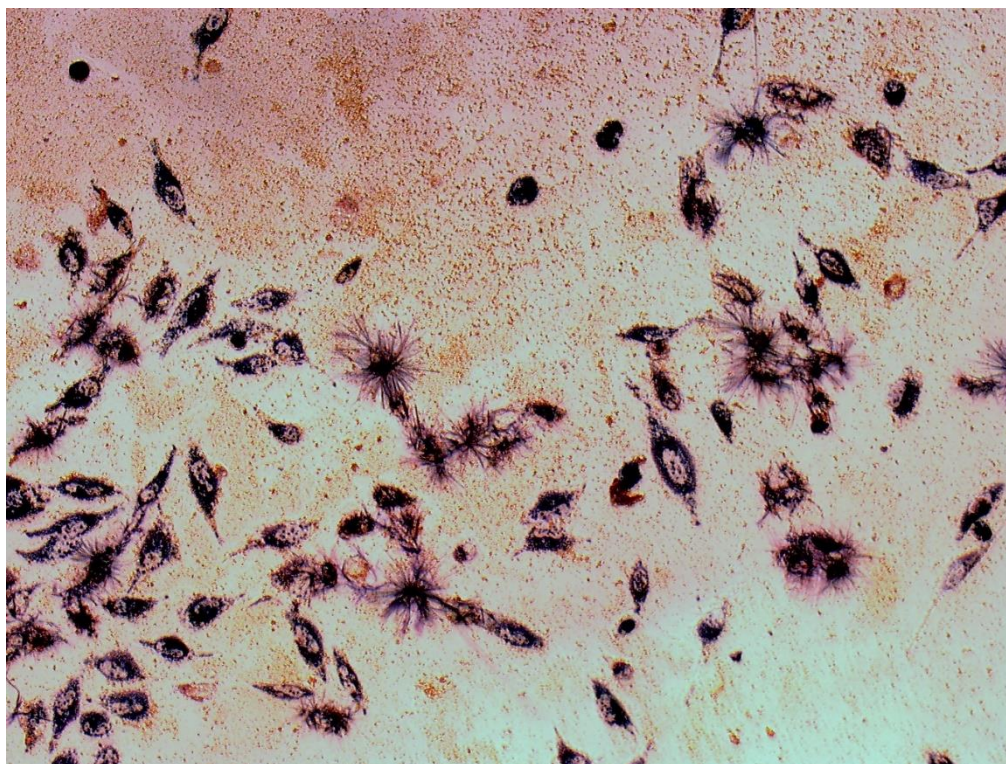
Obrázek č. 23: Snímky kontrolních jamek pro zdravé buňky NIH 3T3 – a) zvětšení objektivu 20x, b) zvětšení objektivu 40x

2.6. MTT test

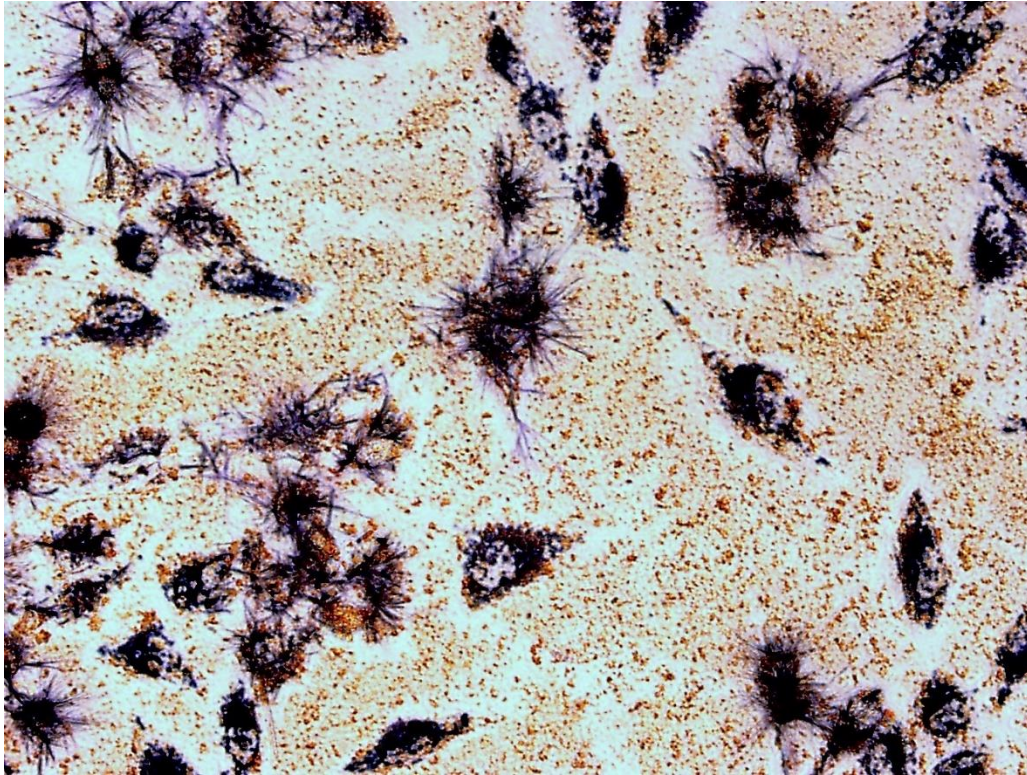
Dvacet čtyři hodin po označení buněk se provádí samotný MTT test. Prvním krokem je přidání 20 μl roztoku MTT (3-[4,5-dimethylthiazol2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid) o koncentraci 5 mg/ml do každé jamky bez odebrání média. Následně se kultivační panel vrátí na 4 hodiny do inkubátoru. Po uplynutí čtyř hodin je jasně pozorovatelné zabarvení do tmavě modra díky vytvoření krystalků formazanu (viz obrázek č. 24–25).

Obsah kultivačního panelu se opatrně vyklepne do výlevky a do každé jamky se přidá 100 μl detergentu – konkrétně dimethylsulfoxidu (DMSO). Ten slouží k rozpuštění krystalků formazanu. Po přidání DMSO se panel vloží na 15 minut na elektrickou míchačku.

V této chvíli už zbývá poslední krok, a to je samotné měření absorbance. To se provádí pomocí spektrofotometru při vlnové délce 570 nm.



Obrázek č. 24: Snímek nádorových buněk označených nanočásticemi SPIO (koncentrace 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a po vytvoření krystalků formazanu. Zvětšení objektivu 20x.



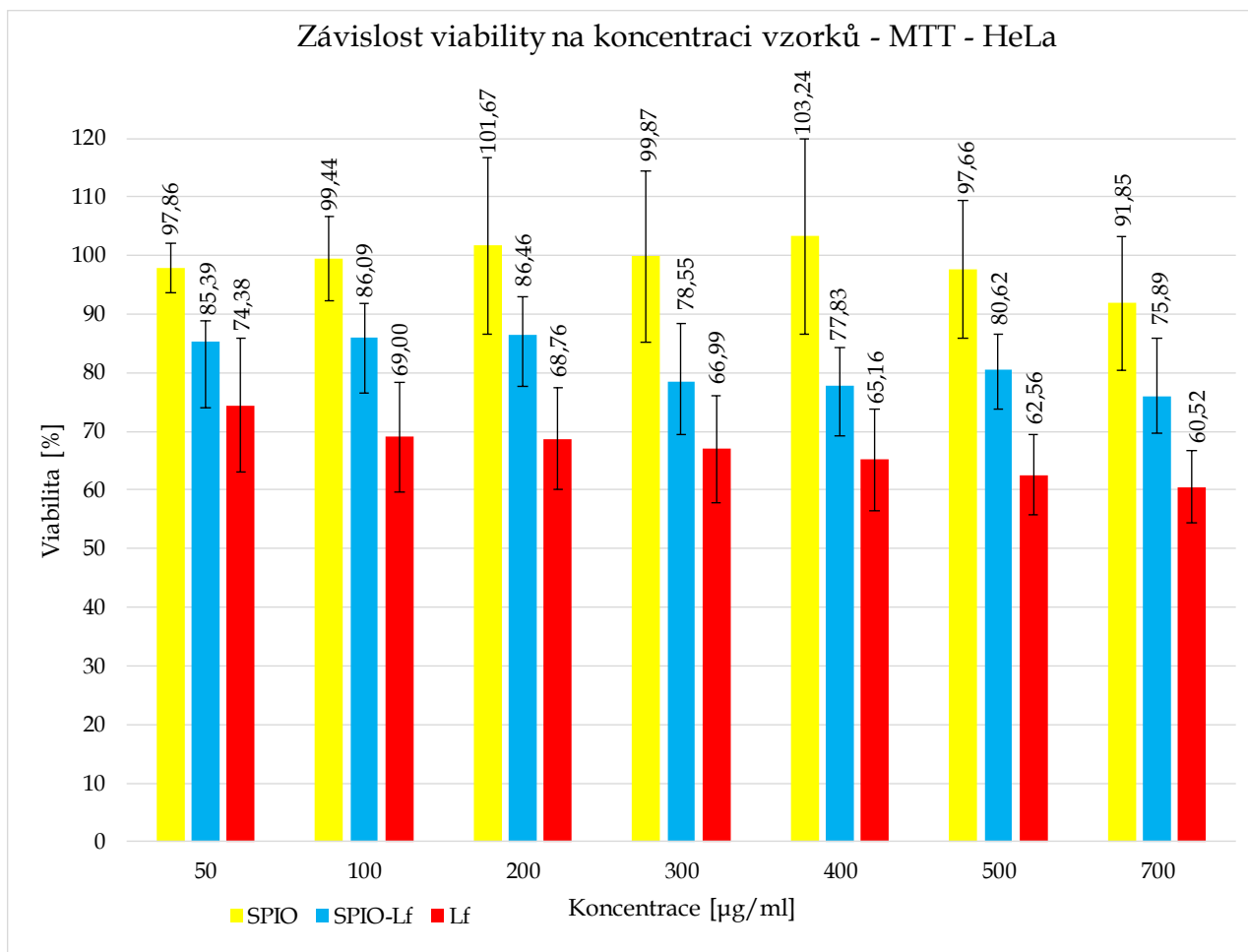
Obrázek č. 25: Snímek nádorových buněk naznačených nanočásticemi SPIO (koncentrace 500 µg/ml) a po vytvoření krystalků formazanu. Zvětšení objektivu 40x.

Po naměření absorbancí jednotlivých jamek se zprůměrují hodnoty pro jednotlivé koncentrace a také hodnoty všech kontrolních jamek.

Následně se pomocí vzorce (7) vypočítá viabilita a z těchto hodnot se vytvoří graf. Výpočtem dle vzorce (7) se normují jednotlivé hodnoty viability podle nestoprocentní reálné hodnoty buněk kontrolních a viabilita kontrolních buněk se tím pokládá rovná 100 %.

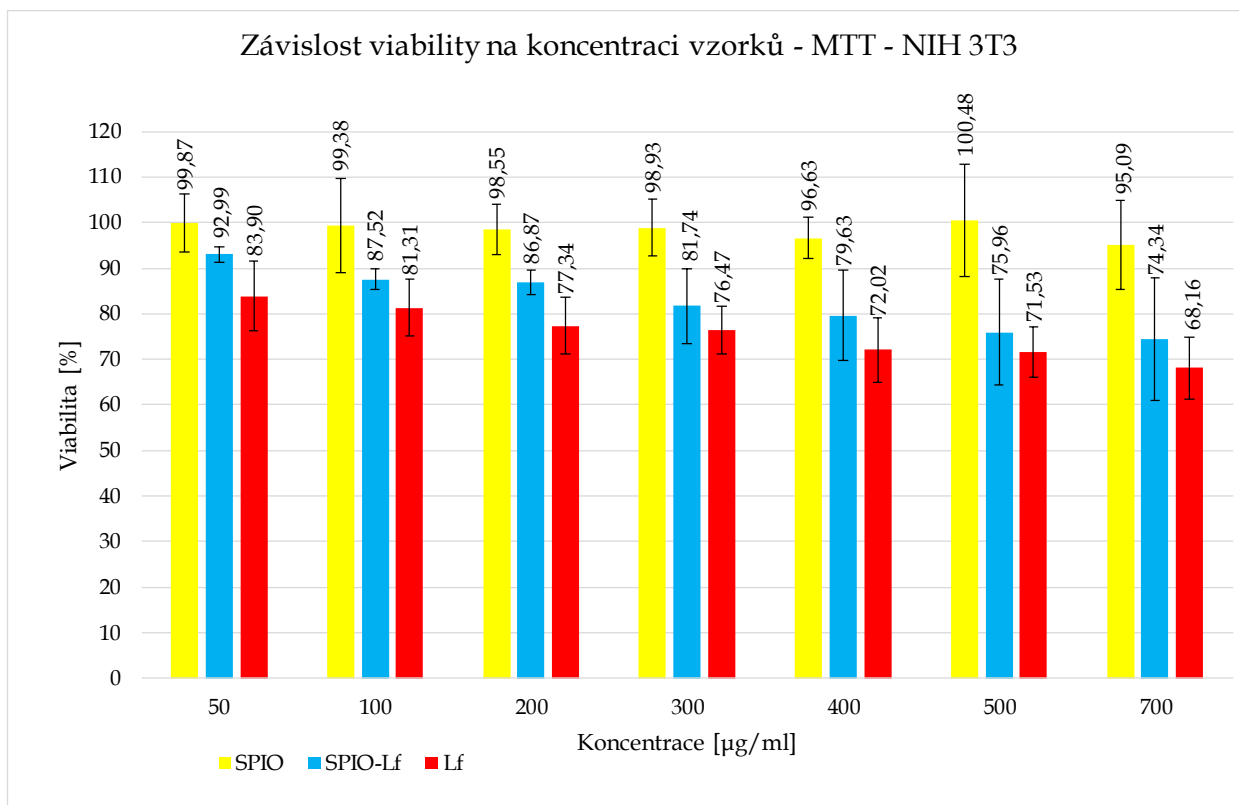
$$\text{viabilita [\%]} = \frac{\text{průměrná absorbance pro danou koncentraci}}{\text{průměrná absorbance kontrolních jamek}} \cdot 100 \quad (7)$$

Výsledné viability byly pro všechny testy zprůměrovány a byl vytvořen histogram vyobrazující závislost viability na koncentraci pro jednotlivé vzorky a pro každý typ buněk (obrázky č. 26–27).



Obrázek č. 26: Graf závislosti viability na koncentraci vzorků pro nádorové buňky. Čísla nad sloupci udávají hodnotu viability a černé úsečky reprezentují průměrné směrodatné odchylky z pěti nezávislých měření.

Z obrázku č. 26 lze vyčíst biokompatibilitu samostatných SPIO nanočástic, kde viabilita neklesá pod 91 %. U SPIO-Lf jsou hodnoty nižší, což lze přisoudit navázanému laktoferinu v případě nádorových buněk. Vzorek se ale stále dá považovat za biokompatibilní, zde hodnota u nejvyšší koncentrace (700 µg/ml) neklesla pod 75 %. Zato u samostatného laktoferinu lze pozorovat jeho antikarcinogenní účinky, tedy negativní vliv na viabilitu nádorových buněk. U vyšších koncentrací se dostáváme k 60% viabilitě. Černé úsečky reprezentují průměrné směrodatné odchylky z pěti nezávislých testů, dávají tedy přehled, jak moc se jednotlivá měření ve výsledcích lišila.



Obrázek č. 27: Graf závislosti viability na koncentraci vzorků pro zdravé buňky. Čísla nad sloupci udávají hodnotu viability a černé úsečky reprezentují průměrné směrodatné odchylky ze čtyř nezávislých měření.

U zdravých buněk je zřejmý stejný fenomén biokompatibility SPIO, zde dokonce ani u nejvyšších koncentrací hodnota neklesá pod 95 %. Obdobně jako u buněk nádorových je zde vidět snížená viabilita u komplexu SPIO-Lf, i když nejnižší hodnota viability je vyšší než u HeLa buněk (74 %). Nejnižší hodnoty viability patří opět vzorku laktoferinu, ale i zde jsou hodnoty viabilit vyšší než u nádorových buněk (neklesají pod 68 %).

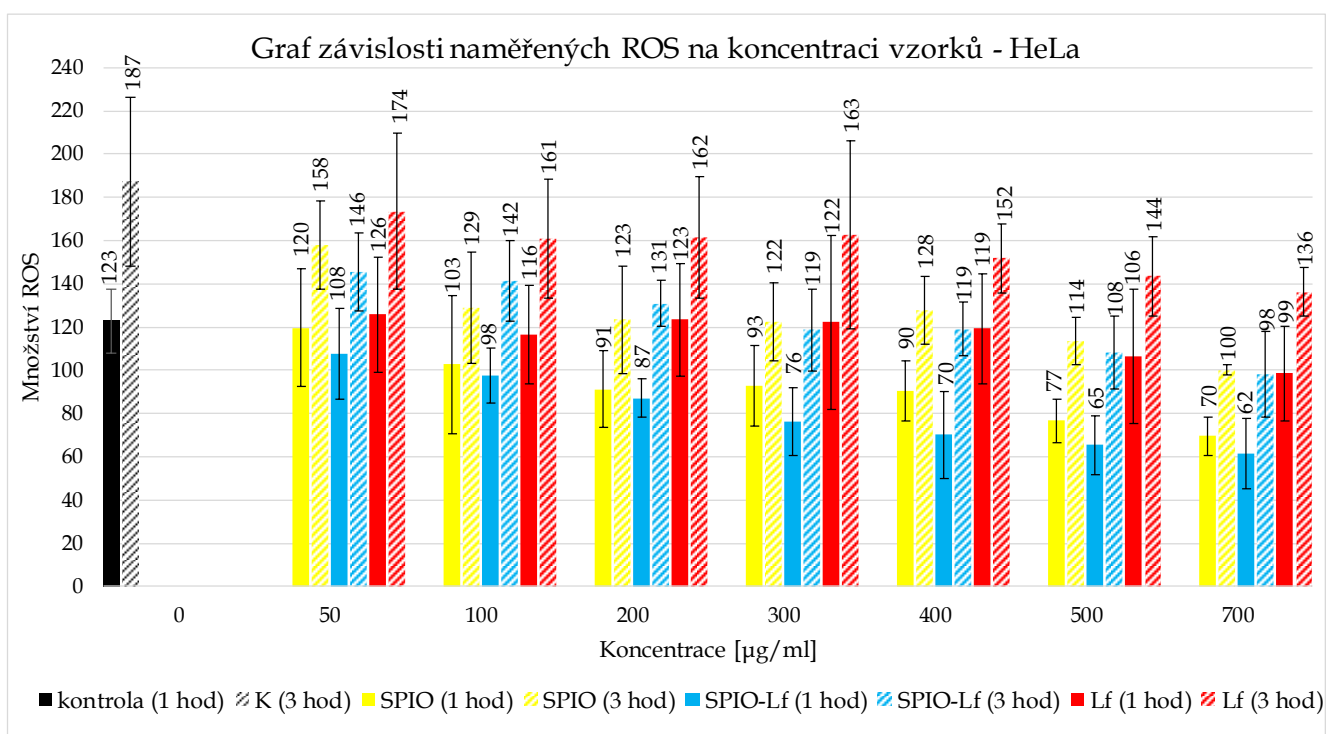
Těmito výsledky se potvrzuje i naměřená biokompatibilita vzorků SPIO a SPIO-Lf ve srovnání se studií [61] (viz obrázek č. 9).

2.7. Měření hladiny ROS

K fluorescenčnímu barvivu CM-H2DCFDA se přidá 172 μ l DMSO a do každé jamky s označenými i kontrolními buňkami se připipetuje 2 μ l sondy. Kultivační panel se vloží na hodinu do inkubátoru a následně se provede měření fluorescence. Měření se opakuje po dalších dvou hodinách pro zdokumentování nárůstu hladiny ROS.

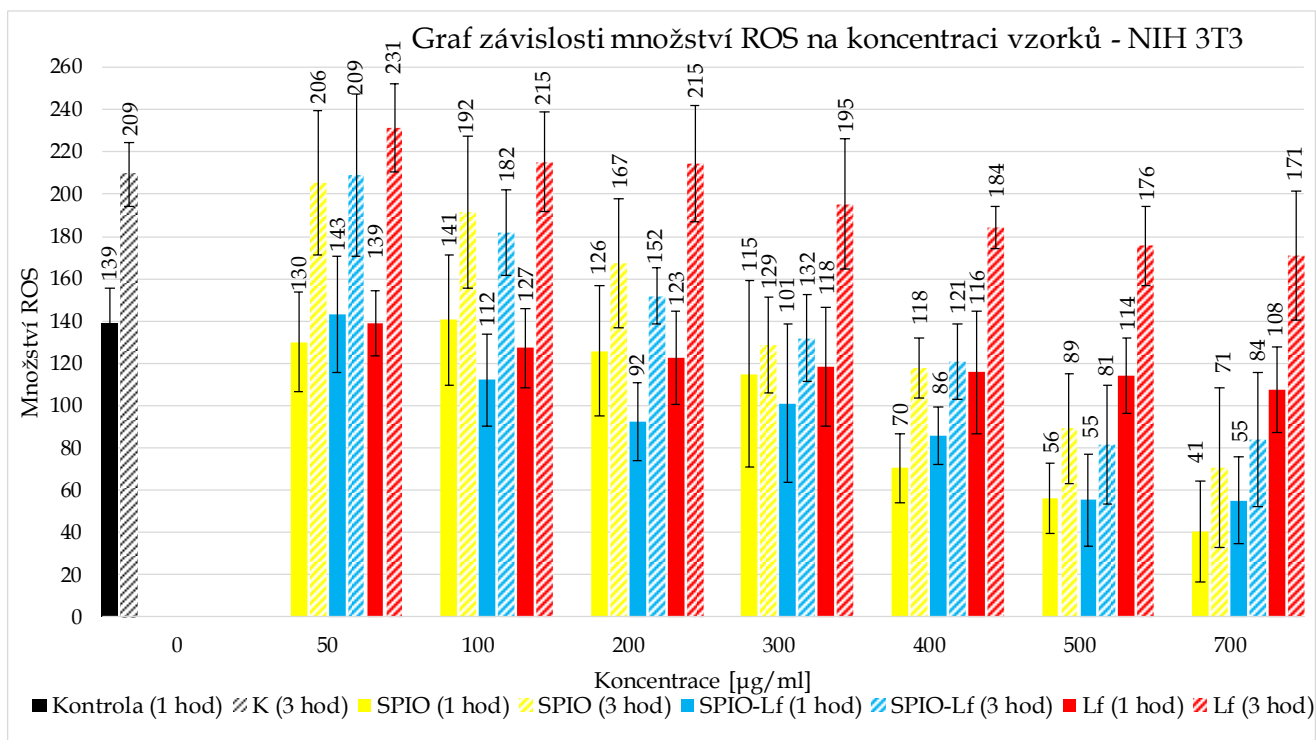
Výstupem měření jsou již hodnoty ROS pro jednotlivé jamky, které se pouze zprůměrují pro duplikátní jamky.

Výsledkem jsou histogramy zobrazující závislost množství ROS na koncentraci jednotlivých vzorků pro každý typ buněk (obrázky č. 28–29). V grafu jsou zahrnuty hodnoty množství ROS při měření po jedné hodině od přidání barviva i po třech hodinách.



Obrázek č. 28: Graf závislosti množství naměřených ROS na koncentraci vzorků pro nádorové buňky po jedné a třech hodinách od přidání fluorescenčního barviva. Čísla udávají množství ROS pro jednotlivé koncentrace a černé úsečky symbolizují průměrné směrodatné odchylky z pěti nezávislých měření. První sloupec od vzorku reprezentuje hodnotu ROS při měření po jedné hodině (plný sloupec) a druhý sloupec (šrafovaný) hodnotu ROS po třech hodinách.

Z histogramu na obrázku č. 28 lze vyčíst, že u vzorků SPIO a SPIO-Lf jsou hodnoty ROS menší než u kontrolních neznačených buněk. To je pravděpodobně způsobeno stíněním fluorescence sondy vzorky SPIO nanočástic. Díky tomu lze vysvětlit i výrazně nižší hodnoty ROS u vyšších koncentrací, kde stínění bylo logicky větší. U laktoferinu jsou hodnoty ROS srovnatelné s kontrolními buňkami, dá se předpokládat, že laktoferin nezpůsobuje oxidační stres. Zcela jasně lze u grafu pozorovat nárůst hladiny ROS při delším působení fluorescenčního barviva, což je pravděpodobně způsobeno z velké části toxicitou samotného barviva.



Obrázek č. 29: Graf závislosti množství naměřených ROS na koncentraci vzorků pro zdravé buňky po jedné a třech hodinách od přidání fluorescenčního barviva. Čísla udávají množství ROS pro jednotlivé koncentrace a černé úsečky symbolizují průměrné směrodatné odchylky. První sloupec od vzorku reprezentuje hodnotu ROS při měření po jedné hodině (plný sloupec) a druhý sloupec (šrafovaný) hodnotu ROS po třech hodinách.

V grafu popisující závislost hladiny ROS na koncentraci vzorků pro zdravé buňky lze nalézt prakticky stejný průběh jako u buněk nádorových. S tím rozdílem, že nárůst hladiny ROS po dalším dvouhodinovém působení je mnohem znatelnější. Stejně jako pokles ROS u vyšších koncentrací je zapříčiněn pravděpodobně silnějším stíněním fluorescence vzorkem, a to výrazněji u buněk zdravých než u buněk nádorových. Silnější stínění fluorescence může být způsobeno větší tendencí vzorku agregovat u zdravých buněk (viz obrázky č. 19–20).

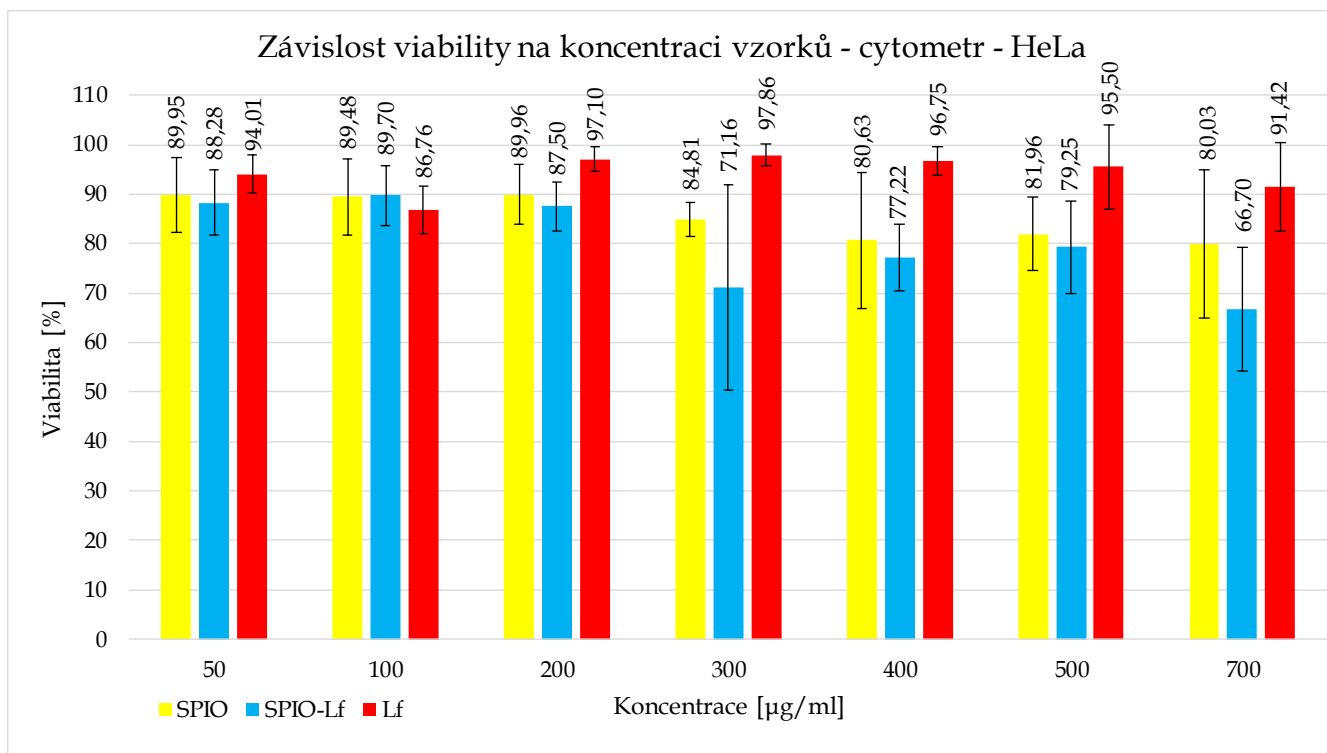
2.8. Průtokový cytometr

Pro správnou přípravu buněk na měření pomocí průtokového cytometru je nutné deadherovat buňky z každé jamky do jednotlivých zkumavek. Prvním krokem je odpipetování supernatantu do zkumavek, aby nedošlo ke zkreslení měření a zkumavka obsahovala i mrtvé deadherované buňky. Následně se zahřeje PBS, trypsin a dané médium na 37 °C. Postup je stejný jako pro pasážování buněk s tím rozdílem, že ke každé jamce se přistupuje jako k malé kultivační lahvi.

Každá jamka se promyje 50 μ l PBS pro odstranění zbytků média a poté se do ní přidá 30 μ l trypsinu. Kultivační panel se dá opět do inkubátoru. Po úspěšné deadheraci se přidá do každé jamky 100 μ l média a celý obsah jamky se přepipetuje do správné zkumavky k odpovídajícímu supernatantu.

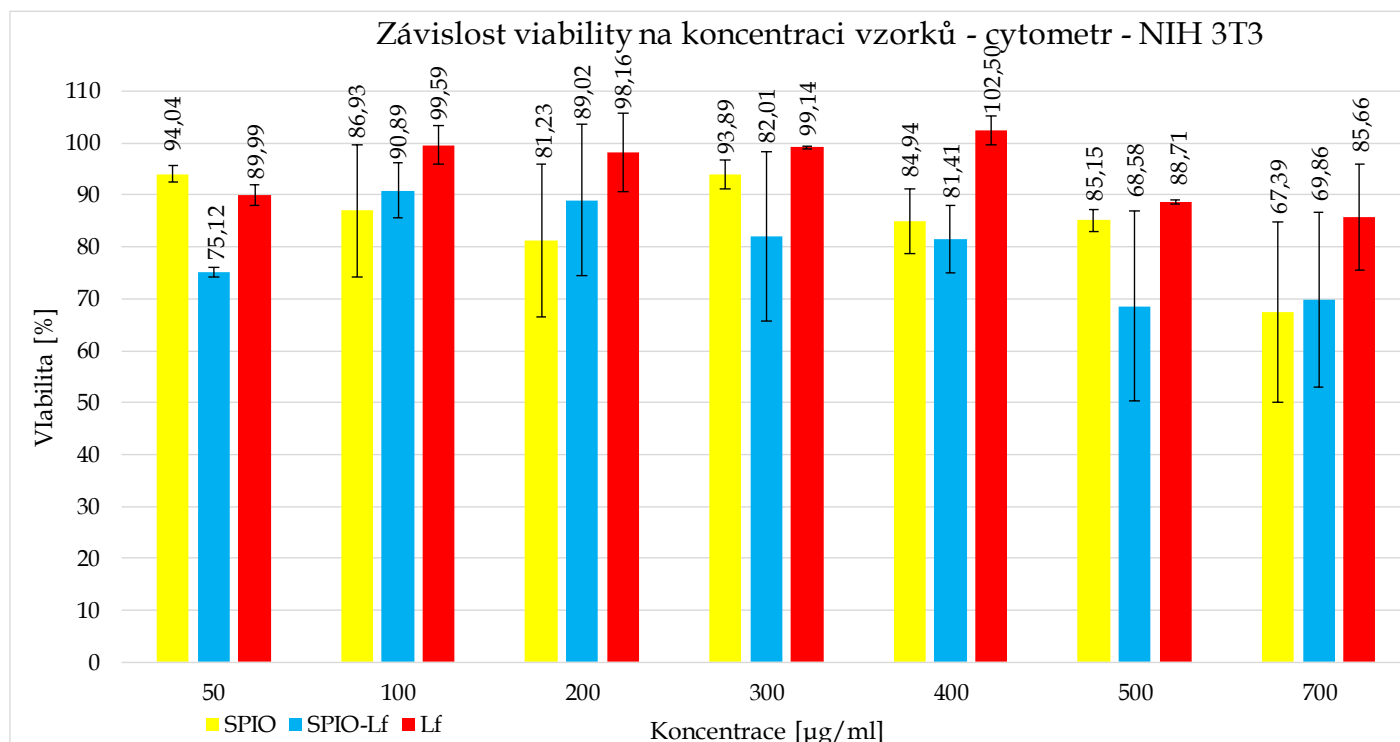
Do zvláštní zkumavky se smíchá roztok 2 μ l kalceinu ze zásobního roztoku se 158 μ l DMSO. Z tohoto vzniklého roztoku se pak ke každé zkumavce s buňkami přidají 2 μ l. Následně se ještě do každé zkumavky přidá 1 μ l propidium jodidu. A všechny vzorky se dají na 15 minut do tmy pro zajištění naznačení buněk fluorescenčními barvivy.

Výstupem měření je poměr mezi naměřenými živými a mrtvými buňkami a celkový počet změřených buněk. Z těchto dat se následně spočítá procentuální viabilita. Tu je nutno znormovat pomocí procentuální viability kontrolních buněk, aby se naměřená nestoprocentní viabilita kontrolních buněk položila maximu viability pro dané buňky.



Obrázek č. 30: Graf závislosti viability na koncentraci vzorků pro nádorové buňky. Čísla udávají hodnoty viability pro jednotlivé koncentrace a černé úsečky symbolizují průměrné směrodatné odchylky.

Z obrázku č. 30 lze potvrdit biokompatibilitu SPIO nanočástic, kde hodnota viability neklesá pod 80 %. Výrazně nižší jsou hodnoty viability pro komplex SPIO-Lf, kde viabilita klesá až k 66 %. Bylo by snadné tento pokles připsat antikarcinogenním účinkům laktoferinu. Ty se nám ale pro samotný laktoferin nepotvrdily, zde jsou naopak hodnoty viability nejvyšší a neklesají pod 86 %. Lze to vysvětlit tím, že laktoferin u nádorových buněk nezpůsobuje smrt, ale pouze negativně ovlivňuje metabolismus buňky (např. buněčné dýchání atd.). S omezeným metabolismem (konkrétně se sníženou aktivitou mitochondrií) by se buňky mohly jevit ve výsledcích MTT testu jako mrtvé, zato cytometr by je označil jako živé.



Obrázek č. 31: Graf závislosti viability na koncentraci vzorků pro zdravé buňky. Čísla udávají hodnoty viability pro jednotlivé koncentrace a černé úsečky symbolizují průměrné směrodatné odchylky

Biokompatibilitu SPIO lze odvodit i z obrázku č. 31, kde kromě nejvyšší koncentrace (700 µg/ml) viabilita neklesá pod 81 %. U nejvyšší koncentrace hodnota viability padá až k 67 %. Z toho lze odvodit, že při dalším, byť malém, zvýšení koncentrace by se viabilita dostala k hodnotě LD50 (umírá 50 % buněk) a i biokompatibilní SPIO by se staly toxickými. Stejně jako u nádorových buněk viability SPIO-Lf jsou nižší a klesají až k 68 %. Zdaleka nejvyšší hodnoty jsou opět u laktoferinu pravděpodobně ze stejného důvodu zmíněného u nádorových buněk.

Z celého in vitro testování lze shrnout, že byl připraven biokompatibilní komplex složený z magnetitu s navázaným laktoferinem, který sice nevykazuje při daných koncentracích antikarcinogenní účinky, ale lze jej použít jako kontrastní látku pro MRI, která díky navázanému laktoferinu na povrchu bude mít afinitu k nádorovým a zánětlivým buňkám. Z hodnoty DLS lze usoudit, že systém má vhodnou velikost pro in vivo testování, jediné, co by se pro případné potenciální využití v in vivo podmínkách muselo optimalizovat je hodnota zeta potenciálu (-10 mV). Pro stabilní systém, který nesmí aglomerovat v různých médiích je nutná hodnota více záporná (-30mV a níže).

ZÁVĚR

V této diplomové práci byla provedena příprava konjugovaných nanočástic složených z komerčních superparamagnetických nanočástic oxidů železa, konkrétně magnetitu, na jehož povrch byla kovalentní vazbou přes karboxylové skupiny navázána biologicky aktivní látka laktoferin. Tento protein, obsažený především v mateřském mléce, je znám pro své žádoucí protizánětlivé a antikarcinogenní účinky a v dnešní době se objevuje na trhu ve formě doplňků stravy. Navázání proteinu proběhlo s vysokou úspěšností (66–96 %), což bylo potvrzeno Bradfordovou metodou a systém SPIO-Lf si zachoval podobnou velikost i zeta potenciál jako samotné nanočástice.

V druhé fázi experimentů byl komplex SPIO-Lf podroben *in vitro* testování a výsledky byly srovnány se samotnými SPIO a samotným laktoferinem. Z obou metod pro studium viability (MTT, cytometr s propidium jodidem a kalceinem) byla potvrzena vysoká biokompatibilita systému, kdy až do koncentrace 500 µg/ml byla viabilita zdravých i nádorových buněk více než 80%. Bylo provedeno také měření ROS, kde pravděpodobně docházelo ke stínění fluorescence sondy, a tudíž mohly být výsledky zkreslené. Nicméně u žádné koncentrace nedošlo k nárůstu ROS hodnot ve srovnání s kontrolními buňkami, a tudíž i z tohoto měření vyplývá biokompatibilita připraveného systému.

Vzhledem k aktuálním trendům moderní diagnostiky by tento systém SPIO-Lf mohl být uplatněn jako kontrastní látka s afinitou k nádorovým či zánětlivým buňkám, tedy cílenému označení těchto buněk a diagnostiky pomocí magnetické rezonance.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- **MRI** - zobrazování magnetickou rezonancí
- **ECHA** - Evropská agentura pro chemické látky
- **SPION (SPIO)** - superparamagnetické nanočástice oxidů železa
- **ROS** - volné kyslíkové radikály
- **USPIO** - ultramalé superparamagnetické nanočástice oxidů železa
- **VSPIO** - velmi malé superparamagnetické nanočástice oxidů železa
- **RES** - retikuloendotelový systém
- **MDA** - malondialdehyd
- **TBARS** - reaktivní sloučeniny kyseliny thiobarbiturové
- **PEG** - polyethylenglykol
- **SEI** - interfáze pevných elektrolytů
- **Dox** - Doxorubicin
- **DNA/RNA** - deoxyribonukleová/ribonukleová kyselina
- **PBCA** - poly(alkyl-kyanoakrylát)
- **CPC** - kostní cement na bázi fosforečnanu vápenatého
- **CDK** - cyklin dependentní kinázy
- **Lf** - laktoferin
- **bLf** - bovinní laktoferin
- **hLf** - lidský laktoferin
- **SPIO-Lf** - komplex superparamagnetických nanočástic s navázaným laktoferinem
- **HEK 293** - buněčná linie zdravých lidských embryonálních renálních buněk
- **HL-7702** - buněčná linie zdravých lidských hepatocytů
- **ECV 304** - buněčná linie lidských endoteliálních buněk pupečnickové žíly
- **MTT** - 3-[4,5-dimethylthiazol2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid

- **fluidMAG-CMX** – označení výrobce pro nanočástice magnetitu obalené karboxymethyl-dextranem
- **TEM** – transmisní elektronová mikroskopie
- **DLS** – dynamický rozptyl světla
- **PDI** – stupeň polydisperzity
- **CDI** – karbodiimid
- **EDC** – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid
- **CBB** – barvivo Coomassie-Brilliant-Blue G-250
- **HeLa** – buněčná linie nádorových lidských epiteliální buněk z nádoru děložního hrdla
- **NIH 3T3** – buněčná linie zdravých fibroblastů z myších embryí NIH Swiss kultivována tzv. 3T3 protokolem
- **PBS** – fosfátový pufr s 0,15 M NaCl – pufovaný fyziologický roztok
- **CM-H2DCFDA** – fluorescenční barvivo $C_{27}H_{19}Cl_3O_8$
- **FSC** – detektor cytometru umístěný v ose dopadajícího laserového svazku
- **SSC** – detektor cytometru umístěný pod úhlem 90° od osy dopadajícího svazku
- **PI** – propidium jodid
- **ddH₂O** – ultračistá voda
- **DMSO** – dimethylsulfoxid
- **LD50** – koncentrace látky, při které umírá 50 % buněk (studovaných organismů)

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Nanomateriály – ECHA. Homepage – ECHA [online]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/regulations/nanomaterials>
- [2] DOHNALOVÁ Lucie, DOHNAL Vlastimil. *Nanočástice a jejich toxicita*. Chemické listy 109, 444-450, 2015.
- [3] TUČEK Jiří. Habilitační práce: *Nanometrické polymorfy oxidu železitého, jejich magnetické vlastnosti a aplikační potenciál*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2012.
- [4] CABÁKOVÁ Silvie. Diplomová práce: *Nestechiometrie nanočástic γ -Fe₂O₃ a Fe₃O₄ a její projev v jejich magnetických vlastnostech*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2012.
- [5] LINDSAY S.M. *Introduction to nanoscience*. New York, N.Y.: Oxford University Press, 2010, xii, 457 s., [4] s. obr. příl. ISBN 978-0-19-954421-9.
- [6] ANSARI Mohd Owais, Md. Fahim AHMAD, G.G.H.A. SHADAB a Hifzur R. SIDDIQUE. *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles based cancer theranostics: A double edge sword to fight against cancer*. Journal of Drug Delivery Science and Technology [online]. 2018, **45**, 177-183 [cit. 2019-05-17]. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.03.017. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S177322471830087X>
- [7] NUNES Antonio, Khuloud T. AL-JAMAL a Kostas KOSTARELOS. *Review: Therapeutics, imaging and toxicity of nanomaterials in the central nervous system*. Journal of Controlled Release [online]. 2012, **161**(2), 290-306 [cit. 2018-07-30]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.03.026. ISSN 01683659.
- [8] WALTERS Chavon, Edmund POOL a Vernon SOMERSET. *Nanotoxicology: A Review*. SOLONESKI, Sonia a Marcelo LARRAMENDY, ed. *Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum* [online]. InTech, 2016, 2016-10-26 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.5772/64754. ISBN 978-953-51-2716-1. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/toxicology-new-aspects-to-this-scientific-conundrum/nanotoxicology-a-review>
- [9] LANKVELD D.P.K., A.G. OOMEN, P. KRYSTEK, et al. *The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes*. Biomaterials [online]. 2010, **31**(32), 8350-8361 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.045. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961210008884>.

- [10] SCOWN Tessa M., Eduarda M. SANTOS, Blair D. JOHNSTON, et al. *Effects of Aqueous Exposure to Silver Nanoparticles of Different Sizes in Rainbow Trout*. *Toxicological Sciences* [online]. 2010, **115**(2), 521-534 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1093/toxsci/kfq076. ISSN 1096-6080. Dostupné z: <https://academic.oup.com/toxsci/article/1735838/Effects>
- [11] GAISER Birgit K., Teresa F. FERNANDES, Mark JEPSON, Jamie R. LEAD, Charles R. TYLER a Vicki STONE. *Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments*. *Environmental Health* [online]. 2009, **8**(Suppl 1) [cit. 2018-10-03]. DOI: 10.1186/1476-069X-8-S1-S2. ISSN 1476-069X. Dostupné z: <http://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-069X-8-S1-S2>
- [12] MORONES Jose Ruben, Jose Luis ELECHIGUERRA, Alejandra CAMACHO, Katherine HOLT, Juan B KOURI, Jose Tapia RAMÍREZ a Miguel Jose YACAMAN. *The bactericidal effect of silver nanoparticles*. *Nanotechnology* [online]. 2005, **16**(10), 2346-2353 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1088/0957-4484/16/10/059. ISSN 0957-4484. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0957-4484/16/i=10/a=059?key=crossref.e77be5b8bed6ecad694ec81776ef56fe>
- [13] PAL S., Y. K. TAK a J. M. SONG. *Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2007, **73**(6), 1712-1720 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1128/AEM.02218-06. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02218-06>
- [14] RÖMER Isabella, Thomas A. WHITE, Mohammed BAALOUSHA, Kevin CHIPMAN, Mark R. VIANT a Jamie R. LEAD. *Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests*. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, **1218**(27), 4226-4233 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.03.034. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311003827>
- [15] WALTERS Chavon, Edmund POOL a Vernon SOMERSET. *Aggregation and dissolution of silver nanoparticles in a laboratory-based freshwater microcosm under simulated environmental conditions*. *Toxicological & Environmental Chemistry* [online]. 2014, **95**(10), 1690-1701 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1080/02772248.2014.904141. ISSN 0277-2248. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02772248.2014.904141>

- [16] WALTERS Chavon R., Paul CHENG, Edmund POOL a Vernon SOMERSET. *Effect of temperature on oxidative stress parameters and enzyme activity in tissues of Cape River crab (Potamonautes perlatius) following exposure to silver nanoparticles (AgNP)*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A [online]. 2016, **79**(2), 61-70 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1080/15287394.2015.1106357. ISSN 1528-7394. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15287394.2015.1106357>
- [17] ZHANG Wen, Ying YAO, Kungang LI, Ying HUANG a Yongsheng CHEN. *Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles*. Environmental Pollution [online]. 2011, **159**(12), 3757-3762 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.envpol.2011.07.013. ISSN 02697491. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749111003836>
- [18] LIU Jingyu a Robert H. HURT. *Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids*. Environmental Science & Technology [online]. 2010, **44**(6), 2169-2175 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1021/es9035557. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es9035557>
- [19] POWERS Kevin W., Scott C. BROWN, Vijay B. KRISHNA, Scott C. WASDO, Brij M. MOUDGIL a Stephen M. ROBERTS. *Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation*. Toxicological Sciences [online]. 2006, **90**(2), 296-303 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1093/toxsci/kfj099. ISSN 1096-6080. Dostupné z: <http://academic.oup.com/toxsci/article/90/2/296/1658528/Research-Strategies-for-Safety-Evaluation-of>
- [20] BAALOUSHA Mohammed. *Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter*. Science of The Total Environment [online]. 2009, **407**(6), 2093-2101 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.022. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969708011352>
- [21] EL BADAWY Amro M., Rendahandi G. SILVA, Brian MORRIS, Kirk G. SCHECKEL, Makram T. SUIDAN a Thabet M. TOLAYMAT. *Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles*. Environmental Science & Technology [online]. 2011, **45**(1), 283-287 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1021/es1034188. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es1034188>
- [22] HOLEČEK Václav. *Oxidační stres u nádorových onemocnění*. Klinická biochemie a metabolismus. 2010, **18**(39), 225-230.

- [23] KRAMER Philip A., Jicheng DUAN, Wei-Jun QIAN a David J. MARCINEK. *The Measurement of Reversible Redox Dependent Post-translational Modifications and Their Regulation of Mitochondrial and Skeletal Muscle Function*. *Frontiers in Physiology* [online]. 2015, 6 [cit. 2018-11-03]. DOI: 10.3389/fphys.2015.00347. ISSN 1664-042X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2015.00347/abstract>
- [24] STADTMAN Earl R. a Barbara S. BERLETT. *Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease*. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 1997, 10(5), 485-494 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1021/tx960133r. ISSN 0893-228X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx960133r>
- [25] BUTTERFIELD D. *Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins*. *Mechanisms of Ageing and Development* [online]. 122(9), 945-962 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/S0047-6374(01)00249-4. ISSN 00476374. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637401002494>
- [26] EVANS Mark D., Miral DIZDAROGLU a Marcus S. COOKE. *Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2004, 567(1), 1-61 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.mrrev.2003.11.001. ISSN 13835742. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138357420300139X>
- [27] SHI Honglian, Laurie G. HUDSON a Ke Jian LIU. *Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis*. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2004, 37(5), 582-593 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.012. ISSN 08915849. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584904002734>
- [28] XIA Qingsu, Hsiu-Mei CHIANG, Yu-Ting ZHOU, Jun-Jie YIN, Fang LIU, Cheng WANG, Lei GUO a Peter P. FU. *Phototoxicity of Kava – Formation of Reactive Oxygen Species Leading to Lipid Peroxidation and DNA Damage*. *The American Journal of Chinese Medicine* [online]. 2012, 40(06), 1271-1288 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1142/S0192415X12500942. ISSN 0192-415X. Dostupné z: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0192415X12500942>
- [29] FEDERICI G., B. SHAW a R. HANDY. *Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects*. *Aquatic Toxicology* [online]. 2007, 84(4), 415-430 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.07.009. ISSN 0166445X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X0700272X>

- [30] KOPŘIVA Vladimír, Martin HOSTOVSKÝ, Tomáš NEKVAPIL, Vladimír BOUDNÝ a Ladislav MALOTA. *Vybrané instrumentální metody v biochemických cvičeních – inovované úlohy*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012, 47 s., ISBN 978-80-7305-627-8.
- [31] WANG Huanhua, Robert L. WICK a Baoshan XING. *Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode Caenorhabditis elegans*. Environmental Pollution [online]. 2009, **157**(4), 1171-1177 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.envpol.2008.11.004. ISSN 02697491. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749108005903>
- [32] LANDSIEDEL Robert, Maike Diana KAPP, Markus SCHULZ, Karin WIENCH a Franz OESCH. *Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations – Many questions, some answers*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research [online]. 2009, **681**(2-3), 241-258 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.10.002. ISSN 13835742. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574208001397>
- [33] OBERHOLSTER P.J., N. MUSEE, A.-M. BOTHERA, P.K. CHELULE, W.W. FOCKE a P.J. ASHTON. *Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate Chironomus tentans larvae*. Ecotoxicology and Environmental Safety [online]. 2011, **74**(3), 416-423 [cit. 2018-11-01]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.12.012. ISSN 01476513. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651310003957>
- [34] GURR Jia-Ran, Alexander S.S. WANG, Chien-Hung CHEN a Kun-Yan JAN. *Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells*. Toxicology [online]. 2005, **213**(1-2), 66-73 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.tox.2005.05.007. ISSN 0300483X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X05002271>
- [35] Ordzhonikidze C. G., Ramaiyya L. K., Egorova E. M. a Rubanovich A. V. (2009). *Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo*. Acta naturae, **1**(3), 99-101.
- [36] KIM Yong Soon, Jin Sik KIM, Hyun Sun CHO, et al. *Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats*. Inhalation Toxicology [online]. 2008, **20**(6), 575-583 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1080/08958370701874663. ISSN 0895-8378. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08958370701874663>

- [37] HAN Dong-Wook, Seong Cheol HONG, Jong Ho LEE, et al. *Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups*. International Journal of Nanomedicine [online]. [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.2147/IJN.S26355. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/subtle-cytotoxicity-and-genotoxicity-differences-in-superparamagnetic-peer-reviewed-article-IJN>
- [38] LIU Yanping, Qiyue XIA, Ying LIU, et al. *Genotoxicity assessment of magnetic iron oxide nanoparticles with different particle sizes and surface coatings*. Nanotechnology [online]. 2014, **25**(42) [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1088/0957-4484/25/42/425101. ISSN 0957-4484. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0957-4484/25/i=42/a=425101?key=crossref.6a472979ad9dda5f80a38bdaae277262>
- [39] TIBBALS Harry F. *Medical nanotechnology and nanomedicine*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011. Perspectives in nanotechnology. ISBN 9781439808740.
- [40] RAJCOVÁ Andrea. Bakalářská práce: *Imobilizácia biologicky aktívnej látky na povrch superparamagnetických nanočastíc oxidov železa*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2016.
- [41] SALEH A., C. JONKMANN, U. MÖDDER, M. SCHROETER, H.-P. HARTUNG a S. JANDER. *In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke*. Brain [online]. 2004, **127**(7), 1670–1677, [cit. 2018-07-30]. DOI: 10.1093/brain/awh191. ISSN 00068950.
- [42] COUVREUR P., B. KANTE, L. GRISLAIN, M. ROLAND a P. SPEISER. *Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles*. Journal of Pharmaceutical Sciences [online]. 1982, **71**(7), 790–792 [cit. 2018-07-30]. DOI: 10.1002/jps.2600710717. ISSN 15206017.
- [43] GULYAEV A. E., I. N. SKIDAN, A. S. ANTROPOV, S. E. GELPERINA, G. Ya. KIVMAN a J. KREUTER. *Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles*. Pharmaceutical Research [online]. 1999, **16**(10), 1564–1569 [cit. 2018-07-30]. DOI: 10.1023/A:1018983904537. ISSN 07248741.
- [44] STEINIGER S. C. J., J. KREUTER, A. S. KHALANSKY, et al. *Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles*. International Journal of Cancer [online]. 2004, **109**(5), 759–767 [cit. 2018-07-30]. DOI: 10.1002/ijc.20048. ISSN 00207136.

- [45] BURKE A., D. CARROLL, Frank TORTI a S. V. TORTI. *Bifunctional nanomaterials for the imaging and treatment of cancer*. Oxford Handbook of Nanoscience and Technology [online]. Oxford University Press, 11. 2. 2010, (Volume 3: Applications) [cit. 2019-05-27]. DOI: 10.1093/oxfordhb/9780199533060.013.13. Dostupné z: <https://www.oxfordhandbooks.com/view/10.1093/oxfordhb/9780199533060.001.0001/oxfordhb-9780199533060-e-13>
- [46] ORTEGA Daniel a Quentin A. PANKHURST. *Magnetic hyperthermia*. O'BRIEN, Paul, ed. Nanoscience [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012, s. 60-88 [cit. 2019-05-27]. Nanoscience. DOI: 10.1039/9781849734844-00060. ISBN 978-1-84973-435-6. Dostupné z: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781849734844-00060>
- [47] MATSUMINE Akihiko, Kenji TAKEGAMI, Kunihiro ASANUMA, Takao MATSUBARA, Tomoki NAKAMURA, Atsumasa UCHIDA a Akihiro SUDO. *A novel hyperthermia treatment for bone metastases using magnetic materials*. International Journal of Clinical Oncology [online]. 2011, **16**(2), 101-108 [cit. 2019-05-28]. DOI: 10.1007/s10147-011-0217-3. ISSN 1341-9625. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10147-011-0217-3>
- [48] MAIER-HAUFF Klaus, Frank ULRICH, Dirk NESTLER, et al. *Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme*. Journal of Neuro-Oncology [online]. 2011, **103**(2), 317-324 [cit. 2019-05-28]. DOI: 10.1007/s11060-010-0389-0. ISSN 0167-594X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11060-010-0389-0>
- [49] PECORINO, Lauren. *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2008. ISBN 978-0-19-921148-7.
- [50] SNUSTAD D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ Jiřina, ed. *Genetika*. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [51] ALBERTS Bruce. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, 2008. ISBN 978-0-8153-4105-5.
- [52] POLÁČKOVÁ Marie. *Bakalářská práce: Bílkoviny v mléce*. Brno: Mendelova univerzita, 2013.
- [53] MADUREIRA A. R., PEREIRA C. I., GOMES A. M. P., PINTADO M. E., MALCATA F. X. *Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties*. Food Research International. 2007, (40), 1197-1211.

- [54] TOMITA M., et al. *Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications*. Biochimie. 2009, (91), 52-57
- [55] STEIJNS J. M., VAN HOOIJDONK A. C. M. *Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin*. British Journal of Nutrition. 2000, (84), 11-17.
- [56] LEVAY P. F., VILJOEN M. *Lactoferrin: A general review*. Haematologica. 1995, (80), 252-267.
- [57] GONZALEZ-CHAVEZ S. A., AREVALO-GALLEGOS S., RASCONCRUZ Q. *Lactoferrin: structure, function and applications*. International Journal of Antimicrobial Agents. 2009, (33), 301.e1-301.e8.
- [58] MOASTAFA T. M., et al. *Study on the Therapeutic Benefit on Lactoferrin in Patients with Colorectal Cancer Receiving Chemotherapy*. ISRN Otolaryngology. 1-10, Jan. 2014. ISSN: 20905742.
- [59] BEZAULT J., et al. *Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice*. Cancer Research. 1994, (54), 2310-2312.
- [60] SEKINE K., et al. *Inhibition of azoxymethane-initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats*. Jpn. J. Cancer Res. 1997 (88), 523-526.
- [61] XIE H., et al. *Lactoferrin-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a specific MRI contrast agent for detection of brain glioma in vivo*. Biomaterials. 2011, (32), 495-502.
- [62] SOUBUSTA Jan. *Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací: Optoelektronické systémy*. Olomouc: Univerzita Palackého.
- [63] *Dynamický rozptyl světla: Malvern Zetasizer Nano ZS*. Krystalografická společnost: Oddělení strukturní analýzy, katedra fyziky kondenzovaných látek MFF UK [online]. [cit. 2019-05-23]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [64] KVÍTEK Libor. *Metody studia koloidních soustav*. Katedra fyzikální chemie PřF. Univerzita Palackého Olomouc, 2006.
- [65] *Zeta potenciál: Malvern Zetasizer Nano ZS*. Krystalografická společnost: Oddělení strukturní analýzy, katedra fyziky kondenzovaných látek MFF UK [online]. [cit. 2019-05-23]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [66] PEČOVÁ Michaela. *Disertační práce: Imobilizace proteinů na magnetické nanočástice a jejich praktické použití*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2013.

- [67] KING Robert C., William D. STANSFIELD a Pamela Khipple MULLIGAN. *A dictionary of genetics*. 7th ed. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN 978-0-19-530762-7.
- [68] NIH 3T3 Cell Line: mouse embryonic fibroblasts. NIH3T3 Cell Line Transfection, Expression and Culture [online]. [cit. 2019-05-23]. Dostupné z: <http://www.nih3t3.com>
- [69] SVATÁKOVÁ Markéta. Diplomová práce: *In vitro studie mezenchymálních kmenových buněk značených magnetickými nanočásticemi*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2012.
- [70] KOLÁŘOVÁ Mary. Diplomová práce: *Optimalizace značení kmenových a fibroblastických buněk superparamagnetickými nanočásticemi oxidů železa*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2013.
- [71] MALINA Tomáš. Bakalářská práce: *Cytotoxicita nanomateriálů*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2015.
- [72] CM-H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator): Reactive Oxygen & Nitrogen Species. Thermo Fisher Scientific [online]. [cit. 2019-05-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C6827>
- [73] BERNAND Vladan. *Průtoková cytometrie: flow-cytometrie* [online]. Brno: Biofyzikální ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Dostupné z http://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova_cytometrie_prezentace.pdf
- [74] KOVÁRNÍKOVÁ Markéta. Bakalářská práce: *Detekce živých a mrtvých buněk*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012.

PŘÍLOHA

chemicell GmbH

Eresburgstrasse 22-23
12103 Berlin
Germany

info@chemicell.com
chemicell.com

Product Information – fluidMAG-CMX

Product name:	fluidMAG-CMX
Article number:	4106-1 (1 ml); 4106-5 (5 ml)
Product description:	Aqueous dispersion of magnetic nanoparticles
Application:	Weak cation exchanger; for covalent coupling of biomolecules; see protocol A11
Hydrodynamic diameter:	200 nm
Mass concentration:	25 mg/ml
Volume:	1 ml
Production date:	March 2019
Batch number:	2019-03-22
Expiry date:	18 months after production date
Core composition:	Magnetite (Fe ₃ O ₄ , black color) - May oxidize to maghemite (Fe ₂ O ₃ , brown color) over time due to atmospheric oxygen.
Matrix composition:	Carboxymethyl-dextran, sodium
Number of particles:	~ 2.2 x 10 ¹⁴ /g particles
Particle density:	~ 1.25 g/cm ³
Type of magnetization:	Superparamagnetic
Functional group:	Sodium carboxylate, -COO ⁻ Na ⁺
Autoclaved:	Yes
Suspension medium:	ddH ₂ O
Storage:	2 – 8 °C. Do not freeze!
Note:	For complete resuspension vortex thoroughly several minutes! Keep and use under sterile conditions.

