

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Anorganická chemie



Bc. Soňa Kikerlová

Multimodální T_2 kontrastní látky na bázi fluorescenčně značených magnetických jader spinelového typu pro zobrazování magnetickou rezonancí

Magnetic resonance imaging with multimodal T_2 contrast agents based on fluorescence-labelled magnetic cores with the spinel structure

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Mgr. Ondřej Kaman, Ph.D.

Konzultant práce: Doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.,

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 26. 8. 2018

Bc. Soňa Kikerlová

Abstrakt

Předmětem této diplomové práce byla příprava magnetických fluorescenčně značených nanočástic spinelového typu, konkrétně zinkem dopovaného kobaltnatého feritu, pro zobrazování magnetickou rezonancí a fluorescenční mikroskopii v experimentální praxi. V dřívějších výzkumech vykazovaly různé feritové nanočástice poměrně vysoké transversální relaxační časy a výrazný negativní T_2 kontrast. Tyto vlastnosti byly předpokládány také u nanočástic kobaltnatého feritu dopovaného zinkem. Daný předpoklad byl následně ověřen studiem jejich magnetických a kontrastních vlastností. Dále byly s úspěchem studovány také jejich fluorescenční vlastnosti.

V návaznosti na biologické experimenty byla řešena problematika povrchové úpravy magnetických jader připravených nanočástic, problematika týkající se jejich stabilizace ve vodné fázi a v neposlední řadě také toxicita těchto nanočástic v živých systémech.

Klíčová slova: nanočástice, ferity, MRI, relaxace

Abstract

This diploma thesis was focused on the preparation of magnetic and fluorescently labelled spinel type nanoparticles, specifically nanoparticles of zinc-doped cobalt ferrite intended for application in magnetic resonance imaging and fluorescence microscopy in experimental practice. In previous studies, various ferrite nanoparticles exhibited relatively high transverse relaxation times and strong negative T_2 contrast. These properties were also supposed for the zinc-doped cobalt ferrite nanoparticles. This assumption was confirmed by studying their magnetic and contrasting properties. Fluorescence properties of the prepared nanoparticles were also successfully studied. With respect to the intended applications of these particles, the issue of suitable surface modification of magnetic cores, their colloidal stabilization in an aqueous suspension and toxicity in biological systems were studied.

Key words: nanoparticles, ferrites, MRI, relaxation

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH VELIČIN A ZKRATEK	8
1. OBECNÝ ÚVOD	12
1.1. Spinely	12
1.1.1. Spinelová struktura	13
1.2. Ferity čili magnetické spinely	14
1.3. Příprava spinelových feritů	15
1.3.1. Termální dekompozice	15
1.3.2. Koprecipitace	16
1.3.3. Metoda sol-gel	16
1.3.4. Metoda reverzní mikroemulze	17
1.3.5. Mikrovlnné spalování	17
1.4. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)	18
1.5. Kontrastní látky	20
1.5.1. Povrchová úprava kontrastních látek na bázi oxidů železa	21
1.5.2. Využití fluoroforů v zobrazovacích metodách	24
2. MOTIVACE A CÍL PRÁCE	26
3. MATERIÁL	27
3.1. Chemikálie	27
3.2. Suspenze nanočástic použité v biologických experimentech	27
3.3. Buněčné kultury	28
3.4. Kultivační média	28
3.5. Pufry	29
4. CHARAKTERIZAČNÍ METODY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	30
4.1. Centrifugace	30

4.2. Dynamický rozptyl světla (DLS)	30
4.3. Fluorescenční mikroskopie	31
4.4. Fluorescenční spektroskopie	31
4.5. Chemická analýza	32
4.6. Magnetometrie	32
4.7. Měření relaxivit	32
4.8. Průtoková cytometrie (FACS)	33
4.9. Rentgenová prášková difrakce	33
4.10. Rentgenová fluorescenční spektroskopie (XRF)	34
4.11. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	34
4.12. Ultrazvuková sonikace	36
4.13. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)	37
5. SYNTETICKÁ ČÁST	38
5.1. Příprava magnetických jader metodou koprecipitace	39
5.2. Příprava magnetických jader metodou termální dekompozice	40
5.3. Ligandová výměna	42
5.4. Příprava fluorescenčně značených nanočástic	44
5.4.1. Hydrofobizace skleněných reakčních nádob	45
5.4.2. Příprava Rho-P	46
5.4.3. Alkylace Rho-P (příprava Si@Rho-P)	48
5.4.4. Konjugace FITC s APS (příprava FITC@APS)	49
5.4.5. Enkapsulace velkých jader do siliky s konjugáty Si@Rho-P a FITC@APS	49
5.4.6. Enkapsulace malých jader do siliky s konjugátem Si@Rho-P	51
6. BIOLOGICKÉ EXPERIMENTY	53
6.1. Testy viability	53
6.2. Fluorescenční mikroskopie	56

6.3. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)	57
7. VÝSLEDKY A DISKUZE	60
7.1. Příprava feritových jader a jejich základní vlastnosti	60
7.2. Stabilizace feritových nanočástic ve vodné suspenzi	63
7.3. Feritové nanočástice obalené fluorescentně značenou silikou	66
7.4. Testy viability	68
7.5. Magnetické vlastnosti	74
7.6. Relaxivita, MRI vlastnosti	77
7.7. Fluorescenční vlastnosti	82
7.8. Lokalizace nanočástic uvnitř buněk	88
8. ZÁVĚR	92
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	93
PODĚKOVÁNÍ	100

SEZNAM POUŽITÝCH VELIČIN A ZKRATEK

β	korekční parametr závislý na koherenci a uspořádání laserového paprsku
\vec{B}, \vec{B}_0	vektor magnetické indukce statického magnetického pole
\vec{B}_1	vektor magnetické indukce rotačního magnetického pole
D	difúzní koeficient vody
$d_{(XRD)}$	střední velikost krystalitů určená z rozšíření difrakčních linií
$g_1(t)$	autokorelační funkce elektrického pole
$g_2(t)$	autokorelační funkce intenzity rozptýleného světla
I	jaderný spin
\vec{M}	výsledný vektor magnetizace
r_2	transverzální relaxivita
$r_{(DLS)}$	hydrodynamický poloměr určený metodou DLS
t	teplota v Celsiově stupnici
T	absolutní teplota
μ	magnetický moment
$\vec{m}, \vec{\mu}_0$	vektor magnetického momentu
APS	3-aminopropyltriethoxysilan
CAs	kontrastní látky (<i>Contrast Agents</i>)
Co(acac) ₂	acetylacetonát kobaltnatý
Co-Zn ferit	zinkem dopovaný kobaltnatý ferit, tedy oxidová fáze o složení Co _{1-x} Zn _x Fe ₂ O ₄ , v širším smyslu pak fáze obecného složení Co _y Zn _z Fe _{3-y-z} O ₄
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DLS	dynamický rozptyl světla (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMEM	typ média pro kultivaci adherentních buněk (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMF	dimethylformamid
DMSA	<i>meso</i> -2,3-dimerkaptojantarová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
DPA	dopamin

ELISA	imunoanalytická metoda využívající enzymy (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EtOH	ethanol
\vec{F}_m	vektor magnetické síly
FACS	průtokový cytometr (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
FBS	fetální bovinní sérum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
Fe(acac) ₃	acetylacetonát železitý
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FITC@APS	konjugát fluoresceinu s APS
FZÚ AV ČR	Fyzikální ústav akademie věd České republiky
Gd-BOPTA	gadobenová kyselina
Gd-DOTA	komplex Gd ³⁺ s tetraazacyklododekan-tetraoctovou kyselinou
Gd-DTPA	komplex Gd ³⁺ s dithyentriamin-pentaoctovou kyselinou
H	Intenzita magnetického pole
HBSS	pufr buněčných kultivačních médií, pH 7,4 (<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>)
HDD	hexadekan-1,2-diol
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1yl]ethansulfonová kyselina
ICSD	databáze anorganických krystalových struktur (<i>Inorganic Crystal Structure Database</i>)
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
JPTMS	(3-jodopropyl)trimethoxysilan
K	kontrola
LSMO	perovskitová fáze o složení La _{1-x} Sr _x MnO ₃ (viz produkt MK-187-24)
MAR	režim transverzální relaxace (<i>Motional Averaging Regime</i>)
MČ	„malé červené“ nanočástice (viz produkt TCZF 140.21)
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
Mn-DPDP	dipyridoxyl-difosfát manganatý
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
MTT	bromid 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolia

NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NK	negativní kontrola
NMR	jaderná magnetická rezonance (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PBS	fosfátový pufr s pH 7,4 (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PEG	polyethylenglykol
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Rho-B	rhodamin B
Rho-P	piperazinový derivát rhodaminu B
RPMI	typ média pro kultivaci suspenzních buněk (<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>)
RT	laboratorní teplota (<i>Room Temperature</i>)
S	supernatant
SAR	specifická míra absorpce (<i>Specific Absorption Rate</i>)
SDL	mez statického defázování (<i>Static Dephasing Limit</i>)
SG	sol-gel metoda (<i>Sol-Gel</i>)
SGC	spalovací sol-gel metoda (<i>Sol-Gel Combustion</i>)
Si@Rho-P	piperazinový derivát rhodaminu B alkylovaný pomocí JPTMS
SPIO	superparamagnetické částice oxidů železa (<i>SuperParamagnetic Iron Oxide</i>)
SQUID	supravodivé kvantové interferenční zařízení (<i>Superconducting Quantum Interference Device</i>)
T₁-CAs	pozitivní neboli T ₁ kontrastní látky (<i>T₁-Contrast Agents</i>)
T₂-CAs	negativní neboli T ₂ kontrastní látky (<i>T₂-Contrast Agents</i>)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEOS	tetraethoxysilan
TLC	tenkovrstvá chromatografie (<i>Thin-Layer Chromatography</i>)
USPIO	velmi malé superparamagnetické částice oxidů železa (<i>Ultrasmall SuperParamagnetic particles of Iron Oxide</i>)
UZ-lázeň	ultrazvuková lázeň
UZ-sonda	ultrazvuková sonda
VČ	„velké červené“ nanočástice (viz produkt CoZnFe 292.10)
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

VZ	„velké zelené“ nanočástice (viz produkt CoZnFe 292.14)
XRF	rentgenová fluorescenční spektroskopie (<i>X-ray Fluorescence</i>)
Zn(acac)₂	acetylacetonát zinečnatý

1. OBECNÝ ÚVOD

1.1. Spinely

Spinel ($\text{Mg}^{2+}\text{Al}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$) je minerál patřící do skupiny spinelidů, jehož název je s největší pravděpodobností odvozen od latinského slova *spina* (pl. *spine*), což znamená malý trn. Tento fakt nejspíš souvisí s častým výskytem ostrých hrotů, jež jsou typické pro některé spinelové krystaly. Od *spinelu* je odvozen název již výše zmíněné mineralogické skupiny - spinelidy (viz obr. 1).¹⁾

Minerály ze skupiny spinelidů lze rozdělit do tří tříd v závislosti na tom, který z trojmocných iontů (Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+}) obsahují ve své krystalové

strukturu. **Třída spinelu** zahrnuje minerály, jež ve své struktuře obsahují trojmocný kation hliníku Al^{3+} . Do této třídy patří například minerál *spinel* ($\text{Mg}^{2+}\text{Al}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$), *gahnit* ($\text{Zn}^{2+}\text{Al}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$), *hercynit* ($\text{Fe}^{2+}\text{Al}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$) nebo *galaksit* ($\text{Mn}^{2+}\text{Al}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$). **Třída magnetitu** je tvořena minerály, které jsou běžně součástí hornin a jejichž struktura obsahuje trojmocný kation železa Fe^{3+} . Do této třídy patří například minerál *magnesioferit* ($\text{Mg}^{2+}\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$), *fraklinit* ($\text{Zn}^{2+}\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$), *magnetit* ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$), *ulvöspinel* ($\text{Ti}^{4+}\text{Fe}_2^{2+}\text{O}_4^{2-}$) či *trevorit* ($\text{Ni}^{2+}\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$), ale i *maghemit* ($\gamma\text{-Fe}_2^{3+}\text{O}_3^{2-}$), který lze odvodit od struktury magnetitu formálním zavedením vakancí namísto Fe^{2+} v oktaedrických polohách. **Třída chromitu** zahrnuje minerály, jež ve své struktuře obsahují trojmocný kation chromu Cr^{3+} . Do této třídy patří například minerál *magnesiochromit* ($\text{Mg}^{2+}\text{Cr}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$) nebo *chromit* ($\text{Fe}^{2+}\text{Cr}_2^{3+}\text{O}_4^{2-}$).^[1]

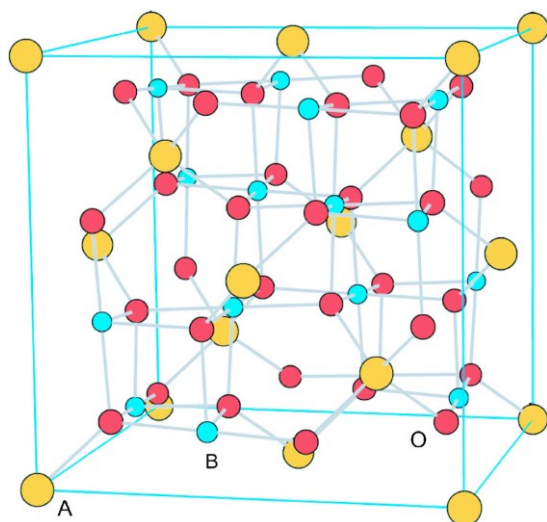
Kromě toho, že jsou minerály ze skupiny spinelidů poměrně hojně rozšířeny v přírodě, lze takové materiály relativně snadno vyrábět i synteticky. Prvním analogem minerálu získaným umělou cestou byl *spinel*, který byl vyroben metodou takzvané plamenové fúze již počátkem 20. století. Tento funkční postup pro komerční výrobu syntetických drahých kamenů zavedl francouzský chemik Auguste Victor Louis Verneuil (1856 - 1913), podle kterého je dnes tato metoda plamenové fúze známa jako takzvaná Verneuilho metoda.³⁾



Obr. 1: Minerál spinel z geologického regionu Aldanský štít v Jakutsku. Převzato z mineralogické databáze <http://www.mindat.org>.²⁾

1.1.1. Spinelová struktura

Oxidické spinely s takzvanou **normální spinelovou strukturou** představují nejenom jednu z významných mineralogických skupin, do které patří minerály obecného složení $(A^{2+})[B_2^{3+}]O_4^{2-}$, včetně výše zmiňovaného *spinelu* $(Mg^{2+})[Al_2^{3+}]O_4$, ale zahrnují i řadu čistě syntetických materiálů. Tyto látky krystalizují v krychlové krystalové soustavě, kde



Obr. 2: Struktura normálního spinelu $(A)[B_2]O_4$. Kationty A obsazují jednu osminu tetraedrických dutin a kationty B obsazují polovinu oktaedrických dutin kyslíkové podmřížky, jejíž základní buňka obsahuje 56 atomů (24 představují kationty a 32 kyslíkové anionty). Převzato z literatury.^[3]

atomy kyslíku zaujímají nejtěsnější krychlové uspořádání, zatímco dvojmocné kationty A^{2+} obsazují tetraedrické dutiny (značí se pomocí kulatých závorek) a trojmocné kationty B^{3+} obsazují dutiny oktaedrické (značí se pomocí hranatých závorek).^[2] Jako dvojmocné kationty vystupují typicky kationty hořečnaté, zinečnaté, manganaté a železnaté. Mezi trojmocnými kationty se nejčastěji uplatňují kationty hlinité, chromité a železité. Nicméně tyto fáze mohou být dále dopovány kationty různých přechodných či nepřechodných prvků.

Jako kationt A^{2+} a B^{3+} může vystupovat také tentýž kov lišící se nábojem, jako je tomu například v minerálu *jakobsitu*, jehož složení je možné zapsat pomocí vzorce $(Mn_{0,6}^{2+}, Fe_{0,3}^{2+}, Mg_{0,1}^{2+})(Fe_{0,75}^{3+}, Mn_{0,25}^{3+})_2O_4^{2-}$.^[4]

Naproti tomu spinely s takzvanou **inverzní spinelovou strukturou** $(B)[AB]O_4$ se od spinelů s normální spinelovou strukturou liší distribucí kationtů, kde všechny dvojmocné kationty A^{2+} a polovina trojmocných kationtů B^{3+} obsazuje oktaedrické dutiny, zatímco druhá polovina trojmocných kationtů B^{3+} obsazuje dutiny tetraedrické. Typickým spinelem s inverzní spinelovou strukturou je *magnetit* $(Fe^{3+})[Fe^{2+}Fe^{3+}]O_4$.^[4]

Mezi oběma strukturními typy existují možné přechody, kde je rozložení atomů ve spinelu popisováno pomocí vzorce $(A_{1-x}B_x)[A_xB_{2-x}]O_4$, kde x je stupeň inverze. Stupeň inverze nabývá hodnot 0 až 1, přičemž nula odpovídá struktuře dokonalého normálního spinelu a 1 odpovídá struktuře dokonalého inverzního spinelu; je-li stupeň

inverze x roven hodnotě dvou třetin, pak v rámci spinelové struktury dochází ke zcela náhodnému rozmístění jednotlivých kationtů.^[3]

Jednotlivé kationty A^{2+} a B^{3+} jsou do příslušných míst spinelové struktury rozmisťovány na základě stabilizační energie krystalového pole přítomných přechodných kovů. Některé ionty mají odlišné preference, co se týče obsazování oktaedrických míst v závislosti na počtu d -elektronů. Pokud kationty A^{2+} mají silnou preferenci pro oktaedrické polohy, pak je budou přednostně obsazovat, přitom bude polovina B^{3+} kationtů z těchto poloh přemístěna do poloh tetraedrických. Jestliže mají kationty B^{3+} nulovou nebo nízkou stabilizační energii oktaedrických poloh, pak budou přednostně obsazovat polohy tetraedrické.^[4]

1.2. Ferity čili magnetické spinely

Ferity v úzkém slova smyslu jsou oxidy se strukturou *spinelu*, jejichž složení lze definovat pomocí obecného vzorce $M^{2+}O^{2-} \cdot Fe_2^{3+}O_3^{2-}$ neboli $M^{2+}Fe_2^{3+}O_4^{2-}$, kde M^{2+} je dvojmocný kovový ion. Ve struktuře feritů je trojmocný kation hliníku Al^{3+} (přítomný v minerálu *spinelu*) nahrazen trojmocným kationtem železa Fe^{3+} , případně kationtem trojmocného železa v kombinaci s jiným trojmocným iontem. Podobně dvojmocný kation hořčíku Mg^{2+} (přítomný v minerálu *spinelu*) bývá ve struktuře feritů nahrazován jinými ionty, nejčastěji ionty Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} a Zn^{2+} nebo velmi často také jejich kombinacemi. Přítomnost iontů Fe^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} a Mn^{2+} hraje ve struktuře magnetických spinelů důležitou roli, neboť tyto ionty obsahují, nebo v určitém krystalovém poli mohou obsahovat nespárované elektrony, díky čemuž umožňují vznik magnetického uspořádání (ferrimagnetismus, antiferromagnetismus) a přispívají tak k magnetickému momentu dané podmříže. Dvojmocné kationty zinku a podobně dvojmocné kationty hořčíku se spárovanými elektrony jsou diamagnetické a mají silnou preferenci tetraedrických poloh. Proto jsou ve feritech s ferrimagnetickým uspořádáním oktaedrické a tetraedrické podmříže používány ke snížení magnetického momentu tetraedrické podmříže, díky čemuž se zvyšuje výsledný magnetický moment příslušného spinelu.

Ferity ve své struktuře obsahují atomy železa a kyslíku, ale existují i magnetické spinely jiných kovů, které ve své struktuře mají namísto atomů železa např. atomy

chromu či manganu. Chrom ani mangan jako kovy nemají ferromagnetické vlastnosti, avšak jejich oxidické fáze mohou být magnetické. Nicméně tento typ feritů není nijak zvlášť důležitý z hlediska komerční výroby.^[5]

V tomto směru jsou mnohem zajímavější ferity směsných oxidů železa s dalšími přechodnými kovy, které našly uplatnění v nejrůznějších odvětvích jako např. T_2 kontrastní látky pro zobrazování magnetickou rezonancí. Kromě nanočástic označovaných jako tzv. SPIO (*Superparamagnetic Iron Oxide*) a USPIO (*Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide*), jež jsou tvořeny oxidy železa na bázi $Fe_3O_4/\gamma-Fe_2O_3$, a které patří k tradičním kontrastním látkám pro MRI, byly pro tuto aplikaci navrženy kontrastní látky zejména na bázi feritů $CoFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$ a $NiFe_2O_4$.^[6] Další aplikace se týkají magneticky indukované hypertermie (zinkem dopovaný $MnFe_2O_4$)^[7] nebo fotokatalýzy ($CuFe_2O_4$)^[8].

1.3. Příprava spinelových feritů

Feritové nanočástice se spinelovou strukturou se nejčastěji připravují jednou z níže popsaných metod, a to buď termální dekompozicí, koprecipitací, sol-gel metodou, metodou reverzní mikroemulze nebo takzvaným mikrovlnným spalováním.

1.3.1. Termální dekompozice

Metoda termální dekompozice slouží k přípravě feritových nanočástic poměrně malých rozměrů; velikost jader se obvykle pohybuje do 15 nm. Výsledkem syntézy je suspenze nanočástic stabilizovaná v organické fázi.

Výchozími látkami pro přípravu nanočástic jsou koordinační látky s organickými ligandy (acetáty, acetylacetonáty, citráty, oxaláty apod.) jednotlivých kovů v příslušném stechiometrickém poměru. K solím se přidá alkohol s poměrně dlouhým alifatickým řetězcem, např. oktadekan-1-ol nebo hexadekan-1,2-diol. Do reakční směsi se dále přidá vysokovroucí organické rozpouštědlo (např. benzylether, dioktylether nebo oktadecen) a surfaktanty, jako je oleylamin a olejová kyselina. Reakční směs se nechá zahřívát v inertní atmosféře za poměrně vysokých teplot po dobu několika hodin. Teplotní program bývá často dvou- či třístupňový (oddělení nukleace a růstu krystalitů, event. i sušící krok) a cílové teploty dosahují často 300°C až 330°C. Takto připravené částice mají na povrchu navázané surfaktanty a tvoří vysoce stabilní suspenze v nepolárních

organických rozpouštědlech jako je např. petrolether. Produkt je proto nutné vysrážet například ethanolem a poté vyčistit mnohonásobným promýváním organickými rozpouštědly. Definované produkty pro další práci se nejčastěji připravují purifikací a rozptýlením v petroletheru či hexanu s přidavkem surfaktantů.^[9, 10]

1.3.2. Koprecipitace

Koprecipitací lze připravit nanočástice různých oxidů včetně oxidů spinelového typu, a to ve formě čistého práškového materiálu. Jádra připravená touto metodou jsou relativně velká a jsou tvořena krystality, jejichž velikost se obvykle pohybuje v rozmezí 20 nm až 40 nm.

V případě koprecipitace vznikají ferity konverzí solí kovů na hydroxidy, následnou transformací těchto hydroxidů na oxidy a jejich spojením do směsného oxidu. Výchozími látkami pro přípravu nanočástic jsou vodné roztoky solí (zpravidla dusičnanů či chloridů) příslušných kovů smíchané ve stechiometrickém poměru. Výsledný roztok je poté vysrážen přidavkem alkalického činidla. Získaná sraženina se typicky přefiltruje, promyje destilovanou vodou a ethanolem, následně se usuší při vyšších teplotách (60°C až 160°C) a důsledně zhomogenizuje. Materiál se poté nechá vyžít při teplotě 400°C až 800°C po dobu několika hodin.^[11, 12, 13, 14]

1.3.3. Metoda sol-gel

U tradiční sol-gel metody (SG, *sol-gel*) jsou výchozími látkami roztoky dusičnanů příslušných kovů v ethylenglykolu, jež jsou smíchány v přesně definovaných molárních poměrech. Výsledný roztok je poté míchán a pomalu zahušťován během postupného zahřívání, přičemž roztok přechází na gel. Vzniklý gel se posléze suší při teplotě okolo 90°C až 120°C většinou po dobu 12-24 hodin. Materiál je poté důsledně zhomogenizován a získaný prášek je žíhán obvykle při teplotách 400°C až 800°C po dobu několika hodin.^[14, 15]

Alternativou je takzvaná spalovací sol-gel metoda (SGC, *sol-gel combustion*), kde jsou výchozími látkami rovněž vodné roztoky dusičnanů příslušných kovů. Ty jsou smíchány s roztokem kyseliny citronové obvykle v molárním poměru $\text{NO}_3^- : \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-} : 1:1$. Kyselina citronová v tomto procesu slouží jako chelatační činidlo a v pozdější fázi syntézy jako palivo pro vlastní spalování. U výsledného roztoku je vhodně upraveno pH,

a to většinou neutralizací amoniakem na hodnoty blízké 7. Takto upravený roztok je poté za stálého míchání mírně zahříván, a to obvykle na teplotu kolem 80°C. Přitom dochází k odpaření přebytečného rozpouštědla a k vytvoření gelu. Vzniklý gel se poté suší při teplotě 100°C až 120°C a posléze se zahřívá na vyšší teploty, přičemž okolo 250°C až 300°C dochází k samovznícení. Organické složky gelu shoří a příslušný anorganický popel je tvořen velmi jemnými reaktivními částicemi, které ochotně reagují na cílový produkt. Po prohoření gelu následuje finální tepelné zpracování většinou při teplotách 400°C až 800°C, kdy vzniká finální jednofázový produkt.^[14, 16]

1.3.4. Metoda reverzní mikroemulze

Metoda reverzní mikroemulze slouží k přípravě feritových nanočástic velmi malých rozměrů (3 nm až 10 nm). Výsledkem syntézy je suspenze nanočástic stabilizovaná v organické fázi.

V typickém experimentu lze připravit výchozí reakční směs z xylenu, ke kterému se přidá 10mM dodecylbenzensulfonát. Sonikací směsi vznikne zakalená mikroemulze. Do takto připravené směsi se za intenzivního míchání přidá předem připravený vodný roztok dusičnanu železitého a vodný roztok solí (chloridu, síranu, dusičnanu apod.) dalšího kovového kationtu (Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} či Zn^{2+}) s přidavkem malého množství ethanolu. Po několika sekundách od přidání roztoků solí se emulze vyčeří (zmizí zákal). Takto připravená reakční směs se nechá míchat při pokojové teplotě po dobu několika hodin, což vede ke stabilizaci reverzního micelárního roztoku (fáze voda v oleji). Vznikne homogenní micelární roztok, který se nechá zahřívát při teplotě 90°C. K tomuto roztoku se poté přidá 5mM roztok hydrazinu, přičemž roztok okamžitě změní barvu na černou. Výsledný roztok je následně přiveden k varu (pod refluxem) a dále zahříván po dobu 5 hodin za vzniku nanočástic. Vzniklý produkt se vysráží ethanolem a odstředí. Nanočástice lze dispergovat a uchovávat v mnoha organických rozpouštědlech, jako je např. toluen nebo alkany.^[17]

1.3.5. Mikrovlnné spalování

Mikrovlnným spalováním lze ve velmi krátkém čase připravit oxidy spinelového typu ve formě porózního nanokrystalického materiálu. Jádra připravená touto metodou

jsou poměrně velká (60 nm až 70 nm), jsou složena z drobných krystalitů a mají relativně velký specifický povrch.

Výchozími látkami jsou vodné roztoky solí (nejčastěji dusičnanů) kovových iontů (Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} apod.) a roztok močoviny, který během reakce slouží jako palivo. Všechny předem připravené roztoky se převedou do tavicího kelímku. Kelímek se umístí do mikrovlnné trouby, kde se roztok zpočátku vaří, podléhá dehydrataci a následně dojde k jeho rozkladu za současného uvolnění velkého množství plynů. Po určité době roztok dosáhne bodu spontánního spalování, začne hořet a dojde k uvolnění velkého množství tepla (k hoření dochází při teplotě okolo 1000°C). Celý proces spalování v mikrovlnné troubě trvá pouhých 15 minut. Výsledkem syntézy je porózní práškový materiál.^[18]

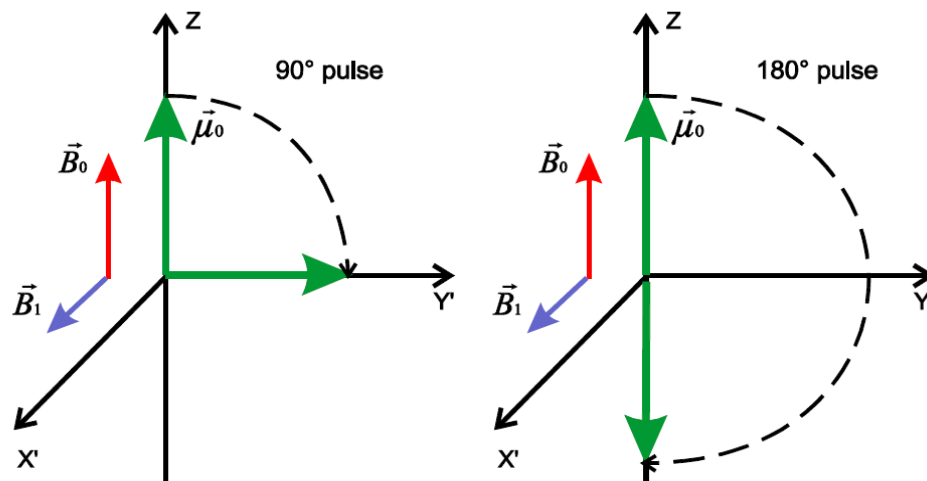
1.4. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)

Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI, *magnetic resonance imaging*) dnes patří mezi hojně používanou neinvazivní diagnostickou techniku dvojrozměrného nebo trojrozměrného zobrazování měkkých tkání. MRI našlo uplatnění nejen v různých klinických odvětvích, jako je detekce nádorů, funkční zobrazování mozku, angiografie apod., ale je s úspěchem používáno také v biomedicinském výzkumu či potravinářském průmyslu.

Podstata metody vychází z principu jaderné magnetické rezonance (NMR), která byla objevena v první polovině 20. století pozdějšími laureáty Nobelovy ceny Felixem Blochem a Edwardem Millsem Purcellem. Vlastní zobrazování magnetickou rezonancí se začalo vyvíjet od počátku sedmdesátých let 20. století spolu s rozvojem v oblasti technologií a informatiky. O největší pokrok v rozvoji této metody se zasloužil Paul Lauterbur společně s Peterem Mansfieldem, kterým byla v roce 2003 udělena Nobelova cena za medicínu.^[19]

Princip nukleární magnetické rezonance je založen na detekci signálů jader atomů, která mají nenulovou hodnotu jaderného spinu I a tedy i nenulovou hodnotu magnetického momentu μ . Díky tomu, že je lidské tělo z větší části tvořeno vodou, patří mezi nejčastěji měřená jádra s nenulovým jaderným spinem právě jádra ^1H obsažená v molekulách vody. Mezi další velmi často měřená jádra s nenulovým jaderným spinem patří: ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na a ^{31}P . Za normálních podmínek jsou vektory magnetického momentu těchto jader uspořádány náhodně. Avšak vlivem silného magnetického pole dojde

k paralelnímu (stav s nižší energií) či antiparalelnímu (stav s vyšší energií) uspořádání těchto jaderných spinů vůči magnetickému poli. Výsledný vektor magnetizace \vec{M} (získaný součtem jednotlivých vektorů magnetického momentu jader) v magnetickém poli vykonává precesní pohyb. Při aplikaci krátkého kolmého radiofrekvenčního pulsu dochází k excitaci jaderných spinů, která je spojena se sklápěním vektoru \vec{M} z původního směru daného externím magnetickým polem. V praxi se využívá aplikace 90° a 180° radiofrekvenčního pulsu (viz obr. 3). Po aplikaci 90° radiofrekvenčního pulsu dojde ke sklopení vektoru magnetizace z podélného směru (osa z) do příčné roviny (rovina x, y), zatímco při aplikaci 180° pulsu dochází k převrácení vektoru do opačného směru. Obecně při sklopení magnetizace je protonový systém vyveden z rovnováhy. K opětovnému dosažení rovnovážného stavu dochází na základě interakcí jaderných



Obr. 3: Ilustrace 90° a 180° radiofrekvenčního pulsu, kde $\vec{\mu}_0$ je vektor magnetického momentu, \vec{B}_0 je vektor magnetické indukce statického magnetického pole a \vec{B}_1 je vektor magnetické indukce rotačního magnetického pole. Převzato z literatury.^[19]

spinů s jejich prostředím skrze proces zvaný relaxace. Návrat x, y-ové vektorové složky magnetizace na původní hladinu se nazývá transversální (příčná neboli spin-spinová) relaxace, která je charakterizovaná časovou konstantou označovanou jako relaxační čas T_2 . Návrat vychýlené z-ové vektorové složky magnetizace na původní hladinu probíhá procesem zvaným longitudinální (podélná neboli spin-mřížková) relaxace, která je charakterizovaná časovou konstantou označovanou jako relaxační čas T_1 .

Jak již bylo řečeno, precesní pohyb vzniká na základě aplikace externího magnetického pole a je charakterizován Larmorovou frekvencí, která je daná velikostí

magnetického pole v místě jádra. MRI skenery využívají gradienty magnetického pole, pomocí kterých se definují Larmorovy frekvence jader v různých částech prostoru. Na základě těchto gradientů magnetického pole lze poté vybrat určitou vrstvu a sestavit její výsledný MRI obraz.^[19, 20]

1.5. Kontrastní látky

V zobrazování magnetickou rezonancí lze výsledný kontrast posílit přidáním kontrastní látky (CAs, *contrast agents*). Kontrastní látky jsou chemické sloučeniny, které díky svému složení dokážou zlepšit měřený signál, a to na základě modifikace jedné nebo několika fyzikálních vlastností ovlivňujících rezonanční efekt, jako např. hustotu protonů, longitudinální relaxační čas, transverzální relaxační čas anebo míru difúze vody. Výsledkem je vyšší citlivost a specifita, což umožňuje lepší charakterizaci jednotlivých tkání anebo sledování velkého počtu biochemických procesů. Kontrastní látky lze také využít ke značení vybraných struktur a dokonce i jednotlivých buněk pro jejich cílenou vizualizaci v MRI.^[33]

Historicky se kontrastní látky dělí do dvou hlavních skupin v závislosti na tom, zda ovlivňují (resp. zkracují) longitudinální relaxační čas T_1 anebo transverzální relaxační čas T_2 . Mezi nejčastěji používané pozitivní kontrastní látky (T_1 -CAs) zkracující relaxační čas T_1 patří především paramagnetické komplexy trojmocného gadolinia, jako jsou např. Gd-DOTA^[21], Gd-DTPA^[22] anebo Gd-BOPTA^[23]. Dále do této skupiny kontrastních látek patří komplexy dvojmocného manganu (např. Mn-DPDP)^[24] anebo oxid gadolinitý Gd_2O_3 ^[25]. Mezi typické takzvané negativní kontrastní látky (T_2 -CAs) zkracující relaxační čas T_2 patří superparamagnetické nanočástice na bázi oxidů železa, jako jsou Fe_3O_4 a γ - Fe_2O_3 (tzv. SPIOs, *Superparamagnetic Iron Oxides*).^[26] Dále do této skupiny patří ferity neboli magnetické spinely obecného složení MFe_2O_4 , kde jako přechodný kov M může vystupovat zinek^[27], kobalt^[28], nikl^[29] anebo mangan^[30]. Patří sem také ferity tvořené kombinacemi výše zmíněných přechodných kovů^[31, 32] anebo oxidy lanthanoidů, jako jsou např. Dy_2O_3 , Ho_2O_3 či Er_2O_3 ^[25].

Jinou alternativou je dělení kontrastních látek na základě jejich magnetických či chemických vlastností anebo dělení na základě jejich biodistribuce.^[33]

1.5.1. Povrchová úprava kontrastních látek na bázi oxidů železa

Nanočástice používané v klinické i experimentální praxi jako kontrastní látky pro MRI jsou do jednotlivých tkání, orgánů nebo nádorů cíleny pasivně anebo aktivně. V případě pasivního cílení jsou nanočástice například kumulovány ve specifických typech tkáňových nádorů vlivem špatného proudění lymfy. Nanočástice jsou do těchto cílových míst dopravovány pasivně na základě rozdílné vaskulární permeability mezi zdravými a nádorovými tkáněmi. Na tomto principu založený způsob transportu však není zcela spolehlivý, proto je pro klinickou (ale i experimentální) praxi důležité nanočástice do cílových míst dopravovat aktivně. V případě aktivního cílení se povrch nanočástic derivatizuje vhodnými biomolekulami, které interagují s receptory rakovinných buněk. Nanočástice mohou být svým povrchem spojeny s různými typy biomolekul, což umožňuje nanočástice selektivně cílit na specifické rakovinné buňky. Výhody této strategie specifického (aktivního) značení rakovinných buněk jsou: a) vlivem specifických molekulárních interakcí mezi biomolekulou a receptorem na povrchu buňky dochází v daném místě ke zvýšení retenčního času; b) jelikož se na povrchu buňky může zachytit velké množství částic, dochází zde ke vzájemnému spolupůsobení magnetických částic, což vede k zvýšení relaxivity a zvýšení citlivosti zobrazení vlivem vzniklé nehomogenity magnetického pole; c) kooperativní účinek nanočástic může také zkrátit potřebnou dobu tepelné aktivace a zlepšit schopnost ablace rakovinných buněk v případě magnetické fluidní hypertermie.

Pro zvýšení specifického účinku nanočástic v cílových tkáních hrají velmi důležitou roli: velikost, tvar, koloidní stabilita, biokompatibilita, netoxická povaha, neimunogenita a dlouhý poločas rozpadu těchto nanočástic. Podle cílového místa lze výše zmíněné parametry upravovat na míru. V tomto případě hraje zásadní roli zvolení vhodné povrchové úpravy magnetických jader.^[34]

- **Dextran**

Dextran patří mezi vysoce využívaný typ povrchové úpravy magnetických jader. Tento způsob funkcionalizace je dobře znám u nanočástic oxidů železa. Železnaté a železité soli jsou vysráženy v alkalickém prostředí v přítomnosti vhodné koncentrace dextranu, což přímo vede ke vzniku superparamagnetických nanočástic oxidů železa obalených dextranem. Vazba mezi oxidy železa

a dextranem je založená na nekovalentních interakcích. Samotná vazba dextranu a magnetických jader je poměrně slabá, což by mohlo vést k agregaci v případě biologických podmínek. Z tohoto důvodu je povrch magnetických jader funkcionalizován dextranem zesíťovaným pomocí epichlorhydrinu. Na povrch takto upravených nanočástic mohou být navázány další molekuly prostřednictvím primární aminoskupiny. Pro povrchovou úpravu magnetických jader může být použit také karboxylovaný dextran.^[34]

- **PEG-COOH**

Mezi velmi oblíbené typy povrchových úprav jader oxidů železa, jež vedou ke stabilní vodné suspenzi nanočástic, patří PEGylace. PEGylované částice lze připravit různými metodami, mimo jiné i takzvanou polyolovou metodou. V tomto případě anorganické prekurzory reagují s polyoly (např. s PEGem) při vysokých teplotách za solvotermálních podmínek. Polyoly v průběhu reakce slouží jako redukční činidla a zároveň brání růstu resp. agregaci magnetických jader. Nanočástice připravené tímto způsobem jsou vysoce monodisperzní, krystalické a mohou být dispergovány jak ve vodě, tak i v dalších polárních rozpouštědlech. Povrch nanočástic bývá často dále funkcionalizován prostřednictvím ligandové výměny polyolových skupin za poly(etylenglykol)bis(karboxymethyl)ether a následnou konjugací například s molekulami receptoru.^[34]

- **2,3-dimerkaptojantarová kyselina (DMSA)**

Dimerkaptojantarová kyselina je velmi účinné chelatační činidlo a vytváří silnou vazbu s povrchem nanočástic. Thiolové skupiny jsou schopné vytvářet sítě a vytvářet disulfidický plášť, který napomáhá k dosažení stabilní vodné suspenze nanočástic. Příprava nanočástic s touto povrchovou úpravou spočívá v ligandové výměně molekul organických surfaktantů přítomných na povrchu magnetických jader oxidů železa za molekuly DMSA a jejich následné stabilizaci ve vodné fázi. Thiolové skupiny přítomné na povrchu nanočástic jsou snadno dostupné a mohou být použity pro vazbu např. s protilátkami prostřednictvím sulfidických vazeb.^[34]

- **Silika**

Povrchová úprava nanočástic amorfním konstitučně hydratovaným oxidem křemičitým (silikou) si získala oblibu především díky jednoduchému syntetickému postupu, možnosti snadného zabudování dalších funkčních skupin do křemičitého obalu a také díky jeho vysoké biokompatibilitě. Křemičitý obal na povrchu nanočástic může být formován jako kontinuální, mezoporézní nebo jako velmi tenká vrstva. Povrch nanočástic může být modifikován oxidem křemičitým jak ve vodné, tak i v organické fázi. Výsledkem jsou velmi stabilní vodné suspenze takto povrchově upravených nanočástic. K povrchové úpravě magnetických jader pomocí siliky se zpravidla využívá syntetický postup probíhající ve vodném prostředí. V tomto případě je tetraethoxysilan (TEOS) hydrolyzován ve směsi vody, alkoholu a amoniaku. Zatímco k povrchové úpravě magnetických jader syntetizovaných v organické fázi se využívá postup tzv. reverzní mikroemulze. V tomto případě je TEOS hydrolyzován ve směsi amoniaku a vody tvořících spolu s vhodnými surfaktanty inverzní micelární fázi v organických rozpouštědél jako je cyklohexan. Oba syntetické postupy vedou k nanočásticím, jejichž magnetické jádro je obaleno amorfni vrstvou siliky, jejíž tloušťka se dá snadno řídit množstvím použitého TEOS (event. vody v případě reverzní mikroemulze). Povrch takto upravených nanočástic může být dále modifikován dalšími skupinami (např. SH-, NH₂- apod.) zaváděnými nejčastěji prostřednictvím různých trialkoxysilanů.^[34]

- **Ligandy odvozené od dopaminu (DPA)**

Dalším příkladem povrchové úpravy nanočástic jsou ligandy odvozené od dopaminu (DPA). DPA je například kovalentně připojen k jedné z karboxylových skupin PEGu obsahujícího dvě karboxylové skupiny (HOOC-(PEG)_n-COOH). Díky vysoké afinitě k železu se DPA váže snadno na nanočástice oxidů železa, ale také na povrchu částic snadno nahrazuje ligandy obsahující aminové a karboxylové skupiny. Nanočástice s touto povrchovou úpravou (DPA-(PEG)_n-COOH) jsou dispergovatelné ve vodě a vykazují vynikající stabilitu ve fosfátovém pufru a v 10% fetálním bovinním séru.^[34]

1.5.2. Využití fluoroforů v zobrazovacích metodách

V poslední době roste zájem o využití fluoroforů pro zobrazování v klinické praxi. Vlastní fluorofory mají řadu nevýhod, mezi něž patří především omezená rozpustnost ve vodě, krátká doba cirkulace v živém systému, nízká kvantová účinnost a nízký poměr signálu k šumu. Tyto nedostatky lze více méně zlepšit zabudováním fluoroforu dovnitř nanočástic anebo jeho zabudováním na povrch nanočástic. Pro klinické použití se nejlépe hodí barviva, která lze sledovat hluboko v tkáních, čili ta, která absorbují a emitují v červené a blízké infračervené oblasti spektra. Do této skupiny patří např. barviva založená na bázi cyaninu, squarainu, thiazinu, oxazinů, porfyrinů a ftalocyaninu, jež se nachází ve fázi klinického testování.^[35]

Příkladem multimodálních nanočástic jsou fluorescenčně značené nanočástice Mn_3O_4 zkracující relaxační čas T_1 , které byly připraveny skupinou Yang et al. (2010). Kromě toho, že tyto nanočástic mohou být použity v zobrazování magnetickou rezonancí jako T_1 kontrastní látky, mohou být využity také v dalších odvětvích experimentálního výzkumu, jako je např. fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie či specifické značení rakovinných buněk. Magnetická jádra nanočástic (tvořená Mn_3O_4) byla připravena termální dekompozicí a následně obalena silikou. Takto upravené nanočástice byly dále aminovány silizací, což umožnilo kovalentní vazbu fluoroforu (konkrétně isothiokyanátu rhodaminu B) a folátu pro specifické zacílení na rakovinné buňky. Tyto nanočástice mimo jiné vykazovaly také nízkou míru toxicity.^[36]

Jiným příkladem jsou multimodální nanočástice s magnetickými jádry Fe_3O_4 , jež byly připraveny skupinou Wang et al. (2012). Jádra byla obalena fluorescenčně značeným buněčným peptidem a biokompatibilním blokovým kopolymerem (PEG₆₀₀-*b*-poly(glycerolmonoakrylát)). Jako fluorescenční barvivo byl v tomto případě použit fluorescein-isothiokyanát (FITC). Pro srovnání byly připraveny tytéž fluorescenčně značené nanočástice, ale bez buněčného peptidu. Pomocí konfokální laserové rastrovací mikroskopie bylo zjištěno, že nanočástice obsahující peptid se kumulují v cytoplazmě a v buněčném jádru, nebyla však u nich pozorována zvýšená míra cytotoxicity. Nanočástice bez tohoto peptidu byly lokalizovány v buněčných membránových kompartmentech, kam patří např., jádro, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, vezikuly, lyzozomy apod.). U těchto nanočástic se předpokládá jejich využití nejen v buněčném zobrazování, ale i v genové terapii nebo při cíleném transportu léčiv.^[37]

Skupinou Sheng et al. (2018), byly připraveny biokompatibilní nanočástice s magnetickými jádry $(\text{Mn}_x\text{Fe}_{1-x})\text{Fe}_2\text{O}_4$ a křemičitým obalem (silikou) se zabudovaným fluoroforem (fluorescein, resp. FITC). Silika byla následně derivatizována molekulami methoxy(PEG)-sukcinimidylkarboxymethylu. Takto připravené nanočástice vykazovaly vysokou saturační magnetizaci, vysoké hodnoty relaxivity a vysoký topný výkon ve střídavém magnetickém poli, tedy vysokou hodnotu SAR (*specific absorption rate*). Nanočástice dále vykazovaly vysokou koloidní stabilitu a nízkou míru cytotoxicity. Díky těmto vlastnostem mají nanočástice potenciál pro využití např. v zobrazování magnetickou rezonancí (jako T_2 kontrastní látka), v magnetické fluidní hypertermii a v metodách využívajících fluorescenci.^[38]

Výše zmíněné příklady ukazují, že multimodální nanočástice hrají významnou roli v rámci jednotlivých zobrazovacích metod klinického i experimentálního výzkumu.

2. MOTIVACE A CÍL PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo připravit multimodální T_2 kontrastní látky na bázi fluorescenčně značených magnetických jader spinelového typu, které by byly vhodné nejen pro použití v magnetické rezonanci, ale i v dalších metodách experimentálního výzkumu (jako je např. fluorescenční mikroskopie či průtoková cytometrie apod.), jejichž princip je založen na detekci fluorescence.

Dílčím cílem syntetické části byla příprava vlastních magnetických jader zinkem dopovaného kobaltnatého feritu o různých velikostech v závislosti na zvoleném způsobu přípravy. Vzhledem k navazujícím biologickým experimentům byla v dalším kroku snaha získat stabilní suspenzi nanočástic ve vodné fázi. K dosažení tohoto cíle byla nejdříve zvolena metoda ligandové výměny organických surfaktantů přítomných na povrchu magnetických jader za ligand s hydrofilními skupinami. Avšak lépe se osvědčila druhá metoda spočívající v obalování magnetických jader biokompatibilním materiálem na bázi amorfního oxidu křemičitého neboli siliky. Následným zabudováním fluorescenční sondy (fluoresceinu nebo piperazinového derivátu rhodaminu B) do tohoto křemičitého obalu byly získány multimodální feritové nanočástice.

U těchto multimodálních feritových nanočástic byly posléze analyzovány jejich magnetické, fluorescenční a MRI vlastnosti. V navazujících biologických experimentech byla poté zjišťována jejich míra toxicity u různých typů buněčných kultur, a v neposlední řadě byla zjišťována také jejich lokalizace v rámci buňky pomocí fluorescenční a transmisní elektronové mikroskopie.

3. MATERIÁL

3.1. Chemikálie

Pro chemickou syntézu byly používány komerčně dostupné chemikálie od výrobců: Acros Organics, Fluka, Lach-Ner, Lachema, P-Lab, Penta a Sigma-Aldrich. Kromě výše zmíněných producentů chemikálií, byly pro biologické experimenty používány také komerčně dostupné chemikálie od výrobců: Biotech, Calbiochem, Cayman Chemical, Exbio, Gibco (Invitrogen) a Molecular Probes.

3.2. Suspenze nanočástic použité v biologických experimentech

TCZF 140.21

Vodná suspenze nanočástic feritové fáze o složení $\text{Co}_{0,33}\text{Zn}_{0,12}\text{Fe}_{2,55}\text{O}_4$, enkapsulovaných do křemičitého obalu se zabudovaným piperazinovým derivátem rhodaminu B. Magnetická jádra byla připravena metodou termální dekompozice.

MCZF-081-9

Vodná suspenze nanočástic feritové fáze o složení $\text{Co}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$, enkapsulovaných do křemičitého obalu se zabudovaným piperazinovým derivátem rhodaminu B. Magnetická jádra byla připravena metodou koprecipitace.

CoZnFe 292.10

Vodná suspenze nanočástic feritové fáze o složení $\text{Co}_{0,4}\text{Zn}_{0,6}\text{Fe}_2\text{O}_4$, enkapsulovaných do křemičitého obalu se zabudovaným piperazinovým derivátem rhodaminu B. Magnetická jádra byla připravena metodou koprecipitace.

CoZnFe 292.14

Vodná suspenze nanočástic feritové fáze o složení $\text{Co}_{0,4}\text{Zn}_{0,6}\text{Fe}_2\text{O}_4$, enkapsulovaných do křemičitého obalu se zabudovaným fluoresceinem. Magnetická jádra byla připravena metodou koprecipitace.

3.3. Buněčné kultury

ADHERENTNÍ BUNĚČNÉ LINIE

HeLa

Adherentní buněčná linie nádorových epiteliálních buněk děložního hrdla.

Cytil

Adherentní buněčná linie primárních kožních fibroblastů, která byla získána ze zdravého lidského dárce.

SUSPENZNÍ BUNĚČNÉ LINIE

COLO-320

Suspenzní nádorová buněčná linie odvozená od lidského adenokarcinomu tlustého střeva.

HL-60

Suspenzní promyelocytární buněčná linie odvozená od akutní promyelocytární leukemie.

Jurkat

Suspenzní buněčná linie imortalizovaných T-lymfocytů pocházejících z T-lymfocytární leukémie, která se vyznačuje lymfoblastoidní morfologií.

3.4. Kultivační média

Médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMEM je médium, jehož složení je speciálně upraveno pro kultivaci adherentních buněčných linií HeLa a Cyril. Toto médium je dále obohaceno o fetální bovinní sérum (FBS, 10 % (v/v), gentamycin (40 µg/ml) a glutamin (0,25 mg/ml).

Médium RPMI-COLO

RPMI-COLO je médium, jehož složení je speciálně upraveno pro kultivaci suspenzní buněčné linie COLO-320. Hlavní složkou tohoto média je RPMI 1640 (90 % (v/v), které je dále obohaceno o fetální bovinní sérum (FBS, 10 % (v/v), 2mM glutamin a gentamycin (40 µg/ml).

Médium RPMI-JURKAT

RPMI-JURKAT je médium, jehož složení je upraveno pro kultivaci suspenzních buněčných linií Jurkat a HL-60. Hlavní složkou tohoto média je RPMI 1640 (90 % (v/v), které je dále obohaceno o fetální bovinní sérum (FBS, 10 % (v/v), 10mM HEPES, gentamycin (40 µg/ml), 2mM glutamin, 50µM 2-merkptoethanol, hydrogenuhličitan sodný (26,5 µl/ml) a 1mM pyruvát sodný.

3.5. Pufry

HBSS (Hanks' Balanced Salt solution, pH 7,4)		PBS (fosfátový pufr, pH 7,4)	
HEPES kyselina	10 mmol/l	NaCl	138 mmol/l
NaCl	140 mmol/l	KCl	3 mmol/l
KCl	5 mmol/l	Na ₂ HPO ₄	12 mmol/l
CaCl ₂	2 mmol/l	KH ₂ PO ₄	2 mmol/l
MgCl ₂	3 mmol/l	deionizovaná voda	
glukóza	1% (w/v)		
deionizovaná voda			

4. CHARAKTERIZAČNÍ METODY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

4.1. Centrifugace

Odstředování související s chemickou syntézou, obalováním nanočástic, jejich čištěním a přípravou vzorků pro analýzu bylo prováděno v 15ml plastových centrifugačních zkumavkách na centrifuze EBA 20 (Hettich Zentrifugen) s úhlovým rotorem o poloměru 86 mm nebo v 50ml plastových centrifugačních zkumavkách s kónickým dnem na centrifuze NF-800 (Nüve) s úhlovým rotorem o poloměru 104 mm.

Centrifugace týkající se biologických experimentů byly prováděny v plastových 1,5ml mikrozukmavkách Eppendorf na mikrocentrifuze MiniSpin Plus (Eppendorf) s úhlovým rotorem F-45-12-11 nebo v 50ml plastových centrifugačních zkumavkách či mikrotitračních 96-jamkových destičkách na centrifuze Universal 16 R (Hettich Zentrifugen) s výkyvnými rotory o poloměrech 138 mm a 124 mm.

Doba odstředování a otáčky jsou uváděny vždy ve tvaru (otáčky [rpm]/čas [min]).

4.2. Dynamický rozptyl světla (DLS)

Koloidní stabilita a distribuce hydrodynamické velikosti nanočástic byly analyzovány pomocí dynamického rozptylu světla DLS (*dynamic light scattering*). Vlastní rozptyl byl měřen s využitím kompaktní goniometrické instrumentace složené z goniometru ALV/CGS-8F, vícenásobného τ -digitálního korelátoru ALV-5000/EPP, detektoru ALV-High Q.E. APD a He-Ne laseru 1145P-3083 (22 mW, 633 nm). Všechny vzorky byly měřeny za laboratorní teploty při úhlu 90°.

Získaná data byla následně vyhodnocena fitováním změřených normalizovaných časových autokorelačních funkcí intenzity rozptýleného světla na základě Siegertova vztahu v programu *ALV-Correlator Software V.3.0(2)*. Siegertova rovnice:

$$g_2(t) = 1 + \beta[g_1(t)]^2$$

vyjadřuje vztah normalizované časové autokorelační funkce intenzity rozptýleného světla $g_2(t)$ vzhledem k autokorelační funkci elektrického pole $g_1(t)$, kde β je korekční parametr závislý na koherenci a uspořádání laserového paprsku.^[39]

Výsledná data jsou prezentována ve formě hydrodynamických poloměrů ($r_{(DLS)}$).

Vzorek pro DLS:

Vzorkem pro měření dynamického rozptylu světla se rozumí skleněná DLS kyveta naplněná zředěnou suspenzí nanočástic. Pro měření dynamického rozptylu světla byly použity DLS kyvety (LS Instruments) válcového tvaru o vnitřním průměru 8 mm, vnějším průměru 10 mm a délce 75 mm.

Příprava vzorku:

DLS kyveta byla naplněna destilovanou vodou, následně do ní bylo přidáno několik kapek suspenze nanočástic ze zásobní láhve, přičemž zásobní suspenze nanočástic byla před vlastním použitím krátce sonikována pomocí ultrazvukové lázně. Výsledná zředěná suspenze nanočástic v kyvetě vykazovala slabý zákal.

4.3. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční vlastnosti připravených nanočástic byly ověřeny pomocí fluorescenční mikroskopie na buněčných kulturách, jež byly s těmito nanočásticemi inkubovány. Snímky byly pořízeny na těchto přístrojích:

- Fluorescenční mikroskop Cell[^]R (Olympus) složený z invertovaného mikroskopu Olympus IX81, který je vybaven motorizovaným stolcem Märzhäuser Wetzlar ovládaným jednotkou Corvus a kamerou Controller ORCA-ER (Hamamatsu); použité objektivy LUCPLFLN 40x a UPLSAPO 60x (užití tohoto objektivu vyžaduje imerzní olej (Immersion Liquid Type F, Leica)). Získaná data byla zpracována v programu *Olympus Soft Imaging Solutions*.
- Fluorescenční binolupa SteREO Lumar V12 (Carl Zeiss) s objektivem Zeiss NeoLumar Objective S 0.8x a černobílou kamerou s vysokým rozlišením AxioCam HR. Získaná data byla zpracována v programu *Leica Confocal Software 2.61*.

4.4. Fluorescenční spektroskopie

Excitační a emisní spektra produktu TCZF 140.21 a konjugátu Si@Rho-P byla změřena Ing. Jarmilou Kuličkovou (FZÚ AV ČR) na spektrofluorimetru AMINCO Bowman Series 2 (Thermo Spectronic). Měření probíhala v křemenných fluorescenčních kyvetách

Hellma 111–QS. Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu *AB2 Luminescence Spectrometer*.

4.5. Chemická analýza

Stanovení přesné koncentrace suspenzí magnetických nanočástic pro relaxometrické a biologické studie bylo zajištěno Mgr. Michalem Kačenkou, Ph.D. a Ing. Jakubem Koktanem, Ph.D. (FZÚ AV ČR) s využitím atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací. Minerální rozklad vzorků nanočástic obalených oxidem křemičitým probíhal v teflonových kelímcích pomocí HF, HNO₃ a jejich směsí.^[40] Vlastní stanovení bylo provedeno metodou standardních přídavek, která dovoluje potlačit matriční efekty.

4.6. Magnetometrie

Magnetická měření prováděl Ing. Mgr. Ondřej Kaman, Ph.D. na Fyzikálním ústavu AV ČR pomocí SQUID magnetometrie s využitím systému MPMS XL od Quantum Design, který je vybavený 7 T supravodivým solenoidem. Vlastní vzorky byly připravovány navážením malého množství (typicky méně než 10 mg) vysušených nanočástic do želatinové kapsle a jejich upěchováním teflonovou páskou. Dále následovala standardní montáž do plastových stébel dodávaných Quantum Design.

4.7. Měření relaxivit

Relaxivity připravených suspenzí nanočástic byly měřeny v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) na relaxometru Minispec NMR analyser mq 20 (Bruker) s magnetickým polem 0,5 T. Získaná data byla zpracována v programu *Bruker-the minispec* (verze: V2.51 Rev.00/NT). Měření probíhalo v rozsahu teplot cca 4°C až 60°C s intervalem ohřevu přibližně 1°C za půl minuty.

Výsledná data jsou prezentovaná v grafické podobě jako závislost transversální relaxivity r_2 na teplotě.

4.8. Průtoková cytometrie (FACS)

Průtoková cytometrie byla měřena Mgr. Valérií Grobárovou, Ph.D. (Laboratoř buněčné imunologie, Přf UK) na průtokovém cytometru Becton Dickinson LSR II (BD Biosciences). Získaná data byla zpracována v programu *BD FACSDiva 6.1*.

Průtoková cytometrie je metoda, pomocí níž lze stanovit počty živých a mrtvých buněk v populaci na základě jejich velikosti, vnitřní morfologie, ale také pomocí fluorescenčního značení. Princip metody je založen na nasátí vzorku buněčné kultury skleněnou kapilárou, přičemž při průchodu vzorku touto kapilárou dochází k separaci větších shluků buněk do malých kapiček, které pak procházejí skrz laserový paprsek. Při průchodu kapičky laserem dochází k rozptylu, který je snímán v přímém (pod úhlem 20°, tzv. forward scatter) a bočním (pod úhlem 90°, tzv. side scatter) směru. Díky tomuto uspořádání je možné v přímém směru měřit velikost procházejících buněk a v bočním směru pak jejich vnitřní strukturovanost. Na základě velikosti a vnitřní morfologie jsou pak jednotlivé buňky přístrojem vyhodnoceny jako mrtvé (v případě menších buněk s nízkou vnitřní morfologií) nebo jako živé (v případě větších buněk s bohatou vnitřní morfologií). Tento způsob rozlišování živých a mrtvých buněk je možné doplnit o fluorescenci, kdy je buněčná kultura před vlastním měřením inkubována s fluorescenční sondou. Tato sonda se specificky váže na DNA mrtvých či umírajících buněk, jejichž membrána přestává být nepropustnou a stává se permeabilní. Mezi takovéto fluorescenční sondy patří např. barviva Hoechst nebo propidium jodid.

4.9. Rentgenová prášková difrakce

Rentgenová difrakce byla měřena a vyhodnocena Ondřejem Kamanem na Fyzikálním ústavu AV ČR pomocí rentgenového práškového difraktometru Bruker D8 Advance s využitím záření $\text{CuK}\alpha$. Identifikace krystalových fází připravených nanomateriálů byla provedena na základě krystalografické databáze ICSD (*Inorganic Crystal Structure Database*). Parametry krystalových struktur a střední velikost krystalitů (d_{XRD}) byly určeny pomocí Rietveldovy metody s využitím programu *FullProf*. Samotná střední velikost krystalitů byla vyhodnocena na základě rozšíření difrakčních linií, pro jejichž profilovou analýzu byla využita Thompsonova-Coxova-Hastingsova pseudo-Voigtova funkce, která dovolila oddělit příspěvek velikosti krystalitů a pnutí. Současně

byla stanovena vlastní instrumentální funkce na základě měření wolframového standardu prostého pnutí a se střední velikostí krystalitů 9,4 μm .

4.10. Rentgenová fluorescenční spektroskopie (XRF)

Stechiometrický poměr kovů u práškových vzorků z termální dekompozice byl stanoven Ing. Simonou Randákovou (servisní měření na VŠCHT) metodou rentgenové fluorescenční analýzy pomocí XRF spektrometru AXIOS (PANanalytical, Holandsko).

4.11. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Morfologie připravených nanočástic, jejich velikost a lokalizace v organelách buněčných preparátů byla měřena Ondřejem Kamanem na Fyzikálním ústavu AV ČR pomocí transmisního elektronového mikroskopu Philips CM 120 (max. urychlovací napětí 120 kV, katoda LaB₆), jehož součástí je CCD kamera VELETA (Philips) a spektrometr EDAX (AMETEK) umožňující analýzu a chemické mapování.

Získaná data byla zpracována pomocí programu *iTEM* (Olympus) a následně analyzována prostřednictvím programu *ImageJ 1.47*.⁵⁾

Vzorek pro TEM:

Vzorkem pro transmisní elektronovou mikroskopii se rozumí: a) uhlíkem potažený měděný terčík se zaschnutou kapkou velmi zředěné suspenze nanočástic nebo b) uhlíkem potažený měděný terčík se zafixovaným buněčným preparátem.

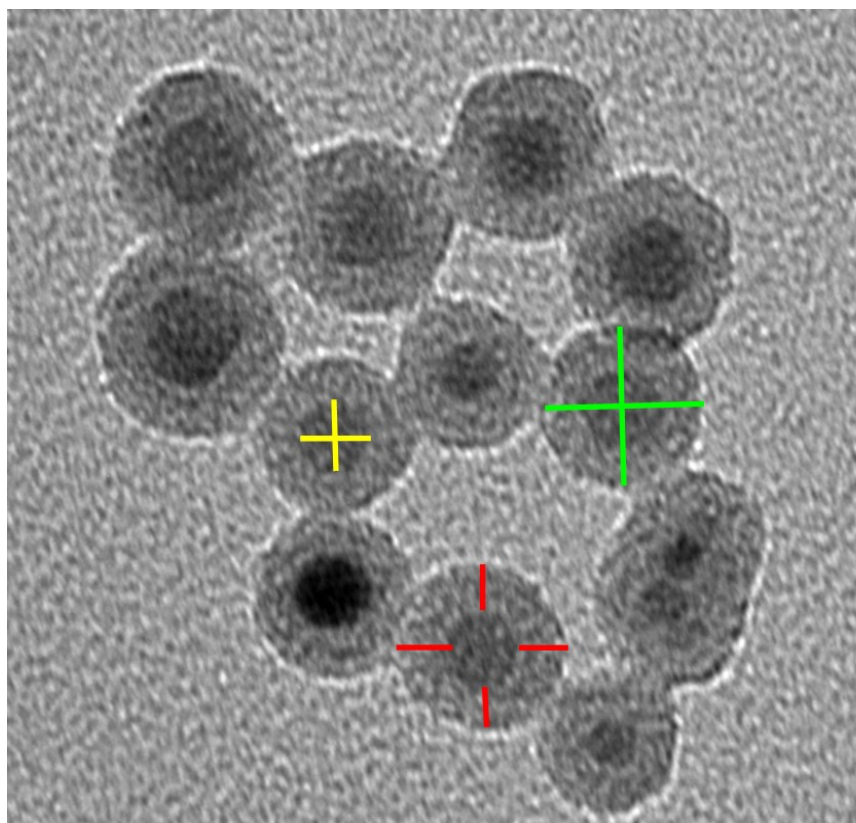
Příprava vzorku:

- a) suspenze nanočástic ze zásobní láhve byla krátce sonikována pomocí ultrazvukové lázně. Následně bylo několik kapek této suspenze přidáno do plastové zkumavky s destilovanou vodou a obsah zkumavky byl opět po krátkou dobu sonikován v UZ-lázni. Poté bylo 3-5 μl takto zředěné suspenze nakápnuto na uhlíkem potažený měděný terčík a kapka se nechala volně zaschnout za laboratorní teploty.
- b) buňky primárních kožních fibroblastů byly kultivovány na sklíčkách ve 24jamkové mikrotitrační destičce. Do každé jamky 24jamkové destičky bylo přidáno 100 μl suspenze nanočástic (TCZF 140.21 nebo CoZnFe 292.10) na 1 ml média. Buňky byly

s nanočásticemi inkubovány v termostatu (37°C, 5% atmosféra CO₂) po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách byly buňky zafixovány pomocí glutaraldehydu (2,5% v PBS) po dobu dvou hodin za laboratorní teploty (následně byla fixace dokončena v lednici). Takto zafixovaná buněčná kultura byla dále zpracována RNDr. Miroslavem Hylišem, Ph.D. z Laboratoře elektronové mikroskopie (PřF UK). Další zpracování obnášelo postfixaci v 2% oxidu osmičelém v 0,1M pufru po dobu 3 až 4 hodin. Poté následovaly tři cykly oplachování v 0,1M pufru po dobu 15 minut a postupné odvodnění vzestupnou ethanolovou řadou (v 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 80% EtOH, 90% EtOH, 95% EtOH a 100% EtOH) vždy po dobu 15 min. Následně byly vzorky postupně převedeny do směsi etanolu a propylenoxidu či acetonu v těchto objemových poměrech: propylenoxid (aceton):EtOH = 1:2, 1:1 a 2:1; inkubace probíhala vždy po dobu 15 minut. Na závěr byly vzorky umístěny na 15 minut do čistého acetonu (propylenoxidu). Poté byly vzorky postupně převedeny do směsi pryskyřice a acetonu či propylenoxidu v těchto poměrech: pryskyřice:aceton (propylenoxid) = 1:2 (po dobu 2 hod.), 1:1 (po dobu 4-6 hod.) a 2:1 (po dobu 6-12 hod.). Posledním krokem bylo převedení vzorků do čisté pryskyřice I (inkubace 12-24 hod.) a pryskyřice II (inkubace 12-24 hod.). Takto upravené vzorky byly zality do forem (kapsle BEEM) a umístěny do termostatu po dobu 24-48 hodin, aby došlo k řádné polymeraci pryskyřice. Po vyjmutí z termostatu byly vzorky dále mechanicky zpracovány pro elektronovou mikroskopii (krájení polosilných a ultratenkých řezů na ultramikrotomu, kontrastování ultratenkých řezů 2-3% vodným roztokem octanu uranylu ve tmě, po dobu dvaceti minut až jedné hodiny, v atmosféře ethanolu). Takto připravené vzorky byly přeneseny na uhlíkem potažené měděné terčíky a následně mikroskopovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu.

Obrazová analýza:

Obrazová analýza byla provedena v programu *ImageJ 1.47.*⁵⁾ U organických suspenzí nanočástic z termální dekompozice byla změřena průměrná velikost jader, přičemž postup byl následující: z několika snímků téže šarže bylo náhodně vybráno 30 různých nanočástic, u nichž byly ručně změřeny vždy 2 rozměry (viz obr. 4 - žluté značky udávající rozměry jádra). Získaná data byla zprůměrována a následně byla odhadnuta střední velikost jader pomocí aritmetického průměru.



Obr. 4: Ukázka ručního měření rozměrů u TEM snímku nanočástic obalených do silikového obalu. Žlutě jsou označeny rozměry jader, červeně jsou označeny rozměry silikové vrstvy a zeleně jsou označeny rozměry celkové velikosti nanočástic.

U suspenzí nanočástic enkapsulovaných do silikového obalu byla změřena průměrná velikost jader, průměrná tloušťka silikové vrstvy a průměrná celková velikost nanočástic. Postup měření byl následující: z několika snímků téže šarže bylo náhodně vybráno 30 různých nanočástic, u nichž byly ručně označeny vždy 2 rozměry jádra, 4 rozměry silikového obalu a 2 rozměry celkové velikosti částic (viz obr. 4). Získaná data byla zprůměrována a následně byla stanovena přibližná průměrná velikost jader, přibližná tloušťka silikové vrstvy a průměrná velikost nanočástic v suspenzi.

4.12. Ultrazvuková sonikace

K sonikaci suspenzí nanočástic byla použita ultrazvuková lázeň SONOREX Long Life RK 103 CH (BANDELIN) s výkonem 200 W nebo ultrazvuková lázeň K2 (OPTING Servis). Při dlouhodobých sonikacích byla teplota UZ-lázně regulována pomocí externího termostatu.

Neobalené nanočástice byly rozptylovány pomocí ultrazvukové sondy UP 200S (Hielscher-Ultrasound Technology) s výkonem 200 W.

4.13. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)

Magnetická rezonance byla měřena Ing. Danielem Jirákem, Ph.D. na MR tomografu Biospec 4,7 T (Bruker) v IKEMu. Získaná data byla poté zpracována v programu *ParaVision* (Bruker).

5. SYNTETICKÁ ČÁST

V prvním kroku byla připravena magnetická jádra nanočástic Co-Zn feritu o dvou různých velikostech magnetických jader. Velká jádra byla připravena metodou koprecipitace (výsledkem syntézy je čistý ferit tvořený klastry magnetických jader o velikosti 80 nm až 100 nm), zatímco malá jádra byla připravena metodou termální dekompozice (výsledkem syntézy je koloidně stabilní hexanová nebo petroletherová suspenze magnetických jader o velikosti 10 nm až 25 nm, jež mají na povrchu navázanou olejovou kyselinu a oleylamin).

V dalším kroku bylo cílem získat suspenzi nanočástic, která by byla stabilní ve vodné fázi. K dosažení tohoto cíle byla nejprve zvolena metoda tzv. ligandové výměny. Nicméně po vyzkoušení různých experimentálních podmínek se nepodařilo postup ligandové výměny optimalizovat natolik, aby nanočástice zůstaly stabilní ve vodné fázi déle než několik dní. Proto bylo nadále od ligandové výměny upuštěno. Jako alternativní postup byla zvolena metoda obalování magnetických jader do amorfního konstitučně hydratovaného oxidu křemičitého neboli do siliky. Suspenze takto modifikovaných magnetických jader vykazovala koloidní stabilitu ve vodné fázi po dobu nejméně několika měsíců.

Závěrečným syntetickým krokem pak byla snaha zabudovat fluorescenční sondu do silikového obalu nanočástic, a tak získat suspenzi fluorescentních magnetických nanočástic, které by byly stabilní ve vodné fázi. Jako fluorofor byl zvolen piperazinový derivát rhodaminu B (vykazující červenou fluorescenci) a fluorescein (vykazující zelenou fluorescenci). Nakonec se podařilo připravit nanočástice s velkými jádry z koprecipitace a malými jádry z termální dekompozice, jež měly ve svém silikovém obalu zabudován piperazinový derivát rhodaminu B, a nanočástice s velkými jádry, jež měly ve svém silikovém obalu zabudován fluorescein. Nanočástice s malými jádry, které by měly ve svém silikovém obalu zabudován fluorescein, se analogickým způsobem připravit nepodařilo.

Příprava magnetických jader stejně tak i jejich veškeré enkapsulace do křemičitého obalu probíhaly v laboratořích Oddělení magnetik a supravodičů Fyzikálního ústavu AV ČR. Veškeré ligandové výměny, příprava piperazinového derivátu rhodaminu B

a jeho alkylace byly uskutečněny v laboratořích Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

5.1. Příprava magnetických jader metodou koprecipitace

Velká magnetická jádra (MCZF-081, CoZnFe 292) byla připravována metodou koprecipitace na základě upraveného postupu vycházejícího z literatury.^[41]

- ***Vlastní syntéza velkých magnetických jader***

Do kádinky byla odměřena přesná objemová množství kalibrovaných roztoků dusičnanu zinečnatého $Zn(NO_3)_2$, dusičnanu kobaltnatého $Co(NO_3)_2$ a dusičnanu železitého $Fe(NO_3)_3$ v žádaném stechiometrickém poměru (v poměru 0,6 : 0,4 : 2 pro CoZnFe 292). K roztoku dusičnanů byl přidáván amoniak, dokud hodnota pH nečinila 9,5, což vedlo k vyloučení hnědé sraženiny. Poté byl obsah kádinky zahříván na plotýnce po dobu 5 hodin při teplotě 90°C. V průběhu zahřívání byla směs míchána magnetickým míchadlem. Zahuštěná směs byla ponechána přes noc v digestoři bez zahřívání. Kádinka se zahuštěnou směsí byla opět umístěna na plotýnku a obsah kádinky byl zahříván po dobu 4 hodin při teplotě 125°C. V průběhu zahřívání byla směs míchána pomocí skleněné tyčinky. Po čtyřech hodinách byla kádinka umístěna do pece předem vyhřáté na 125°C, po aklimatizaci obsahu kádinky uvnitř pece byla teplota pece postupně (s intervalem 0,5°C za minutu) zvýšena na 210°C. Obsah kádinky byl zahříván na 210°C po dobu 3 hodin. Následně byla teplota pece postupně (s intervalem cca 5°C za půl minuty) zvýšena až na 230°C. Obsah kádinky byl zahříván při teplotě 230°C po dobu 5 hodin, dokud nebyl dokonale vysušen. Poté byl obsah kádinky důkladně zhomogenizován a převeden do platinové misky. Materiál byl v misce přenesen do předem vyhřáté pece a byl žíhán při 650°C po dobu 3 hodin.

- ***Mechanické zpracování jader připravených koprecipitací***

Následně byly takto připravené nanočástice mechanicky zpracovány válcováním pomocí válcovacího zařízení tvořeného motorovou válcnou SWAH 47A2 se dvěma ocelovými válci o průměru 54 mm. Válce se proti sobě otáčely rychlostí 9 otáček za minutu. Celkem byly provedeny tři válcovací cykly vždy zakončené homogenizací

materiálu v achátové misce. Po válcování byly nanočástice podrobeny ještě mletí ve vibračním kulovém mlýnku MM 301 (Retsch). Vlastní mletí probíhalo v ethanolu prostřednictvím nerezové mlecí kuličky o průměru 15 mm v nerezové mlecí nádobce o objemu 25 ml. V prvním mlecím cyklu byly nanočástice mlety po dobu 1 hodiny při frekvenci 21 Hz; v druhém mlecím cyklu byly nanočástice mlety po dobu 30 min při frekvenci 15 Hz. Finální produkt byl získán vysušením ethanolické suspenze ve vakuové sušárně.

Konečný poměr jednotlivých kovů zastoupených ve spinelu přesně odpovídá výchozímu složení reakční směsi. Střední velikost připravených nanočástic je určena zejména teplotou žíhání a způsobem mechanického zpracování (včetně parametrů, jako je počet válcovacích cyklů, ale i počet, délka a frekvence cyklů mlecích).

5.2. Příprava magnetických jader metodou termální dekompozice

Malá magnetická jádra (TCZF 140) byla připravována metodou termální dekompozice na základě upraveného postupu publikovaného v literatuře.^[42]

Den před vlastní syntézou byly reaktanty, respektive acetylacetonáty železa, zinku a kobaltu spolu s hexadekan-1,2-diolem sušeny ve vakuové sušárně.

Veškerá odstředování probíhala v 50ml plastových centrifugačních zkumavkách na centrifuze NF-800, Nüve. Doba odstředování a otáčky jsou uváděny vždy ve tvaru (otáčky [rpm]/čas [min]). Supernatant byl odsáván tak, aby při jeho odstraňování nedocházelo ke zvíření usazeného materiálu.

• *Vlastní syntéza malých magnetických jader*

Do trojhrdlé baňky bylo odváženo přibližně 950 mg acetylacetonátu železitého ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), 213 mg acetylacetonátu zinečnatého ($\text{Zn}(\text{acac})_2$), 140 mg acetylacetonátu kobaltnatého ($\text{Co}(\text{acac})_2$) a 2,6 g hexadekan-1,2-diolu (HDD). Navážky acetylacetonátů odpovídají žádanému stechiometrickému poměru kovů $\text{Zn} : \text{Co} : \text{Fe} = 0,6 : 0,4 : 2$ pro TCZF 140. Baňka byla několikrát evakuována a následně profouknuta dusíkem, aby došlo k odstranění nežádoucího kyslíku přítomného v aparatuře, případně sorbovaného na reaktantech. Poté byla baňka dusíkem kontinuálně profukována. Do kádinky byly pomocí automatické pipety odměřeny surfaktanty, a to přibližně 1,9 ml olejové kyseliny

a 2 ml oleylaminu, ke kterým bylo přidáno 30 ml oktadec-1-enu. Obsah kádinky byl promíchán a pomocí injekční stříkačky byl skrze septum přidán do baňky s reaktanty. Obsah baňky byl míchán kovovým mechanickým míchadlem. Baňka byla následně umístěna na 2 hodiny do lázně se silikonovým olejem, jež byla předem vyhřátá na 200°C. Poté byla baňka přemístěna na další 2 hodiny do lázně se směsí octanu sodného a octanu draselného (1:1), jež byla předem vyhřátá na 300°C. Po dvou hodinách byla baňka vyzvednuta z lázně a obsah baňky se nechal za stálého míchání mechanickým míchadlem volně vychladnout. Po vychladnutí byl obsah baňky převeden pomocí petroletheru nebo hexanu do skleněné zásobní lahve DURAN.

- ***Promývání a frakcionace***

Obsah skleněné zásobní lahve byl vysrážen přidávkem acetonu, poté byl sonikován v ultrazvukové lázni (UZ-lázeň). Následně byl obsah zásobní lahve rozdělen do 50 ml plastových centrifugačních zkumavek a zcentrifugován (8 000 rpm/60 min). Po stočení byl odstraněn narezlý supernatant, který převážně obsahoval zbytky kovů a jiných látek po termální dekompozici. K částicím v centrifugačních zkumavkách bylo přidáno 10 ml petroletheru nebo hexanu. Obsah zkumavek byl krátce sonikován v ultrazvukové lázni, poté bylo k částicím přidáno 30 ml acetonu a obsah zkumavek byl odstředěn (8 000 rpm/60 min). Po stočení byl odsán supernatant. Celkem byly provedeny čtyři tyto promývací cykly v petroletheru či hexanu s acetonem (poměr petroletheru/hexanu vs. aceton byl 1:3).

Po poslední centrifugaci byl odstraněn supernatant a obsah plastových zkumavek byl kvantitativně převeden pomocí petroletheru nebo hexanu do jediné 50ml plastové centrifugací zkumavky. K nanočásticím bylo přidáno 90 μ l olejové kyseliny a 90 μ l oleylaminu. Obsah zkumavky byl poté doplněn do 45 ml petroletherem či hexanem. Obsah zkumavky byl zcentrifugován respektive zfrakcionován (1 000 rpm/10 min). Po stočení byla většina supernatantu (finální produkt) odsáta do nové skleněné lahvičky.

5.3. Ligandová výměna

Magnetická jádra připravená výše popsanými způsoby by se nedala přímo použít pro navazující biologické experimenty už z toho důvodu, že netvoří koloidně stabilní suspenze ve vodě. Aby bylo možné nanočástice přidávat k buněčným kulturám, bylo potřeba je převést do vodné suspenze, v níž by byly koloidně stabilní. Jedním ze způsobů, jak tohoto stavu dosáhnout, je ligandová výměna zbytků organických surfaktantů přítomných na povrchu nanočástic za ligand, který zajistí jejich stabilitu ve vodné fázi.

Pro ligandovou výměnu byla jako ligand zvolena *meso*-2,3-dimerkaptojantarová kyselina (DMSA). Ligandová výměna byla prováděna podle upraveného postupu vycházejícího z literatury.^[43]

Všechna odstředování byla prováděna v 15ml plastových centrifugačních zkumavkách na centrifuze EBA 20 (Hettich Zentrifugen). Doba odstředování a otáčky jsou uváděny vždy ve tvaru (otáčky [rpm]/čas [min]). Supernatant byl odsáván tak, aby při jeho odstraňování nedocházelo ke zvržení usazeného materiálu.

Obecný postup ligandové výměny

Proces ligandové výměny je složen ze dvou kroků, které na sebe plynule navazují. V prvním kroku dochází k vlastní ligandové výměně, přičemž byla vyzkoušena různá reakční prostředí, viz níže. Ve druhém kroku poté navazuje série promývacích cyklů, jejímž cílem je získat nanočástice stabilizované ve vodné suspenzi. Na závěr je ještě provedena frakcionace nezbytná k získání suspenze nanočástic o požadované velikosti.

- **Ligandová výměna (různé reakční podmínky)**

- a) Centrifugační zkumavka s nafoukaným Ar, UZ-lázeň (t ≈ 20°C)*

Do 15ml plastové centrifugační zkumavky bylo odebráno 5 ml hexanové nebo petroletherové suspenze nanočástic připravených termální dekompozicí. Suspenze nanočástic byla před vlastním použitím krátkou dobu sonikována v UZ-lázni. Nanočástice byly destabilizovány přidávkem 3 ml čistého etanolu (EtOH). Obsah zkumavky byl krátce sonikován pomocí ultrazvukové sondy a následně zcentrifugován (6 000 rpm/15 min). Supernatant byl odstraněn, k pevné fázi bylo přidáno 5 ml toluenu a do zkumavky byl zaveden proud argonu.

K navážce 25 mg DMSA ve skleněné vialce se zavedeným proudem inertní atmosféry byl přidán 1 ml dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo 1 ml suchého dimethylformamidu (DMF). Obsah vialky byl míchán proudem argonu, dokud nedošlo k jeho úplnému rozpuštění. Následně byl roztok DMSA v DMSO či DMF přidán k částicím ve zkumavce pomocí argonem vyfoukané stříkačky. Do zkumavky byl ještě nějakou chvíli zaveden proud argonu. Následně byla zkumavka uzavřena, utěsněna parafilmem a umístěna do ultrazvukové lázně s připojeným externím termostatem. Obsah zkumavky se nechal rozptylovat po dobu cca 24 hodin při teplotě 20°C.

b) Centrifugační zkumavka s nafoukaným Ar, kolotoč (RT)

Výchozí kroky ligandové výměny jsou shodné s postupem popsaným výše, viz ad a). Rozdíl nastává v závěrečné fázi ligandové výměny, kdy zkumavka profouknutá argonem, uzavřená a následně utěsněná parafinem, byla místo ultrazvukové lázně umístěna na kolotoč (byl nastaven nejvyšší mód otáčení), na němž se nechala točit po dobu cca 24 hodin.

c) Baňka s průtokem inertního plynu, UZ-lázeň ($t \approx 20^\circ\text{C}$)

Do 15ml plastové centrifugační zkumavky byl odebrán potřebný objem (obsahující cca 20 mg nanočástic) hexanové nebo petroletherové suspenze nanočástic připravených termální dekompozicí. Suspenze nanočástic byla před vlastním použitím krátkou dobu sonikována v UZ-lázni. Nanočástice byly destabilizovány přidavkem 3 ml čistého EtOH. Obsah zkumavky byl krátce sonikován pomocí ultrazvukové sondy a následně zcentrifugován (6 000 rpm/15 min). Supernatant byl odstraněn a pevná fáze byla kvantitativně převedena pomocí 15 ml toluenu do dvouhrdlé baňky. Jeden z otvorů byl uzavřen zátkou a druhý byl utěsněn septem, skrz které byl zaveden proud argonu.

K navážce 50 mg DMSA ve skleněné vialce se zavedeným proudem inertní atmosféry byly přidány 2 ml DMSO nebo 2 ml suchého DMF. Obsah vialky byl míchán proudem argonu, dokud nedošlo k jeho úplnému rozpuštění. Následně byl roztok DMSA v DMSO či DMF přidán skrze septum k částicím ve dvouhrdlé baňce pomocí argonem vyfoukané stříkačky. Do baňky byl ještě nějakou chvíli zaveden proud argonu. Následně byla baňka umístěna do ultrazvukové lázně s připojeným externím termostatem a do baňky byl zaveden trvalý proud dusíku. Obsah baňky se nechal rozptylovat po dobu

cca 24 hodin při teplotě 20°C. Před promýváním byl obsah baňky rozdělen do 15ml plastových centrifugačních zkumavek.

- **Promývání, převedení do vodné suspenze a frakcionace**

Posléze byl obsah zkumavek odstředěn na centrifuze (6 000 rpm/15 min). Po odstranění supernatantu bylo k pevné fázi přidáno 5 ml toluen. Obsah zkumavek byl krátce sonikován v ultrazvukové lázni a následně odstředěn (6 000 rpm/15 min). Supernatant byl odstraněn a k pevné fázi bylo přidáno 8 ml čistého EtOH. Obsah zkumavek byl krátce sonikován v ultrazvukové lázni a následně odstředěn (6 000 rpm/30 min). Celkem byly provedeny 3 promývací cykly v čistém EtOH. Po posledním EtOH cyklu byla k pevné fázi přidáno 10 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl krátce sonikován v UZ-lázni a následně odstředěn (6 000 rpm/30 min). Celkem byly provedeny 3 promývací cykly v destilované vodě. Po posledním promývacím cyklu v destilované vodě byla pevná fáze dispergována v 15 ml destilované vody. Vodná suspenze byla stabilizována několika kapkami zředěného roztoku amoniaku, kdy bylo dosaženo $\text{pH} \approx 7$, a výsledný produkt byl zfrakcionován.

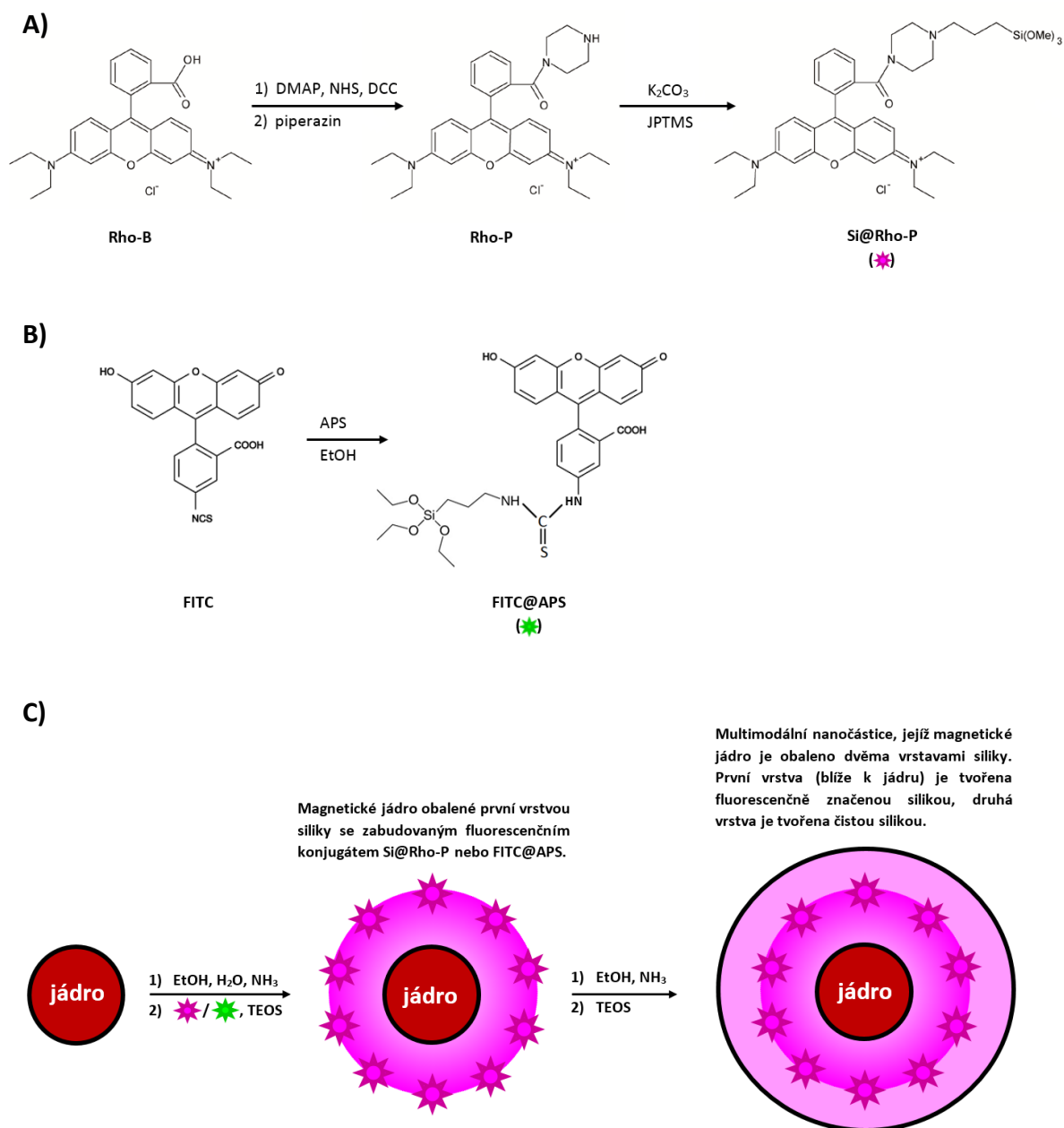
5.4. Příprava fluorescenčně značených nanočástic

Postup pro enkapsulaci velkých i malých feritových jader do siliky byl optimalizován ve spolupráci s Ondřejem Kamanem na základě již dříve stanoveného postupu pro enkapsulaci jader manganitů.^[44, 45, 56]

Příprava fluorescenčně značených feritových nanočástic byla konzultována s Michalem Kačenkou, který se věnoval přípravě fluorescenčně značených manganitů v rámci své disertační práce.^[47, 48]

Veškerá odstředování probíhala v 50ml plastových centrifugačních zkumavkách na centrifuze NF-800, Nüve. Doba odstředování a otáčky jsou uváděny vždy ve tvaru (otáčky [rpm]/čas [min]). Supernatant byl odsáván tak, aby při jeho odstraňování nedocházelo ke zvíření usazeného materiálu.

Zjednodušené schéma přípravy fluorescenčních konjugátů FITC@APS a Si@Rho-P, a následnou enkapsulaci magnetických jader (z koprecipitace) do siliky se zabudováním některého z těchto konjugátů, ukazuje obrázek 5.



Obr. 5: A) schéma přípravy fluorescenčního konjugátu piperazinového derivátu rhodaminu B (Si@Rho-P); B) schéma přípravy fluorescenčního konjugátu fluoresceinu (FITC@APS); C) schéma enkapsulace magnetických jader do siliky se zabudováním fluorescenčního konjugátu.

5.4.1. Hydrofobizace skleněných reakčních nádob

Aby nedošlo k reakci trialkoxysilanové skupiny s reakční nádobou, bylo třeba příslušnou reakční nádobu předem hydrofobizovat jedním z níže uvedených postupů:

- **Postup používaný na PŘF UK**

Reakční nádoba, do níž bylo umístěno magnetické míchadlo, byla zhruba do poloviny naplněna toluenem. Poté byly do baňky pomocí plastového kapátka přidány dvě kapky chlorotrimethylsilanu a dvě kapky triethylaminu. Zbýlý objem baňky byl doplněn toluenem. Reakční nádoba byla uzavřena skleněnými zátkami a umístěna do předem vyhřáté lázně na teplotu 80°C až 90°C. Obsah baňky se nechal míchat minimálně po dobu čtyř hodin (ideálně však přes noc). Poté byla baňka promyta acetonem, etanolem a na závěr vodou. Baňka byla usušena v sušárně nebo přežihána pomocí horkovzdušné pistole.

- **Postup používaný na FZÚ (AV ČR)**

Celý objem reakční nádoby, do níž bylo předem umístěno magnetické míchadlo, byl naplněn 10% roztokem hexamethyldisilazanu v toluenu. Reakční nádoba byla uzavřena skleněnými zátkami a umístěna do silikonové lázně předem vyhřáté na teplotu kolem 60°C. Obsah baňky se nechal zahřívat minimálně po dobu tří hodin. Následně byla baňka promyta petroletherem, etanolem a na závěr acetonem. Reakční nádoba byla posléze přežihána pomocí horkovzdušné pistole.

5.4.2. Příprava Rho-P

- **Syntéza piperazinového derivátu rhodaminu B**

Do trojhrdlé baňky s navážkou 1 g rhodaminu B (Rho-B), 25 mg 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP) a 300 mg *N*-hydroxysukcinimidu (NHS) bylo umístěno magnetické míchadlo. Na jeden z postranních otvorů byl nasazen kohout s hadicí pro regulaci přívodu inertního plynu. Druhý z postranních otvorů byl utěsněn septem. Do centrálního otvoru byla umístěna přikapávačka, jejíž konec byl přes redukci s hadičkou spojen s bublačkou pro odvod inertního plynu. Zábrusy byly kvůli lepší těsnosti celé aparatury namazány silikonovým tukem a všechny spoje byly zajištěny svorkami. Aparatura byla poté umístěna na magnetickou míchačku a nechal se jí krátce profukovat argon. Poté bylo skrze septum přidáno 10 ml suchého acetonitrilu (MeCN). Směs se nechala za RT a inertní atmosféry míchat do jejího rozpuštění.

Do baňky s navážkou 1,1 g *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) bylo za současného zavedení proudu argonu přidáno 10 ml suchého acetonitrilu. Roztok DCC v suchém acetonitrilu byl následně v protiproudu argonu převeden z baňky do přikapávačky. Během 15 minut se roztok DCC v MeCN nechal volně přikapávat k roztoku rhodaminu B, DMAP a NHS v suchém acetonitrilu. Po dokapání se nechala výsledná směs míchat ještě 5 minut.

Do baňky s navážkou 1,8 g piperazinu bylo umístěno magnetické míchadlo. K navážce bylo za současného zavedení proudu argonu přidáno 20 ml suchého acetonitrilu. Obsah baňky byl zlehka zahříván horkovzdušnou pistolí do úplného rozpuštění piperazinu v suchém rozpouštědle. Baňka s reakční směsí (výše zmíněná součást aparatury) byla po dokapání roztoku DCC následně nahrazena za baňku s připraveným roztokem piperazinu a původní reakční směs byla kvantitativně (pomocí 5 ml suchého acetonitrilu) převedena do přikapávačky. Aparatura byla poté obalena alobalem a reakční směs v přikapávačce se nechala po dobu dvou hodin volně přikapávat k roztoku piperazinu. Po dokapání původní reakční směsi byla výsledná směs míchána přes noc.

- ***Separace a purifikace výsledného produktu***

Obsah baňky byl následně zfiltrován přes fritu S4 a dílčí produkt byl seškrábán do 500ml odpařovací baňky. Materiál byl rozpuštěn v malém množství metanolu (MeOH), který byl odpařen dosucha. Odparek byl opět rozpuštěn v malém množství MeOH a čistota surového produktu Rho-P byla ověřena pomocí TLC (mobilní fáze MeOH:CHCl₃ (chloroform) v poměru 1:5), jež bylo posléze vyvoláno ninhydrinem (pozitivní důkaz na přítomnost aminů) a jódem (pozitivní důkaz na přítomnost dalších organických fází).

Případně zjištěný zbytkový piperazin byl z meziprojektu odstraněn sublimací pomocí vakuové rotační odparky (odpařování cca 2 hodiny, teplota lázně se pohybovala kolem 50°C). Odsublímovaný piperazin byl mechanicky odstraněn z hrdla odpařovací baňky.

K odparce bylo následně přidáno 8 g siliky a větší množství methanolu. Celá směs byla pečlivě zamíchána (sorpce produktu na siliku pro následnou sloupcovou chromatografii); rozpouštědlo se nechalo volně odpařovat přes noc v digestoři.

Pro sloupcovou chromatografii bylo použito 125 g siliky, jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a chloroformu v poměru 1:5. Složení jednotlivých frakcí bylo kontrolováno pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC).

Pro tenkovrstvou chromatografii byly použity TLC destičky Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck); mobilní fází byl roztok MeOH:CHCl₃ v poměru 1:5; detekce byla provedena pomocí ninhydrinu (pozitivní důkaz přítomnosti aminů => detekce zbytkového piperazinu) a jódu (pozitivní důkaz přítomnosti případných nežádoucích organických fází).

Frakce obsahující výsledný produkt byly smíchány do jedné baňky a odpařeny dosucha pomocí vakuové rotační odparky. Odparek byl následně rozpuštěn v malém množství metanolu a vysrážen v minimálním množství diethyletheru. Obsah baňky byl umístěn na noc do lednice, aby překrystalizoval. Poté byl obsah baňky dosucha zfiltrován přes fritu S4. Výsledný produkt byl uchováván v tmavé vialce.

5.4.3. Alkylace Rho-P (příprava Si@Rho-P)

Navážka 100 mg bezvodého, žíhaného uhličitanu draselného (K₂CO₃) byla umístěna do předem hydrofobizované 100ml trojhrdlé baňky, která byla vyžihána kahanem. Baňka byla profouknuta argonem a následně i s navážkou lehce přežihnuta nad kahanem. Po vyžihání bylo do baňky umístěno magnetické míchadlo a do baňky byl zaveden proud argonu. Pod zpětným proudem argonu byla do baňky přidána navážka 25 mg připraveného piperazinového derivátu rhodaminu B (Rho-P). Obsah baňky byl i nadále profukován argonem. Posléze bylo skrze septum argonem profouknutou stříkačkou přidáno 2,5 ml suchého acetonitrilu. Obsah baňky se nechal nějakou chvíli míchat pod inertní atmosférou. Následně bylo k reakční směsi přidáno skrze septum pod zpětným proudem argonu 40 µl (3-jodopropyl)trimethoxysilanu (JPTMS). Baňka byla obalena do alobalu a její obsah se nechal míchat pod inertní atmosférou za laboratorní teploty přes noc.

Reakční směs byla posléze skrze mikrobiální filtr (porozita 0,22 µm) přefiltrována do předem hydrofobizované, vyžihané a argonem profouknuté 100ml dvouhrdlé baňky. Baňka byla obalena alobalem a nechal se jí profukovat argon, dokud se většina rozpouštědla (suchý MeCN) neodpařila. Poté byla reakční směs vysrážena suchým čerstvě predestilovaným diethyletherem. Následně byla reakční směs profukována

inertním plynem dosucha. K pevné fázi bylo přidáno opět trochu suchého diethyletheru a celý postup byl zopakován celkem třikrát.

Výsledný vysušený produkt Si@Rho-P (alkylovaný piperazinový derivát rhodaminu B) byl následně použit k enkapsulaci s velkými i malými magnetickými jádry.

5.4.4. Konjugace FITC s APS (příprava FITC@APS)

Aby reakce správně probíhala, muselo být zajištěno dokonale bezvodé prostředí. Z tohoto důvodu byl EtOH účastníci se reakce předem sušen podle postupu uvedeného v literatuře.^[49]

K navážce přibližně 51 mg komerčního fluorescein-5-isothiokyanátu (FITC, čistota > 90%) v 50ml předem hydrofobizované a vyžíhané slzové baňce bylo umístěno magnetické míchadlo; baňka byla uzavřena septem, skrz které byl zaveden proud dusíku. Následně bylo k navážce skrze septum přidáno 10 ml sušeného EtOH a na závěr bylo přidáno ještě 27 μ l 3-aminopropyltriethoxysilanu (APS). Baňka byla obalena alobalem a její obsah se nechal míchat za laboratorní teploty po dobu 24 hod.

Získaný produkt FITC@APS (konjugát fluoresceinu s APS) byl následně použit k enkapsulaci s velkými magnetickými jádry.

5.4.5. Enkapsulace velkých jader do siliky s konjugáty Si@Rho-P a FITC@APS

Celý proces enkapsulace velkých magnetických jader s fluorescenčním konjugátem (Si@Rho-P nebo FITC@APS) je složen ze čtyř kroků, které na sebe plynule navazují. V prvním kroku dochází k aktivaci vlastních magnetických jader a k jejich následné stabilizaci pro vlastní enkapsulaci. V druhém kroku jsou stabilizovaná jádra enkapsulována do první vrstvy siliky, která je obohacena o fluorescenční konjugát. Poté následuje druhá enkapsulace, tentokrát do čisté siliky; dojde tak k překrytí první silikové vrstvy s navázaným fluorescenčním konjugátem druhou silikovou vrstvou. Ta má za úkol zabránit nejen případnému uvolňování a degradaci fluoroforu, ale také zvýšit koloidní stabilitu funkcionalizovaných částic ve vodě. Bez této druhé vrstvy by mohlo dojít k agregaci nanočástic ve vodné suspenzi, degradaci samotné funkcionalizace, případně ke zvýšení toxicity v rámci navazujících biologických experimentů. Na závěr nanočástice procházejí několika promývacími cykly a frakcionací (separace nanočástic o vhodné velikosti).

- ***Aktivace magnetických jader a jejich stabilizace***

K navážce 130 mg feritových nanočástic bylo přidáno 10 ml vychlazené 1M kyseliny dusičné. Směs byla sonikována v ledem chlazené ultrazvukové lázni po dobu 15 min; následně byla směs odstředěna (6 000 rpm/5 min). Po odstředění byl odstraněn supernatant a k pevné fázi bylo přidáno 10 ml vychlazené 0,1M kyseliny citronové. Směs byla sonikována v ledem chlazené ultrazvukové lázni po dobu 15 min; následně byla směs odstředěna (6 000 rpm/5 min). Po odstředění byl odstraněn supernatant a pevná fáze byla promyta 10 ml destilované vody. Směs byla sonikována v ultrazvukové lázni a posléze odstředěna (6 000 rpm/30 min). Po odstranění supernatantu byla pevná fáze dispergována v 10 ml destilované vody a následně alkalizována třemi kapkami amoniaku. Směs byla sonikována pomocí ultrazvukové sondy (výkon 25%) po dobu 30 min; po celou dobu rozptylování byla alkalická směs chlazená pomocí kádinky s ledem.

- ***Enkapsulace I (enkapsulace do siliky s fluorescenčním konjugátem)***

Do baňky s enkapsulační směsí, jež obsahovala 300 ml čistého EtOH, 70 ml destilované vody a 20 ml amoniaku byla přikapána výše zmíněná směs stabilizovaných nanočástic. Obsah baňky byl po dobu 10 min sonikován v UZ-lázni temperované prostřednictvím externího termostatu na teplotu 37°C a současně míchán pomocí zavedeného mechanického míchadla. Po 10 minutách bylo přidáno 780 μ l TEOS a obsah baňky byl nadále sonikován a míchán pomocí mechanického míchadla. Na závěr bylo přidáno několik mg alkylovaného fluorescenčního konjugátu (15 mg Si@Rho-P nebo 10 mg FITC@APS), baňka byla obalena alobalem a její obsah byl nepřetržitě sonikován a mechanicky míchán po dobu cca 20 hod. Po 20 hodinách bylo ukončeno mechanické míchání i sonikace. Obsah baňky byl rozdělen do 50ml plastových centrifugačních zkumavek, jejichž obsah byl odstředěn (4 000 rpm/70 min), po odstředění byl odsán supernatant obsahující nenavázané fluorofory, zatímco pevná fáze sloužila jako výchozí materiál pro navazující enkapsulaci.

- **Enkapsulace II (enkapsulace do čisté siliky)**

Pevná fáze z předchozího kroku byla pomocí 400 ml čistého EtOH kvantitativně převedena do baňky. Obsah baňky byl krátce sonikován v UZ-lázni temperované prostřednictvím externího termostatu na teplotu 37°C a současně míchán pomocí zavedeného mechanického míchadla. Následně bylo k reakční směsi přidáno 64 ml amoniaku. Obsah baňky byl i nadále sonikován a mechanicky míchán. Po 10 minutách bylo k reakční směsi přidáno ještě 580 μ l TEOS, baňka byla obalena alobalem a její obsah byl sonikován po dobu 4 hodiny, avšak mechanické míchání bylo zavedeno po celou dobu enkapsulace, čili po dobu cca 20 hod.

- **Promývání, převedení do vodné suspenze a frakcionace**

Po 20 hodinách bylo zrušeno mechanické míchání i sonikace. Obsah baňky byl rozdělen do 50ml plastových centrifugačních zkumavek, jejichž obsah byl odstředěn (6 000 rpm/40 min), po odstředění byl odstraněn supernatant a k pevné fázi bylo poté přidáno 30 ml čistého EtOH. Po rozptýlení byl obsah zkumavek opět odstředěn (6 000 rpm/40 min). Celkem byly provedeny tři promývací cykly v čistém EtOH. Po posledním EtOH cyklu bylo k pevné fázi přidáno 30 ml destilované vody. Po rozptýlení byl obsah zkumavek odstředěn (6 000 rpm/40 min). Celkem byly provedeny tři promývací cykly v destilované vodě. Po posledním promývacím cyklu v destilované vodě byla pevná fáze dispergována ve 45 ml destilované vody a výsledný produkt byl zfrakcionován v závislosti na požadované velikosti nanočástic (bylo provedeno několik zkušebních frakcionací při různých rpm; od jednotlivých frakcí byly připraveny vzorky na TEM; podle výsledků z TEM bylo možné určit přibližnou velikostní distribuci nanočástic v jednotlivých frakcích).

5.4.6. Enkapsulace malých jader do siliky s konjugátem Si@Rho-P

Do 10ml baňky byly ze zásobní lahve odebrány přibližně 3 ml petroletherové nebo hexanové suspenze nanočástic. K nanočásticím bylo přidáno 60 μ l olejové kyseliny a 60 μ l oleylaminu. Obsah baňky byl pomocí vakuové rotační odpařky odpařen dosucha. Do 250ml dvouhrdlé baňky bylo odměřeno 55 ml cyklohexanu a 3 ml IGEPALu CO 520. Baňka byla zazátkována a následně byla umístěna do UZ-lázně, kde byla sonikována při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Odparek nanočástic byla pomocí 5 ml

cyklohexanu kvantitativně převeden do dvouhrdlé baňky s roztokem cyklohexanu a IGEPALu CO 520. Následně byl ke směsi přidán roztok 3 mg fluorescenčního konjugátu Si@Rho-P ve 300 μ l destilované vody. Obsah baňky byl ještě chvíli sonikován v UZ-lázni. Následně byla baňka obalena alobalem a její obsah byl dále míchán pomocí mechanického míchadla (za RT). Po 15 minutách bylo ke směsi přidáno ještě 1 400 μ l TEOS, na závěr bylo přidáno ještě 150 μ l amoniaku. Obsah baňky byl míchán přes noc pomocí mechanického míchadla (za RT).

- ***Promývání, převedení do vodné suspenze a frakcionace***

Z dvouhrdlé baňky bylo odebráno 30 ml meziprojektu do 50ml plastové centrifugační zkumavky. Nanočástice byly vysráženy 10 ml čistého EtOH. Obsah zkumavky byl zcentrifugován (1 500 rpm/5 min). Po stočení byl odstraněn supernatant a k nanočásticím bylo přidáno 40 ml petroletheru. Obsah zkumavky byl rozptýlen v ultrazvukové lázni a následně zcentrifugován (1 500 rpm/5 min). Po stočení byl odstraněn supernatant. Celkem byly provedeny tři promývací cykly v petroletheru. V další promývací fázi bylo k nanočásticím přidáno 40 ml čistého EtOH. Obsah zkumavky byl rozptýlen v UZ-lázni a následně odstředěn (7 500 rpm/40 min). Po stočení byl odstraněn supernatant. Celkem byly provedeny tři promývací cykly v čistém ethanolu. V následující promývací fázi bylo k nanočásticím přidáno 40 ml destilované vody. Obsah zkumavky byl rozptýlen v UZ-lázni a následně odstředěn (7 500 rpm/40 min). Po stočení byl odstraněn supernatant. Celkem byly provedeny tři promývací cykly v destilované vodě. Na závěr bylo k nanočásticím přidáno 45 ml destilované vody. Obsah zkumavky byl rozptýlen v UZ-lázni a následně byl zcentrifugován resp. zfrakcionován (2 000 rpm/15 min). Výsledný supernatant byl oddělen jako finální produkt.

6. BIOLOGICKÉ EXPERIMENTY

Biologické experimenty byly prováděny ve spolupráci s kolektivem Laboratoře buněčné imunologie Katedry buněčné biologie (PřF UK).

6.1. Testy viability

Testy viability byly opakovaně provedeny na suspenzních buněčných liniích COLO-320 (linie odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva), HL-60 (linie odvozená od akutní promyelocytární leukemie) a Jurkat (imortalizované T-lymfocyty). Buňky byly kultivovány v 50ml plastových centrifugačních zkumavkách. Před jejich použitím byl obsah zkumavek odstředěn na centrifuze Universal 16 R, Hettich Zentrifugen (1260 rpm/3 min). Médium bylo odstraněno, a k peletkám buněk bylo přidáno 25 ml čerstvého média RPMI-COLO (v případě buněk COLO-320) nebo RPMI-JURKAT (v případě buněk HL-60 a JURKAT), a obsah zkumavek byl resuspendován. Následně byl pomocí automatické pipety obsah zkumavek rozpipetován po 1 ml do 24jamkových mikrotitračních destiček. Poté, co byly všechny typy buněk nasazené na 24jamkových destičkách, byly k buňkám přidány nanočástice podle schématu (viz obr. 6). Buňky byly s nanočásticemi inkubovány po dobu 48 hodin v termostatu (37°C, 5% atmosféra CO₂).

Po 24 hodinách byla provedena vizuální kontrola kultivovaných buněk pod světelným mikroskopem. V jednotlivých jamkách byla pozorována poměrně velká množství částečně přisedlých buněk, nebyly pozorovány žádné větší úhyny buněk.

Po 48hodinové inkubaci byl obsah mikrotitračních 24jamkových destiček resuspendován a z každé jamky bylo pomocí automatické pipety odebráno 400 µl buněčné suspenze do 96jamkové destičky (viz obr. 7). Poté byla destička přelepena fólií a zcentrifugována (1393 rpm/3 min). Po stočení byl supernatant odstraněn a k peletkám bylo přidáno 200 µl předem připravené směsi HBSS (Hanks' Balanced Salt solution) s barvivem Hoechst 33258 (16 ml HBSS + 10 mg/ml).

Poté byl obsah destičky resuspendován. Takto připravené vzorky byly změřeny na průtokovém cytometru. Viabilita byla počítána v procentech, a to jako podíl živých buněk z celkového počtu všech změřených buněk (živých i mrtvých).

24jamková destička

	D	C	B	A		
	10	5	2	1	1	VČ
	0,5	S	K	NK	2	
<hr/>						
	10	5	2	1	3	MČ
	0,5	S	K	NK	4	
<hr/>						
	10	5	2	1	5	VZ
	0,5	S	K	NK	6	

Obr. 6: Schéma přidavku nanočástic do jednotlivých jamek 24jamkových mikrotitračních destiček s buňkami Colo-320, HI-60 a Jurkat.

LEGENDA:

■ = VČ – CoZnFe 292.10 v 1xPBS (c = 0,04 mg magnetických jader/ml suspenze nanočástic)

■ = VZ – CoZnFe 292.14 v 1xPBS (c = 0,04 mg magnetických jader/ml suspenze nanočástic)

■ = MČ – TCZF 140.21 v 1xPBS (c = 0,04 mg magnetických jader/ml suspenze nanočástic)

10 = na 1 ml média bylo použito 10 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 0 μ l 1xPBS

5 = na 1 ml média bylo použito 5 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 5 μ l 1xPBS

2 = na 1 ml média byly použity 2 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 8 μ l 1xPBS

1 = na 1 ml média byl použit 1 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 9 μ l 1xPBS

0,5 = na 1 ml média bylo použito 0,5 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 9,5 μ l 1xPBS

S = supernatant; na 1 ml média bylo použito 10 μ l supernatantu po odstředění suspenze nanočástic (VČ/MČ/VZ)

K = kontrola; na 1 ml média bylo použito 10 μ l 1xPBS

NK = negativní kontrola (bez přidavku jakýchkoli látek)

96jamková destička

	H	G	F	E	D	C	B	A			
	10	5	2	1	0,5	S	K	NK	1	}	HL-60
	10	5	2	1	0,5	S	K	NK	2		
	10	5	2	1	0,5	S	K	NK	3		
	10	5	2	1	0,5	S	K	NK	4	}	COLO-320
	10	5	2	1	0,5	S	K	NK	5		
	10	5	2	1	0,5	S	K	NK	6		
	10	5	2	1	0,5	S	K	NK	7	}	JURKAT
	10	5	2	1	0,5	S	K	NK	8		
	10	5	2	1	0,5	S	K	NK	9		
									10		
									11		
									12		

Obr. 7: Schéma rozmístění vzorků buněk inkubovaných s nanočásticemi v 96jamkové mikrotitrační destičce pro měření na průtokovém cytometru.

LEGENDA:

■ = VČ – CoZnFe 292.10 v 1xPBS (c = 0,04 mg magnetických jader/ml suspenze nanočástic)

■ = VZ – CoZnFe 292.14 v 1xPBS (c = 0,04 mg magnetických jader/ml suspenze nanočástic)

■ = MČ – TCZF 140.21 v 1xPBS (c = 0,04 mg magnetických jader/ml suspenze nanočástic)

10 = na 1 ml média bylo použito 10 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 0 μ l 1xPBS

5 = na 1 ml média bylo použito 5 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 5 μ l 1xPBS

2 = na 1 ml média byly použity 2 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 8 μ l 1xPBS

1 = na 1 ml média byl použit 1 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 9 μ l 1xPBS

0,5 = na 1 ml média bylo použito 0,5 μ l nanočástic (VČ/MČ/VZ) + 9,5 μ l 1xPBS

S = supernatant; na 1 ml média bylo použito 10 μ l supernatantu po odstředění suspenze nanočástic (VČ/MČ/VZ)

K = kontrola; na 1 ml média bylo použito 10 μ l 1xPBS

NK = negativní kontrola (bez přídavku jakýchkoli látek)

6.2. Fluorescenční mikroskopie

Příprava sklíček pro fluorescenční mikroskop

Jednotlivé buněčné typy byly kultivovány na sklíčkách v 24jamkových mikrotitračních destičkách. Do každé jamky 24jamkové destičky bylo na 1 ml média přidáno 100 μ l příslušné suspenze nanočástic (TCZF 140.21, CoZnFe 292.10 nebo CoZnFe 292.14) o koncentraci 0,6 mmol/l. Buňky byly s nanočásticemi inkubovány v termostatu (37°C, 5% atmosféra CO₂) po dobu 24 hodin.

Po 24 hodinách byla sklíčka s kulturami buněk přendána do 24jamkové mikrotitrační destičky s 3,8% formaldehydem. Buňky ve formaldehydu byly fixovány v termostatu (37°C, 5% atmosféra CO₂) po dobu dvou hodin. Následně byla sklíčka opláchnuta 1x PBS (3 cykly po 5 minutách). Poté byla sklíčka pomocí kapky Mowiolu s DAPI namontována na podložní skla. Z takto připravených vzorků byly následně pořízeny snímky na fluorescenčním mikroskopu.

Příprava vzorků pro fluorescenční binolupu

HeLa buňky byly kultivovány v 6jamkových mikrotitračních destičkách. Do každé jamky 6jamkové destičky bylo přidáno 100 μ l suspenze nanočástic (TCZF 140.21 nebo CoZnFe 292.10) na 1 ml média. Buňky byly s nanočásticemi inkubovány v termostatu (37°C, 5% atmosféra CO₂) po dobu 48 hodin.

Po 24 hodinách byla provedena vizuální kontrola buněk pod světelným mikroskopem. Po 48hodinové inkubaci byly mikrotitrační destičky vyjmuty z termostatu a umístěny na led. Z jamek bylo odsáto médium (obsahující mrtvé buňky) do mikrozkuhavek eppendorf taktéž umístěných na ledě. Povrch jednotlivých jamek byl opláchnut fosfátovým pufrem. Poté bylo do každé z jamek 6jamkových destiček přidáno 720 μ l PBS a 80 μ l trypsinu. Destičky byly umístěny na 3 minuty do termostatu (37°C, 5% atmosféra CO₂). Účinek trypsinu byl poté ověřen pomocí světelného mikroskopu (buňky se zaoblily a pustily se dna jamek, tedy volně plavaly v médiu). Obsah mikrozkuhavek s mrtvými buňkami byl resuspendován a následně přenesen pipetou zpět do 6jamkových destiček, čímž došlo k zastavení účinku trypsinu. Poté bylo médium s uvolněnými buňkami po částech přeneseno pipetou do mikrozkuhavek eppendorf, jejichž obsah byl následně odstředěn (600 rpm/2 min) na mikrocentrifuze MiniSpin Plus (Eppendorf).

Po odstředění byl odstraněn supernatant a k peletkám buněk bylo přidáno další množství média s uvolněnými buňkami. Celý postup byl opakován do té doby, dokud nebyly všechny buňky přemístěny z jamek mikrotitračních destiček do mikrozkuavek. Po posledním odstředění (600 rpm/2 min) byl odstraněn supernatant a k peletkám byl přidán 1 ml 3,8% formaldehydu. Obsah mikrozkuavek byl resuspendován a následně fixován v termostatu (37°C, 5% atmosféra CO₂) po dobu dvou hodin. Poté byly peletky buněk v mikrozkuavkách opláchnuty 1x PBS (3 cykly po 5 minutách). Z výsledných peletek HeLa buněk byly pořízeny snímky na fluorescenční binolupě.

6.3. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)

Ke kultuře adherentních HeLa buněk v 6jamkových mikrotitračních destičkách bylo přidáno 100 µl nanočástic na 1 ml média podle schématu na obrázku 8. Buňky byly s nanočásticemi kultivovány po dobu 48 hodin v termostatu (37°C, 5% atmosféra CO₂).

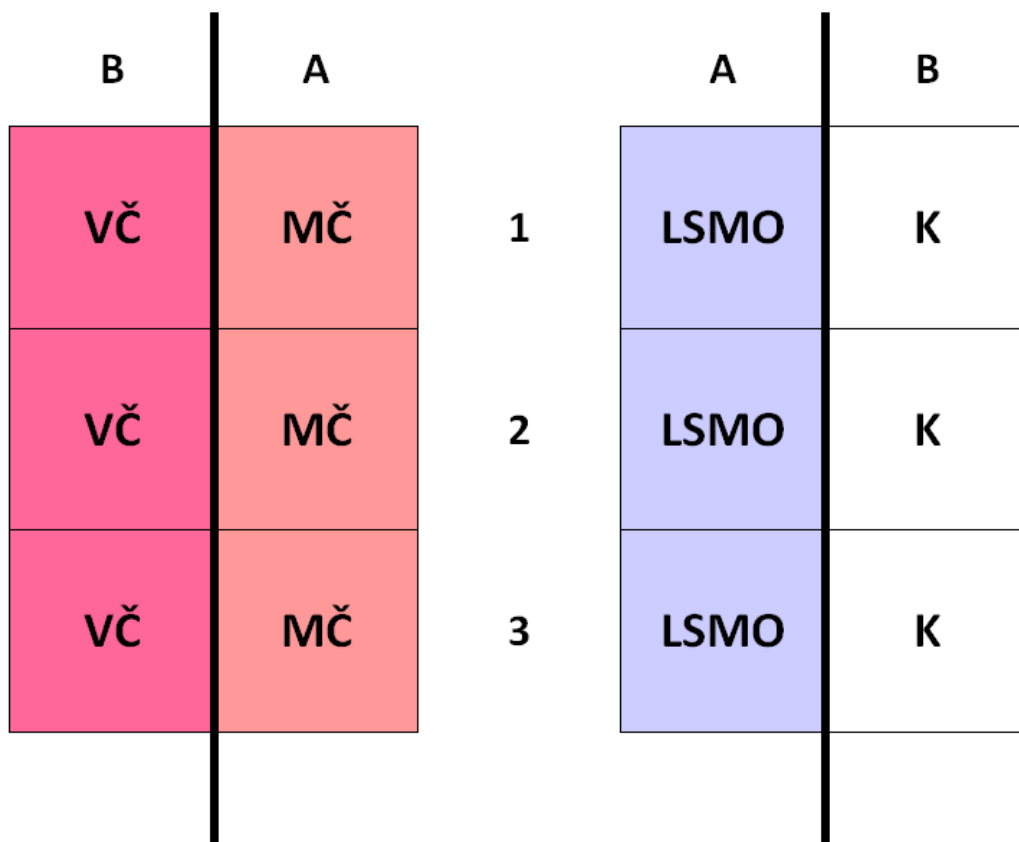
Po 24 hodinách byla provedena vizuální kontrola buněk pod světelným mikroskopem. Po 48hodinové inkubaci byly mikrotitrační destičky umístěny na led. Z jamek bylo odsáto médium (obsahující mrtvé buňky) do mikrozkuavek eppendorf taktéž umístěných na ledě. Povrch jednotlivých jamek byl opláchnut fosfátovým pufrem (PBS). Poté bylo do každé jamky obou 6jamkových destiček přidáno 720 µl PBS a 80 µl trypsinu. Destičky byly umístěny na 3 minuty do termostatu (37°C, 5% atmosféra CO₂). Účinek trypsinu byl poté ověřen pomocí světelného mikroskopu (buňky se zaoblily a pustily se dna jamek, tedy volně plavaly v médiu). Obsah mikrozkuavek s mrtvými buňkami byl resuspendován a následně přenes pipetou zpět do 6jamkových destiček, čímž došlo k zastavení účinku trypsinu. Poté bylo médium s uvolněnými buňkami po částech přeneseno pipetou do mikrozkuavek eppendorf, jejichž obsah byl následně odstředěn (600 rpm/2 min) na mikrocentrifuze MiniSpin Plus (Eppendorf). Po odstředění byl odstraněn supernatant a k peletkám buněk bylo přidáno další množství média s uvolněnými buňkami. Celý postup byl opakován do té doby, dokud nebyly všechny buňky přemístěny z jamek mikrotitračních destiček do mikrozkuavek. Po posledním odstředění (600 rpm/2 min) byl odstraněn supernatant a k peletkám byl přidán 1 ml PBS. Obsah mikrozkuavek byl resuspendován, odstředěn (600 rpm/2 min) a posléze bylo odstraněno médium. K peletkám HeLa buněk byl přidán 1 ml

3,8% formaldehydu (zředěno v PBS), obsah mikrozkuavek byl resuspendován a následně fixován po dobu 20 min v termostatu při teplotě 37°C. Po fixaci byl obsah mikrozkuavek odstředěn (600 rpm/2 min), následovaly 3 cykly promývání v PBS. Po posledním promytí byl k peletkám buněk přidán 1 ml 15mM chloridu amonného (zředěno v PBS). Poté opět následovaly 3 cykly promývání v PBS.

Následně byly připraveny čtyři kratší skleněné kapiláry (nalámané kapiláry do bodotávku, jejichž jeden konec byl zataven, aby vytvořil dno). K peletkám zafixovaných HeLa buněk bylo přidáno malé množství destilované vody, obsah mikrozkuavek byl resuspendován a následně pomocí injekční stříkačky přemístěn do skleněných kapilár. Skleně kapiláry byly umístěny do mikrozkuavek a jejich obsah byl následně odstředěn (1 300 rpm/3 min). Supernatant byl odtažen pomocí stříkačky a následně byla do kapilár přidána další várka buněk. Celý postup se opakoval, dokud v kapilárách nebyl patrný několik mm vysoký sloupec odstředěných buněk. Kapiláry byly po naplnění buňkami zataveny.

Takto připravené kapiláry byly umístěny do malé Petriho misky, a zality 5% želatinou. Po ztuhnutí želatiny byly pomocí experimentálního MRI (IKEM) ověřeny kontrastní vlastnosti nanočástic uvnitř zafixovaných buněk.

2 šesti-jamkové destičky



Obr. 8: Schéma přidavku nanočástic do jednotlivých jamek šestijamkových mikrotitračních destiček s HeLa buňkami

LEGENDA:

VČ – CoZnFe 292.10 v 1xPBS (c = 0,04 mg magnetických jader/ml suspenze nanočástic)

MČ – TCZF 140.21 v 1xPBS (c = 0,04 mg magnetických jader/ml suspenze nanočástic)

LSMO –MK-187-24 v 1xPBS (vodná suspenze perovskitových nanočástic o složení $\text{La}_{0.63}\text{Sr}_{0.37}\text{MnO}_3$, enkapsulovaných do křemičitého obalu se zabudovaným piperazinovým derivátem rhodaminu B, poskytnutá Michalem Kačenkou pro srovnání T_2 kontrastu na MRI)

K = negativní kontrola

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1. Příprava feritových jader a jejich základní vlastnosti

V rámci diplomové práce byly pomocí koprecipitace a termální dekompozice připraveny magnetické nanočástice zinkem dopovaného kobaltnatého feritu, přesněji řečeno nanočástice spinelové fáze obecného složení $\text{Co}_y\text{Zn}_z\text{Fe}_{3-y-z}\text{O}_4$.

Prášková rentgenová difrakční analýza ukázala, že připravené vzorky jsou jednofázové a jejich struktura odpovídá struktuře spinelových feritů s prostorovou grupou $Fd\bar{3}m$. Příklady difraktogramů jsou uvedeny v grafu 1 pro jeden vzorek připravený koprecipitací (CoZnFe 292) a pro jeden vzorek připravený termální dekompozicí (TCZF 140), přičemž mřížkový parametr a jejich kubické

struktury je uveden v tabulce 1. Z naměřených difraktogramů je zřejmé, že dochází k rozšíření difrakčních čar, a to vlivem malé velikosti krystalitů, resp. malé velikosti koherentně difraktujících domén.^[50] Na základě tohoto rozšíření byla pomocí Rietveldovy analýzy určena střední velikost krystalitů d_{XRD} , viz tabulka 1.



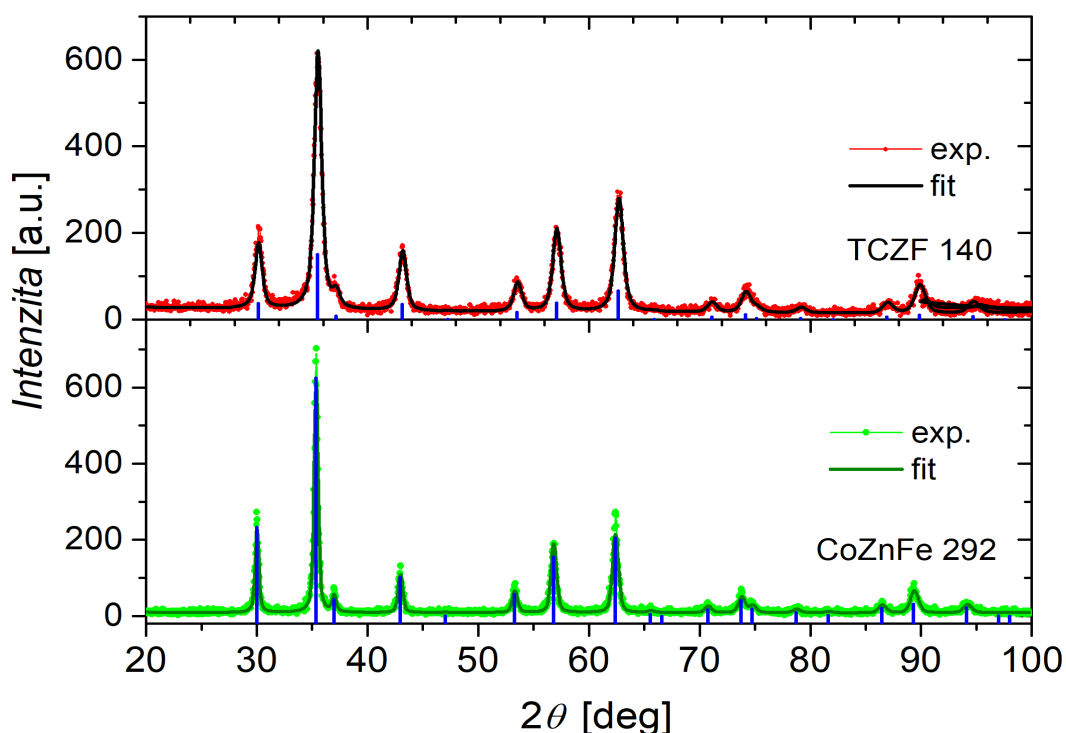
Obr. 9: Hexanová suspenze nanočástic zinkem dopovaného kobaltnatého feritu, jeden z produktů připravených termální dekompozicí.

Tab. 1: Přehled základních vlastností dvou vybraných vzorků feritových jader připravených koprecipitací a termální dekompozicí; d_{XRD} je střední velikost krystalitů určená z rozšíření difrakčních linií, a je mřížkový parametr kubické buňky.

Vzorek	CoZnFe 292	TCZF 140
Příprava	koprecipitace	termální dekompozice
Složení	$\text{Co}_{0,40}\text{Zn}_{0,60}\text{Fe}_2\text{O}_4$	$\text{Co}_{0,33}\text{Zn}_{0,12}\text{Fe}_{2,55}\text{O}_4$
a [Å]	8,4176(5)	8,3797(6)
d_{XRD} [nm]	36	13
Morfologie	těsné klastry tvořené několika krystality, široká distribuce tvarů	monokrystalické částice přibližně kulového tvaru

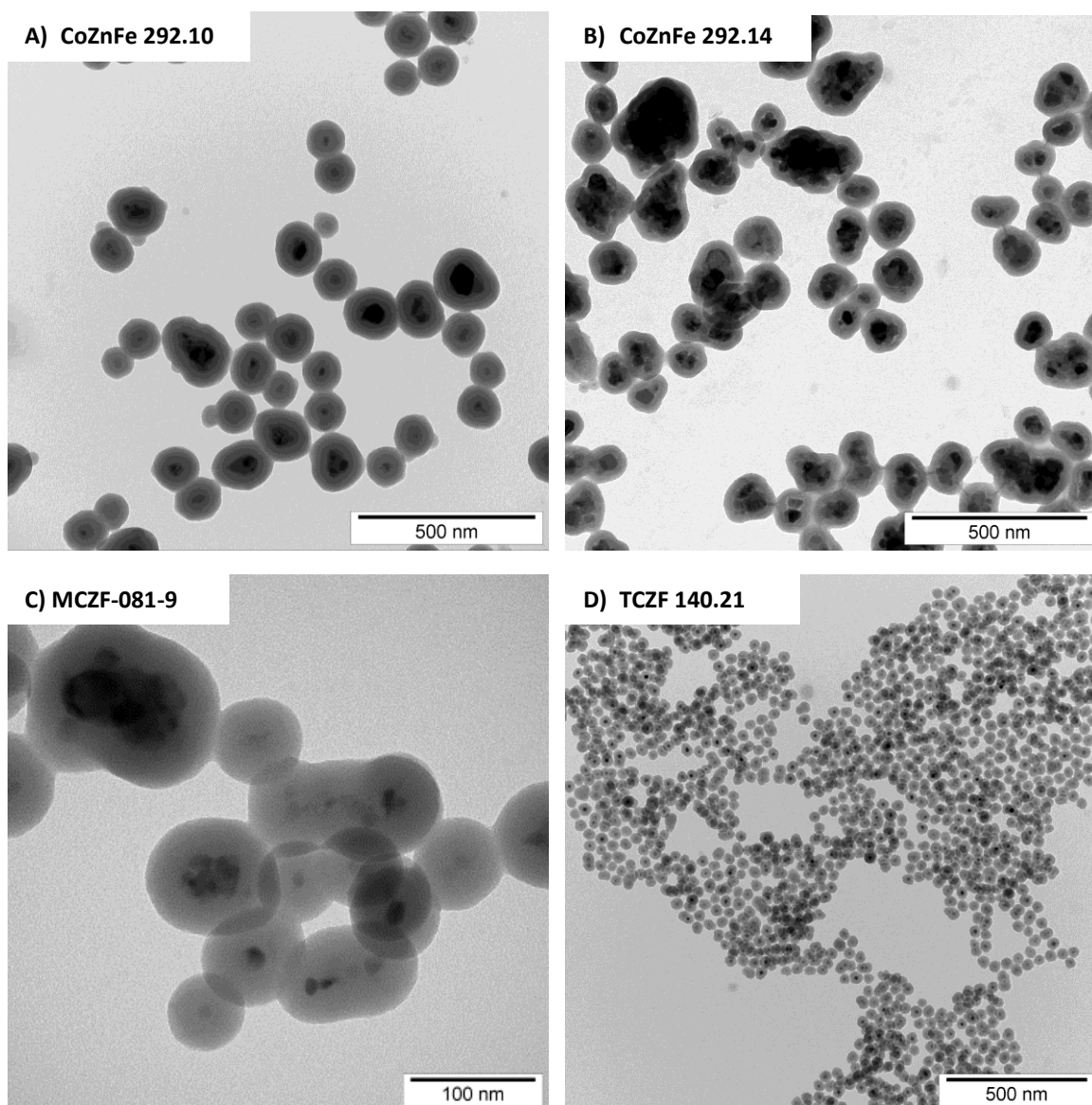
Základní vlastnosti jednotlivých produktů, zejména velikost částic, se lišily v závislosti na zvolené metodě přípravy. Koprecipitace sloužila pro přípravu velkých magnetických jader, zatímco metoda termální dekompozice byla vhodná pro přípravu malých magnetických jader. Studium pomocí transmisní elektronové mikroskopie ukázalo, že produkty jednotlivých metod se lišily nejen velikostí krystalitů, ale i morfologií částic a tvorbou klastrů. Důležitým rozdílem v obou metodách bylo i řízení chemického složení produktu. Zatímco chemické složení feritu získaného koprecipitací již z principu metody odpovídalo výchozímu poměru kovů v reaktantech, u nanočástic z termální dekompozice bylo nutné přesné složení produktu teprve stanovit pomocí XRF analýzy. Přehledné srovnání obou metod přípravy je ukázáno na vlastnostech již výše zmiňovaných vzorků CoZnFe 292 a TCZF 140 v tabulce 1 a podrobnější diskuse je dále.

Graf 1: Práškové rentgenové difraktogramy dvou vybraných vzorků $\text{Co}_y\text{Zn}_z\text{Fe}_{3-y-z}\text{O}_4$: produkt CoZnFe 292 byl připraven koprecipitací a produkt TCZF 140 termální dekompozicí. Experimentální data (exp.) jsou proložena vypočítaným difraktogramem (fit) získaným Rietveldovou metodou. Modré svivlice ukazují difrakce spinelové fáze o symetrii $Fd\bar{3}m$ s danými mřížkovými parametry.



Typickým produktem koprecipitace je jednofázový produkt čistého feritu s poměrně velkou střední velikostí částic, jejichž povrch není nijak chemicky modifikovaný. Samotné částice mají charakter klastrů a jsou složeny z několika navzájem

pospojovaných krystalitů. Střední velikost krystalitů se pohybuje mezi 20 nm až 40 nm, a to v závislosti na teplotě žíhání a mechanickém zpracování (závislost na teplotě žíhání je popsána v literatuře^[51]). Při mechanickém zpracování dochází obecně k poklesu střední velikosti částic. Produkty koprecipitace vykazují obecně poněkud větší velikostní distribuci a morfologickou variabilitu. Takovou různorodost lze do jisté míry potlačit frakcionací koloidně stabilních suspenzí po vhodné povrchové modifikaci.



Obr. 10: Ukázka snímků z TEM. Obrázky A) a C) prezentují nanočástice připravené koprecipitací obalené v silice se zabudovaným derivátem rhodaminu B. Obrázek B) prezentuje nanočástice připravené koprecipitací obalené v silice se zabudovaným fluoresceinem. Obrázek D) prezentuje nanočástice připravené termální dekompozicí obalené v silice se zabudovaným derivátem rhodaminu B. Magnetická jádra nanočástic na obrázcích A), B) a C) jsou v porovnání s magnetickými jádry nanočástic na obrázku D) výrazně větší a morfologicky mnohem variabilnější. Jádra těchto nanočástic mají vzhled klastrů, které jsou tvořeny několika krystalky feritu, zatímco magnetická jádra nanočástic na obrázku D) jsou tvořena jednotlivými krystalky feritu.

Naproti tomu typickým produktem termální dekompozice jsou malá jádra tvořená jednotlivými krystalitami, jež jsou stabilizována prostřednictvím surfaktantů navázaných na jejich povrchu (olejová kyselina a oleylamin). Takové částice vytvářejí stabilní suspenze v nepolárních organických rozpouštědlech (viz obr. 9). Střední velikost krystalitů se pohybuje v závislosti na zvoleném postupu mezi 10 nm až 20 nm. Produkty termální dekompozice vykazují velmi úzkou velikostní distribuci a nízkou morfologickou variabilitu. Chemické složení produktu termální dekompozice však nemusí odpovídat stechiometrickému poměru kovů v reaktantech. Konkrétně u připraveného vzorku TCZF 140 bylo skutečné složení produktu $\text{Co}_{0,33}\text{Zn}_{0,12}\text{Fe}_{2,55}\text{O}_4$, i když poměr Co : Zn : Fe ve výchozí směsi činil 0,4 : 0,6 : 2.

Výše uvedené rozdíly ve velikosti a morfologii částic připravených koprecipitací a termální dekompozicí jsou velmi dobře patrné na snímcích pořízených transmisí elektronovou mikroskopií (viz obr. 10), kde jsou pro větší názornost ukázány obalené produkty, u kterých je potlačena agregace jader, což usnadňuje hodnocení jejich velikosti i morfologie. Dodejme, že snímky ukazují hlavní produkty, jež byly připraveny a dále používány v rámci této diplomové práce pro další charakterizace, studium relaxivity a biologické experimenty.

7.2. Stabilizace feritových nanočástic ve vodné suspenzi

Vlastní magnetická jádra, získaná koprecipitací či termální dekompozicí, nelze vzhledem k jejich vlastnostem přímo použít pro navazující biologické experimenty na buněčných kulturách. Z toho důvodu byly zkoumány různé způsoby povrchových úprav, které by primárně zajistily stabilitu nanočástic ve vodné fázi, ale současně by zajistily také ochranu buněk před případným uvolňováním kovových iontů (Zn^{2+} , Co^{2+} či Fe^{3+}) z jader, jež jsou pro buňky toxické.

Určitý problém představují zejména nanočástice připravené termální dekompozicí, které mají na svém povrchu navázané surfaktantů, a to konkrétně olejovou kyselinu a oleylamin, jež byly použity v samotné přípravě. Tyto surfaktanty tvoří tenkou hydrofobní vrstvičku, díky níž jsou jádra stabilní v organické fázi. Zpočátku se jako optimální řešení vedoucí ke stabilní vodné suspenzi nanočástic zdálo použití takzvané ligandové výměny surfaktantů. Náhrada surfaktantů za vhodný ligand, v našem případě

konkrétně za hydrofilní *meso*-2,3-dimerkaptojantarovou kyselinu (DMSA) umožňuje stabilizaci jader ve vodné fázi.^[43]

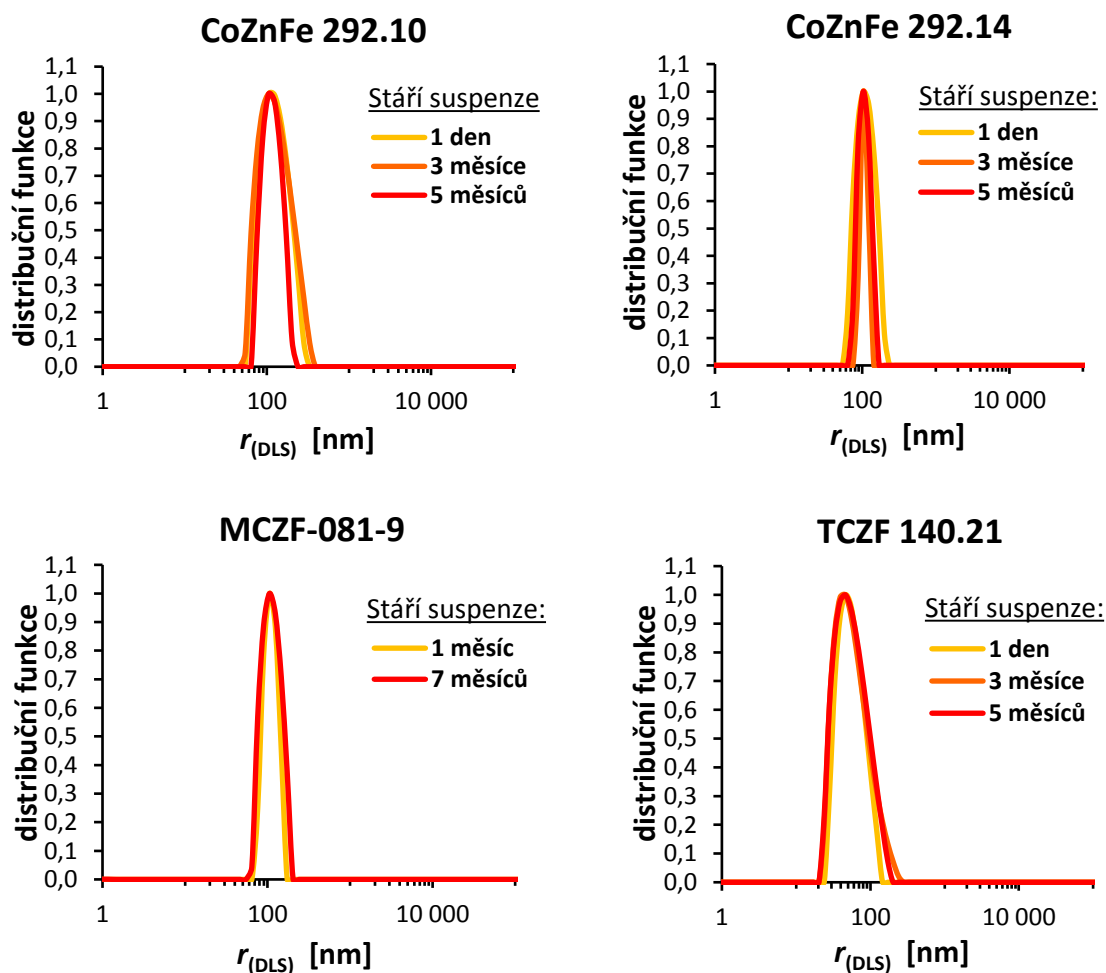
V rámci experimentální práce bylo testováno několik postupů, aby se s co nejlepším výsledkem získaly částice hydrofilní a koloidně stabilní ve vodných suspenzích. Nicméně tato povrchová úprava se z dlouhodobého hlediska ukázala jako neperspektivní. S ohledem na biologické experimenty bylo totiž pH vodných suspenzí získaných ligandovou výměnou upravováno na hodnotu blízkou hodnotě fyziologického pH. Takto upravené vodné suspenze však zpravidla nevydržely být koloidně stabilní déle než 14 dní. Po této době došlo k agregaci nanočástic a ke kompletní sedimentaci na dno zkumavek (viz obr. 11).



Obr. 11: Ukázka vodných suspenzí nanočástic, jejichž povrch byl upraven ligandovou výměnou. Zkumavka vlevo reprezentuje stabilní suspenzi nanočástic. Naproti tomu zbylé dvě zkumavky reprezentují suspenze, u nichž po několika dnech došlo k destabilizaci a k následné sedimentaci nanočástic na dno zkumavek.

Z tohoto důvodu bylo od ligandové výměny upuštěno a další kroky ve studiu multimodálních nanočástic směřovaly k povrchové úpravě magnetických jader pomocí enkapsulace do amorfního hydratovaného oxidu křemičitého (siliky). Tento typ povrchové úpravy byl již dříve úspěšně využit například pro nanočástice $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ se strukturou perovskitu^[45, 46] Na základě těchto výsledků byl předpokládán úspěch enkapsulace do křemičitého obalu také u jader spinelového typu. Mezi výhody plynoucí z tohoto typu obalového materiálu bezesporu patří dlouhodobý efekt stabilizace nanočástic ve vodné fázi (při hodnotách fyziologického pH), biologicky inertní charakter obalu a jeho snadná kovalentní modifikace například pomocí fluorescentních molekul. Nanočástice zinkem dopovaného kobaltnatého feritu enkapsulované do siliky vykazovaly stabilitu ve vodné fázi po dlouhé měsíce, což bylo možné pozorovat jednak vizuálně (nanočástice byly ve vznosu, nikoli sedimentované na dně) ale také pomocí měření dynamického rozptylu světla (DLS), viz graf 2.

Graf 2: Distribuce hydrodynamické velikosti fluorescenčně značených nanočástic změřená v různé době od jejich přípravy. Z grafů je patrné, že jednotlivé suspenze zůstávají koloidně stabilní a současně je u nich zachována distribuce hydrodynamické velikosti. Případná destabilizace by se projevila rozštěpením píku a posunem distribuce k větším poloměrům, event. neopakovatelností DLS měření. Produkty: CoZnFe 292.10 a MCZF-081-9 (nanočástice připravené koprecipitací obalené v silice se zabudovaným fluorescenčním derivátem rhodaminu B); CoZnFe 292.14 (nanočástice připravené koprecipitací obalené v silice se zabudovaným fluoresceinem); TCZF 140.21 (nanočástice připravené termální dekompozicí obalené v silice se zabudovaným derivátem rhodaminu B).



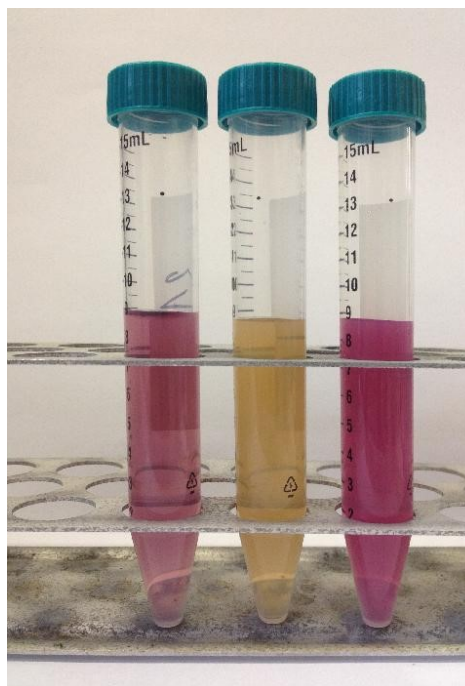
Z hlediska použití nanočástic v biologických experimentech by bylo zajímavé sledovat z dlouhodobého měřítka stabilitu těchto nanočástic v běžně používaných médiích, viz například výsledky uvedené v práci.^[52]

7.3. Feritové nanočástice obalené fluorescentně značenou silikou

Zvládnutí syntézy magnetických jader a jejich obalování silikou dovolilo přistoupit k dalšímu syntetickému kroku, a to k zabudování fluorescenční sondy do křemičitého obalu. Zabudování fluoroforu rozšiřuje možnosti použití takto připravených nanočástic, především pak umožňuje jejich sledování v živých systémech. Jak již bylo zmíněno dříve, fluorescentní silikové obaly byly obecně připravovány jako dvouvrstevné, kdy první vrstva obsahovala fluorofor, zatímco druhá ochranná vrstva byla tvořena čistou silikou (tato architektura je podrobně popsána v práci^[53]).

V rámci diplomové práce byly připraveny a dále studovány následující suspenze nanočástic s těmito pracovními názvy: **MCZF-081-9** a **CoZnFe 292.10** (VČ neboli velké červené

nanočástice), což jsou nanočástice s velkými magnetickými jádry připravenými koprecipitací, která jsou obalená v silice se zabudovaným piperazinovým derivátem rhodaminu B. **CoZnFe 292.14** (VZ neboli velké zelené nanočástice) jsou nanočástice s velkými magnetickými jádry připravenými koprecipitací, která jsou obalená v silice se zabudovaným fluoresceinem. **TCZF 140.21** (MČ neboli malé červené nanočástice) jsou nanočástice s malými magnetickými jádry připravenými termální dekompozicí, která jsou obalená v silice se zabudovaným piperazinovým derivátem rhodaminu B. Základní vlastnosti jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce 2, po níž následuje krátké shrnutí.



Obr. 12: Nanočástice stabilizované ve vodné suspenzi obsahující ve svém vnějším obalu některý z fluoroforů. Zleva suspenze TCZF 140.21 (MČ), CoZnFe 292.14 (VZ) a CoZnFe 292.10 (VČ). Koncentrace připravených suspenzí nanočástic: 0,04 mg magnetických jader na 1 ml suspenze.

Tab. 2: Přehled základních vlastností suspenzí nanočástic, které byly dále použity v dalším studiu: $d_{\text{(silika)}}$ je tloušťka silikové vrstvy dle TEM a $r_{\text{(DLS)}}$ je hydrodynamický poloměr určený DLS.

Použité zkratky a symboly: VČ (velké červené nanočástice), VZ (velké zelené nanočástice), MČ (malé červené nanočástice), CZF (složení jádra, kde C je kobalt, Z je zinek a F je železo), @si (křemičitý obal), @si-Rho (křemičitý obal se zabudovaným piperazinovým derivátem rhodaminu B) a @si-F (křemičitý obal se zabudovaným fluoresceinem).

SUSPENZE NANOČÁSTIC (značení)	CoZnFe 292.10 (VČ)	CoZnFe 292.14 (VZ)	MCZF-081-9 (VČ)	TCZF 140.21 (MČ)
Složení jader	$\text{Co}_{0,40}\text{Zn}_{0,60}\text{Fe}_2\text{O}_4$	$\text{Co}_{0,40}\text{Zn}_{0,60}\text{Fe}_2\text{O}_4$	$\text{Co}_{0,50}\text{Zn}_{0,50}\text{Fe}_2\text{O}_4$	$\text{Co}_{0,33}\text{Zn}_{0,12}\text{Fe}_{2,55}\text{O}_4$
Typ obalu	CZF@si-Rho@si	CZF@si-F@si	CZF@si-Rho@si	CZF@si-Rho@si
$d_{\text{(silika)}}$ [nm]	45	25	30	13
$r_{\text{(DLS)}}$ [nm]	120	110	110	55

Všechny obalené produkty byly koloidně stabilní ve vodě (viz výše) a střední hodnota jejich hydrodynamického poloměru se v případě částic s koprecipitačními jádry pohybuje kolem 110 nm až 120 nm, zatímco u částic s jádry z termální dekompozice je zhruba poloviční. Transmisní elektronové snímky těchto produktů jsou ukázány na obr. 10. Obecně lze říci, že mikroskopie ukázala poměrně širokou distribuci velikostí u produktů s koprecipitačními jádry a úzkou distribuci u produktu s jádry z termální dekompozice, což odráží charakter vlastních jader. Samotná siliková vrstva tvoří ve všech případech souvislý obal s hladkým povrchem.

K velikosti nanočástic dodejme ještě, že hydrodynamickou velikost není snadné přímo srovnávat s velikostí částic dle TEM, protože hydrodynamická velikost je určena z pohybu částic ve vodě, a tak zahrnuje i vrstvičku vody vázanou na částice, která se s nimi pohybuje. Kromě toho se v DLS může uplatnit i vícenásobný rozptyl. Hydrodynamická velikost částic je proto typicky vždy větší.

Nanočástice Co-Zn feritu připravené koprecipitací, ale i produkty termální dekompozice, mají obecně hnědo-černou barvu. Podobné optické vlastnosti vykazují také suspenze těchto nanočástic, jejichž povrch byl upraven ligandovou výměnou (viz obr. 11) nebo je pokryt silikou. Odstín této barvy závisí především na velikosti částic. Zcela odlišné vizuální vlastnosti pak vykazují suspenze nanočástic, do jejichž křemičitého obalu byla zabudována fluorescenční sonda. Nanočástice, do jejichž křemičitého obalu byl zabudován piperazinový derivát rhodaminu B, mají obecně růžovou barvu.

Nanočástice, jejichž jádra byla připravena koprecipitací, a do jejichž křemičitého obalu byl zabudován fluorescein, mají zelenohnědou barvu (viz obr. 12).

7.4. Testy viability

Nejenže nanočástice obalené vrstvou siliky vykazují dlouhodobou stabilitu ve vodné fázi, ale jsou mimo jiné také velmi biokompatibilní. Výhodou takto povrchově upravených nanočástic je fakt, že oxid křemičitý je poměrně inertní sloučenina, která podléhá korozi (naleptání/rozpuštění) pouze v silně alkalickém prostředí.

Volné kovové ionty s výjimkou biogenních prvků a rozličné fluorescenční sondy jsou pro buňky většinou vysoce toxické. Typické fluorofory jsou komplexní organické látky, které ve své struktuře obsahují kondenzovaná aromatická jádra, na něž jsou navázány specifické funkční skupiny. Tyto látky jsou většinou citlivé a reaktivní a velmi snadno degradují. Hrozí zde reálné riziko, že by v případě inkubace nanočástic s buňkami mohlo docházet k vymývání zabudovaného fluoroforu do buněčného média a také k degradaci fluoroforu navázaného na povrchu částic. Současně by hydrofóbní molekuly fluoroforu negativně ovlivňovaly koloidní stabilitu nanočástic ve vodném prostředí. Z tohoto důvodu byla zvolena strategie dvojitého obalování nanočástic do siliky. První vrstva křemičitého obalu chrání buňky před případným uvolňováním kovových iontů z vlastních magnetických jader a obsahuje kovalentně navázané fluorescentní molekuly, zatímco druhá vrstva křemičitého obalu chrání buňky před vymýváním zabudovaných molekul fluoroforu. Na základě výše zmíněných vlastností oxidu křemičitého byla očekávána nízká míra toxicity u buněčných kultur inkubovaných s nanočásticemi s tímto typem povrchové úpravy. Výsledky testů viability prezentující míru toxicity fluorescenčně značených produktů nanočástic (CoZnFe 292.10, CoZnFe 292.14 a TCZF 140.21) na různé linie suspenzních buněk (Jurkat, HL-60 a COLO-320) ukazují grafy 3, 4 a 5.

Z grafů je možné usoudit, že připravené fluorescenční nanočástice vykazují nízkou míru toxicity. Procenta přeživších buněk inkubovaných při různých koncentracích nanočástic se výrazně neliší vzhledem k procentům přeživších buněk v rámci kontrolních skupin. Viabilita buněčných linií Jurkat a HL-60 se pohybuje výrazně nad hranicí 70 % u buněk inkubovaných s nanočásticemi včetně buněk kontrolních skupin. Podobně je na tom i buněčná linie COLO-320, kde viabilita ve většině případů dosahuje

70 %, a to jak u buněk inkubovaných s nanočásticemi, tak i u buněk kontrolních skupin. Na velikost chybových úseček může mít vliv aktuální kondice buněk použitých k inkubaci v rámci jednotlivých experimentů. Dále zde mohly sehrát roli i faktory související se zpracováním buněk před vlastním měřením na průtokovém cytometru, jako je např. náhodný výběr buněk (400 μ l suspenze buněk z celkového objemu dané kultivační jamky), manipulace s buňkami (centrifugace) a doba spojená s jejich zpracováním předcházející vlastnímu měření.

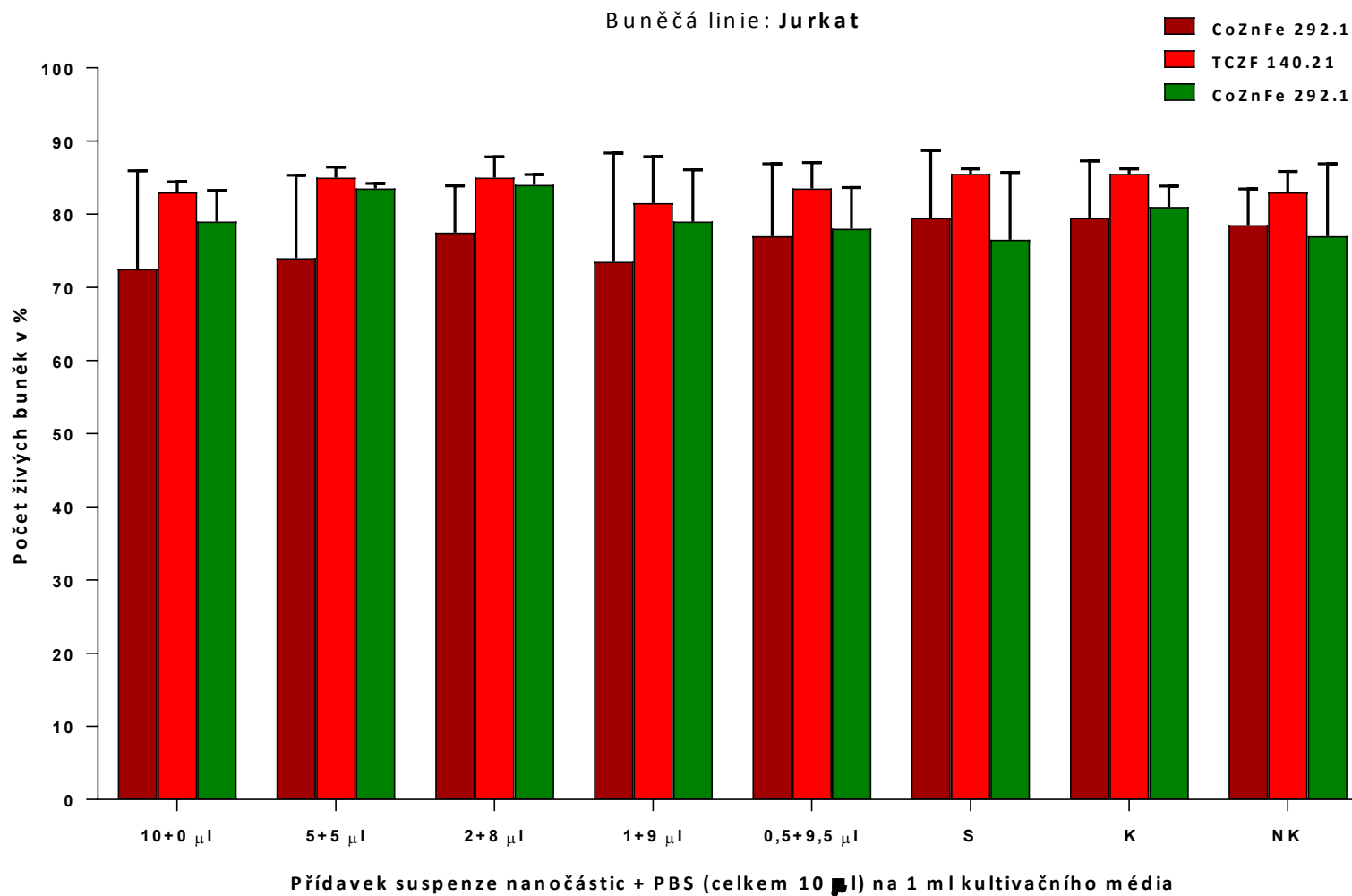
Nízká míra toxicity fluorescenčně značených feritových nanočástic byla publikována také v práci (Hwang et al., 2012). V tomto případě byla buněčná linie Hep3B (buňky lidského hepatokarcinomu) inkubována s nanočásticemi kobaltnatého feritu obalenými v silice (s napojenými molekulami PEGu a aminovými skupinami, a se zabudovaným fluorescenčním derivátem rhodaminu B). Buňky byly s nanočásticemi inkubovány po dobu 72 hodin. Koncentrace nanočástic činila 1 μ g až 20 μ g magnetických jader na 1 ml suspenze nanočástic. Toxicita byla vyhodnocena metodou ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) na základě kolorimetrického stanovení MTT (bromid 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolia). Z výsledků této práce je patrné, že ve všech případech buňky dosahovaly velmi vysokých hodnot viability (více jak 80%).^[54]

Jako nepřímě prováděné testy viability můžeme uvažovat také inkubace buněčných linií HeLa a Cyril (s výše uvedenými fluorescenčně značenými nanočásticemi) spojené s přípravou vzorků pro fluorescenční a transmisní elektronovou mikroskopii. V těchto případech byly buňky inkubovány s nanočásticemi při mnohem větších objemových množstvích nanočástic (100 μ l suspenze nanočástic, což odpovídá 4 μ g magnetických jader na 1 ml média) po dobu 24 až 48 hodin. V průběhu inkubace byla kondice buněk vizuálně kontrolována pomocí optického mikroskopu, přičemž tyto vizuální kontroly neprokázaly v žádném z případů zvýšenou míru úmrtnosti buněk, a to ani v případě linie Cyril, která je velmi citlivá na změny v kultivačním médiu.

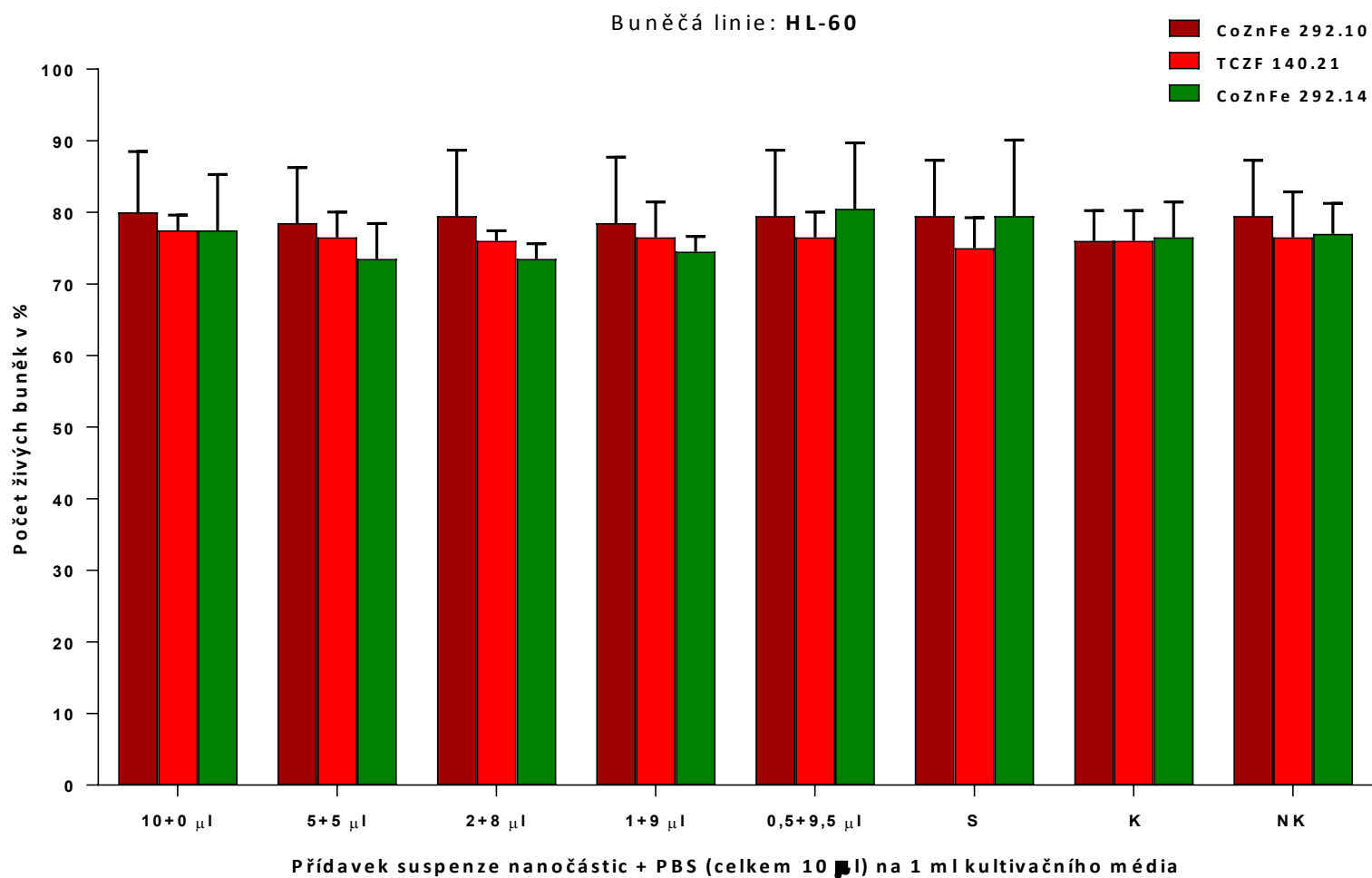
Z hlediska dalšího potenciálního využití připravených fluorescenčních nanočástic zinkem dopovaného kobaltnatého feritu v biologických experimentech by bylo zajímavé provést testy viability, kdy by buňky byly inkubovány s výrazně vyššími koncentracemi suspenzí nanočástic, případně i po delší dobu, než je standardně používaných 48 hodin.

Závěrem lze říci, že siliku je možné považovat za vysoce biokompatibilní obalový materiál, který je pro buňky téměř netoxický, a zároveň plní ochrannou funkci před nežádoucím uvolňováním iontů a nejrozumnějších molekul, ze kterých jsou multimodální nanočástice složeny.

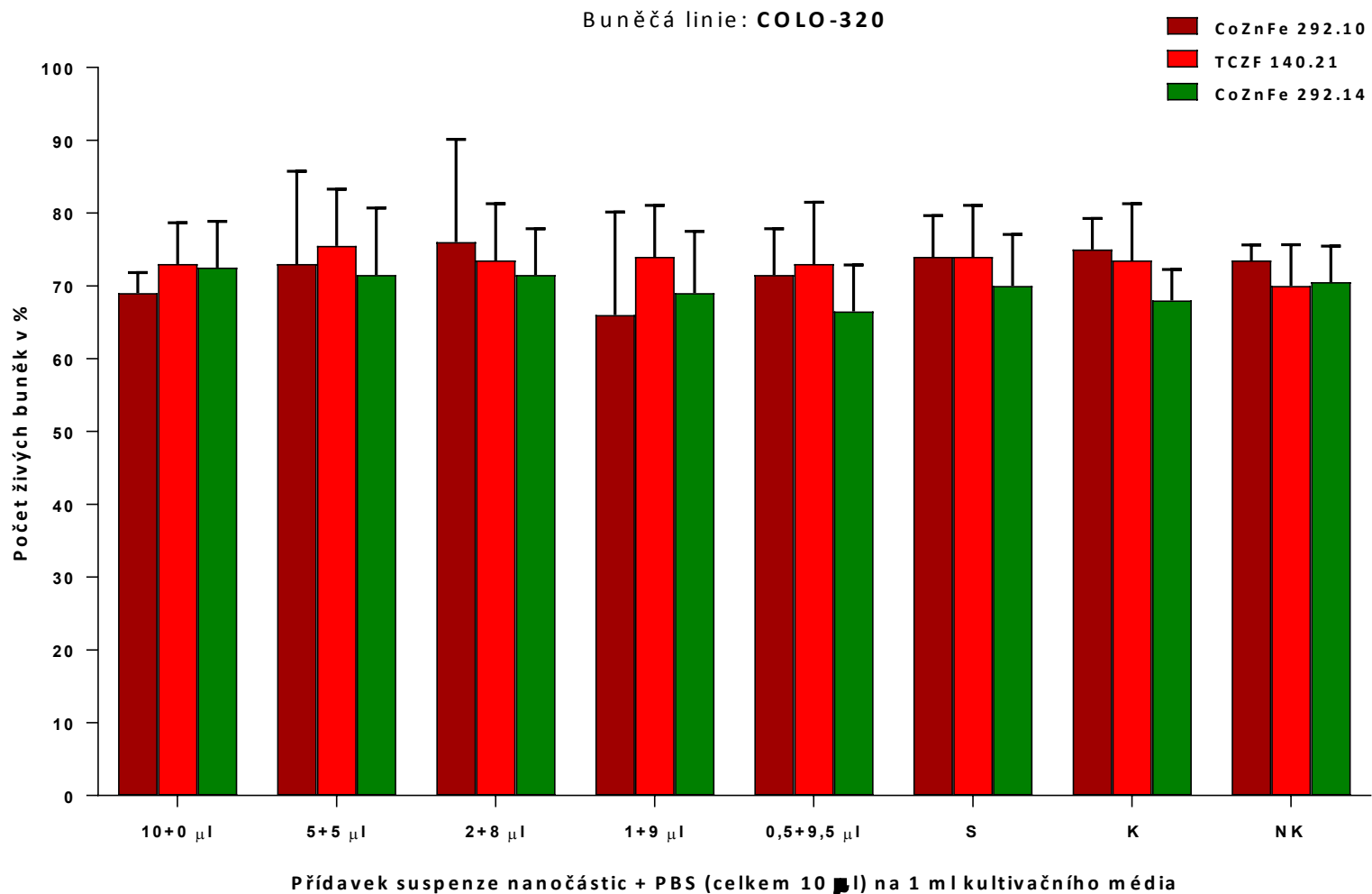
Graf 3: Testy viability buněčné linie Jurkat, která byla inkubována s nanočásticemi CoZnFe 292.10, CoZnFe 292.14 a TCZF 140.21 při různých přídavcích suspenze nanočástic. Koncentrace výchozích suspenzí nanočástic: 0,04 mg/ml. Zkratky: S je kontrola, kdy k buňkám bylo přidáno 10 μ l supernatantu po odstředění nanočástic; K = kontrola, kdy k buňkám bylo přidáno 10 μ l PBS; NK = negativní kontrola (bez přídavku jakýchkoli dalších látek).



Graf 4: Testy viability buněčné linie HL-60, která byla inkubována s nanočásticemi CoZnFe 292.10, CoZnFe 292.14 a TCZF 140.21 při různých přídavcích suspenze nanočástic. Koncentrace výchozích suspenzí nanočástic: 0,04 mg/ml. Zkratky: S je kontrola, kdy k buňkám bylo přidáno 10 μ l supernatantu po odstředění nanočástic; K = kontrola, kdy k buňkám bylo přidáno 10 μ l PBS; NK = negativní kontrola (bez přídavku jakýchkoli dalších látek).



Graf 5: Testy viability buněčné linie COLO-320, která byla inkubována s nanočásticemi CoZnFe 292.10, CoZnFe 292.14 a TCZF 140.21 při různých přídavcích suspenze nanočástic. Koncentrace výchozích suspenzí nanočástic: 0,04 mg/ml. Zkratky: S je kontrola, kdy k buňkám bylo přidáno 10 μ l supernatantu po odstředění nanočástic; K = kontrola, kdy k buňkám bylo přidáno 10 μ l PBS; NK = negativní kontrola (bez přídavku jakýchkoli dalších látek).



7.5. Magnetické vlastnosti

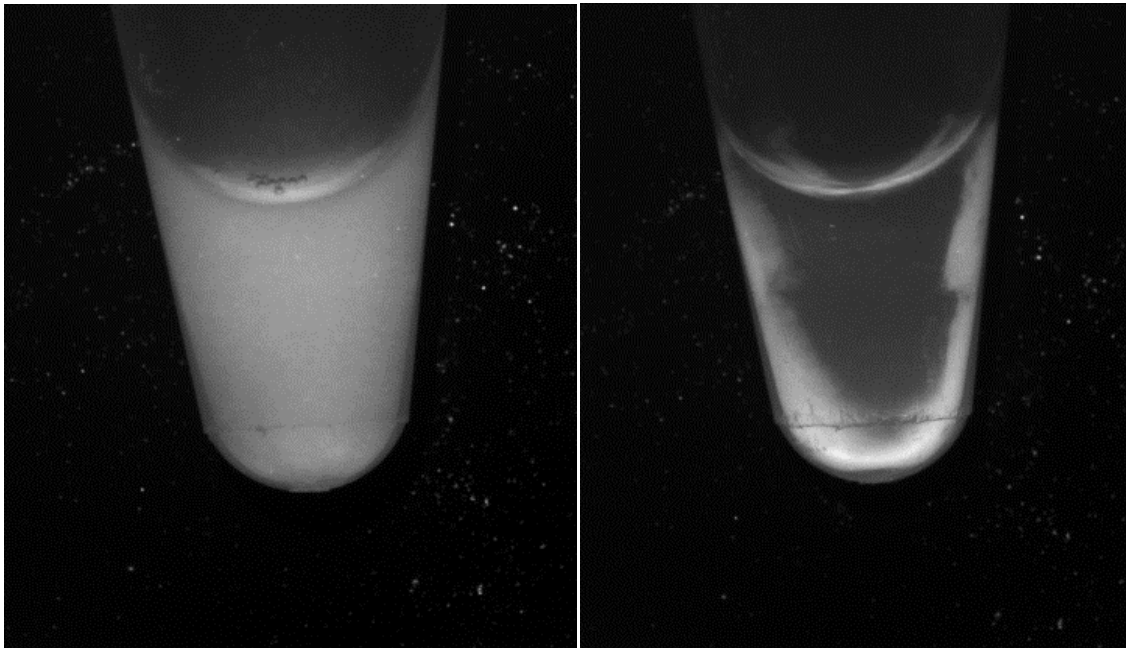
Magnetické vlastnosti neobalených nanočástic Co-Zn feritu byly studovány pomocí SQUID magnetometrie. Hysterezní smyčky neobalených magnetických jader, jež byly získány při teplotách 5 K a 300 K, jsou prezentovány níže (viz graf 6). Tyto smyčky odrážejí ferrimagnetické uspořádání obou studovaných vzorků, ale bezhysterezní průběh $M-H$ závislosti při 300 K upomíná na přítomnost superparamagnetického režimu za pokojové teploty.

Nízkoteplotní hysterezní smyčka velkých jader $\text{Co}_{0,4}\text{Zn}_{0,6}\text{Fe}_2\text{O}_4$ připravených koprecipitací (vzorek CoZnFe 292) je charakterizována koercivitou 250 kA/m a magnetizací 108 Am^2/kg v poli 3 T. Naproti tomu hysterezní smyčka malých jader o složení $\text{Co}_{0,33}\text{Zn}_{0,12}\text{Fe}_{2,55}\text{O}_4$ připravených termální dekompozicí vykazuje při 5 K výrazně vyšší koercivitu 1070 kA/m a nižší magnetizaci 69 Am^2/kg . Rozdíly v magnetizaci i koercivitě mezi oběma vzorky jsou dané především rozdílným chemickým složením. U velkých částic se zejména projevil vyšší obsah kationtů Zn^{2+} , které preferují tetraedrické polohy.

Absence hystereze při pokojové teplotě u nanočástic Co-Zn feritu je známkou superparamagnetického stavu, kdy probíhá tzv. Néelova relaxace.^[55] Z hlediska časového okna magnetometrického měření nemají tyto částice remanentní magnetický moment a mají nulovou koercivitu. Výraznější pokles magnetizace u velkých částic $\text{Co}_{0,4}\text{Zn}_{0,6}\text{Fe}_2\text{O}_4$ při pokojové teplotě ve srovnání s nízkoteplotními daty a vzorkem malých částic $\text{Co}_{0,33}\text{Zn}_{0,12}\text{Fe}_{2,55}\text{O}_4$ (viz graf 6) souvisí rovněž s vyšším obsahem zinku, ale i přesto je magnetizace tohoto materiálu dostatečně vysoká pro předpokládané aplikace.

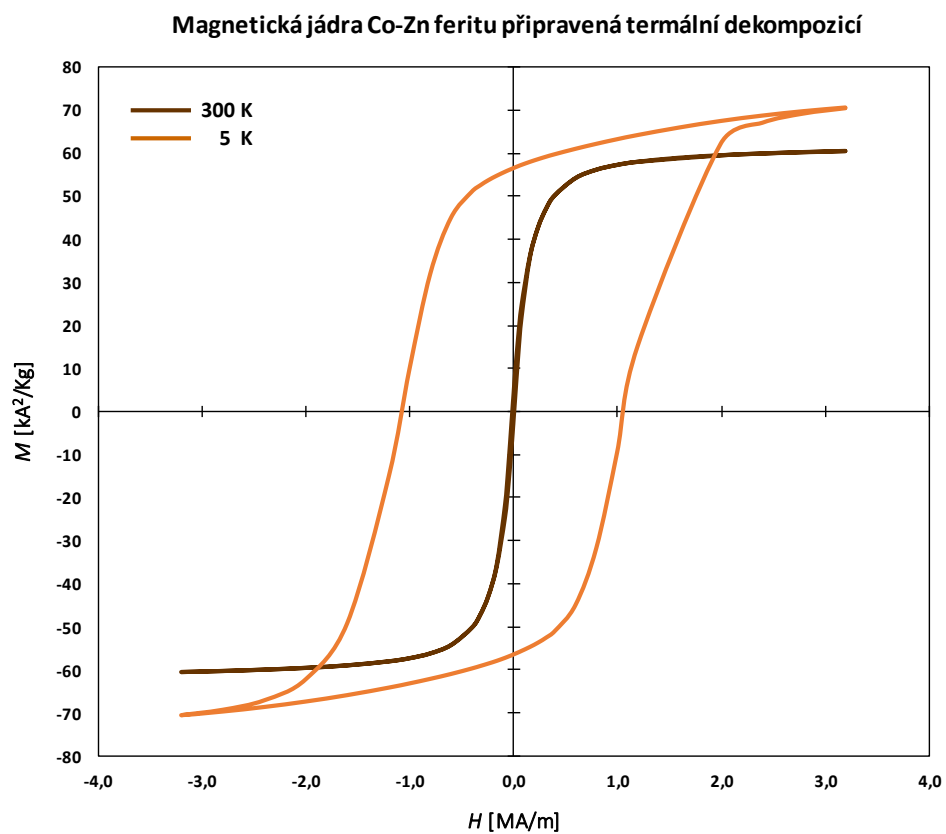
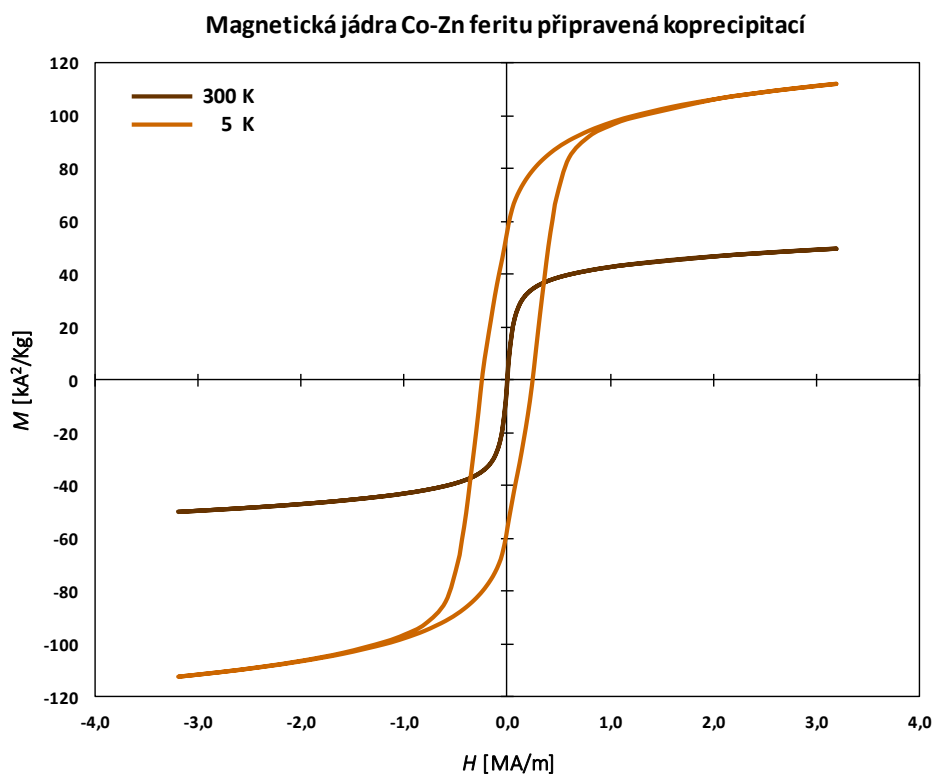
Magnetické vlastnosti připravených produktů a úspěšné značení buněk byly také ověřeny pomocí jednoduchého experimentu s využitím permanentního magnetu. Mikrozkušavka eppendorf s rozptýlenou suspenzí magneticky značených HeLa buněk (buňky byly předem inkubovány s nanočásticemi CoZnFe 292.10 po dobu 48 hodin), viz obr. 13 vlevo, byla vložena mezi dva permanentní magnety. Vlivem působení gradientu externího magnetického pole došlo k přesunu buněk označených nanočásticemi směrem k magnetům umístěným po stranách mikrozkušavky (viz obr. 13 vpravo). Odstraněním magnetů a jemným zatřesením mikrozkušavkou bylo možné

buňky opět snadno rozptýlit. Separace buněk ze suspence byla umožněna působením magnetické síly \vec{F}_m , kterou lze pro bodový magnetický dipól \vec{m} zapsat pomocí vektorového vztahu $\vec{F}_m = (\vec{m} \cdot \nabla)\vec{B}$, kde \vec{B} je indukce magnetického pole působícího na daný dipól. Magnetický moment částice je přímo úměrný hmotnosti, resp. objemu magnetické částice, což zdůvodňuje, proč byl popsán pokus proveden s velkými částicemi z koprecipitace.



Obr. 13: Snímek z fluorescenční binolupy (zvětšení objektivu 0,8x): vlevo mikrozkuhavka eppendorf s rozptýlenou suspenzí HeLa buněk inkubovaných s nanočásticemi CoZnFe 292.10 před použitím magnetu; vpravo je tatáž mikrozkuhavka s HeLa buňkami po vložení mezi dva permanentní magnety.

Graf 6: Hysterezní smyčky magnetických jader zinkem dopovaného kobaltnatého feritu při teplotách 5 K a 300 K, kde H je intenzita magnetické pole a M je specifická magnetizace.



7.6. Relaxivita, MRI vlastnosti

Relaxivity vybraných suspenzí fluorescenčně značených nanočástic byly měřeny v Institutu klinické a experimentální medicíny na relaxometru s magnetickým polem 0,5 T v rozsahu teplot od 4°C až do 60°C s intervalem ohřívání přibližně 1°C za půl minuty. Naměřené hodnoty byly pro jednotlivé produkty vyneseny do grafů (viz graf 7) jako závislost transversální relaxivity r_2 na teplotě t .

Z grafů je patrné, že nanočástice s velkými magnetickými jádry (CoZnFe 292.10 a CoZnFe 292.14) dosahují mnohem vyšších hodnot relaxivity oproti nanočásticím s malými magnetickými jádry (TCZF 140.21). Tyto rozdíly jsou dány velikostí magnetických jader, neboť větší jádra (připravená koprecipitací) mají větší hodnoty magnetického momentu, a tak vytvářejí výraznější nehomogenity vnějšího magnetického pole, na jejichž působení je kontrastní efekt založen.

Zajímavá je závislost transversální relaxivity na teplotě, která je u všech studovaných vzorků velice výrazná, ale jejíž průběh se zjevně liší pro oba typy magnetických jader. Teoretický rozbor transversální relaxivity v závislosti na základních vlastnostech magnetických částic, jako je jejich velikost a magnetizace, ale i v závislosti na transportních procesech ve vodné suspensi, které relaxivitu ovlivňují, jako je difúze molekul vody, je poměrně komplikovaný, avšak existující teorie obecně zavádějí představu tří různých režimů, v nichž magnetické nanočástice transversální relaxaci indukují. Základní náhled do této problematiky poskytuje literatura^[56]. Ve vztahu k teplotní závislosti jsou pak tyto režimy analyzovány v práci^[57], kde je také proveden rozbor teplotní závislosti r_2 pro magnetické nanočástice různých materiálů a různých velikostí.

V návaznost na citované práce a bez podrobnějšího výkladu dále uvedme, že malé feritové částice (TCZF 140.21) působí v tzv. režimu MAR (*motional averaging regime*) a že dominantním faktorem, který určuje teplotní závislost jejich transversální relaxivity, je teplotní závislost difúzního koeficientu vody. Závislost difúzního koeficientu vody D lze dobře popsat například pomocí Speedy-Angelova přístupu $D(T) = D_0[(T/T_S) - 1]^{\nu}$, kde T je absolutní teplota, a kde vystupují dvě empirické konstanty $D_0 = 1,635 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ a $T_S = 215 \text{ K}$.^[58] Transverzální relaxivita v režimu MAR je pak nepřímo úměrná difúznímu koeficientu vody ($r_2(\text{MAR}) \propto M/D$). S ohledem na velikost koprecipitačních částic (vzorky na bázi CoZnFe 292) a průběh teplotní závislosti relaxivity lze předpokládat, že

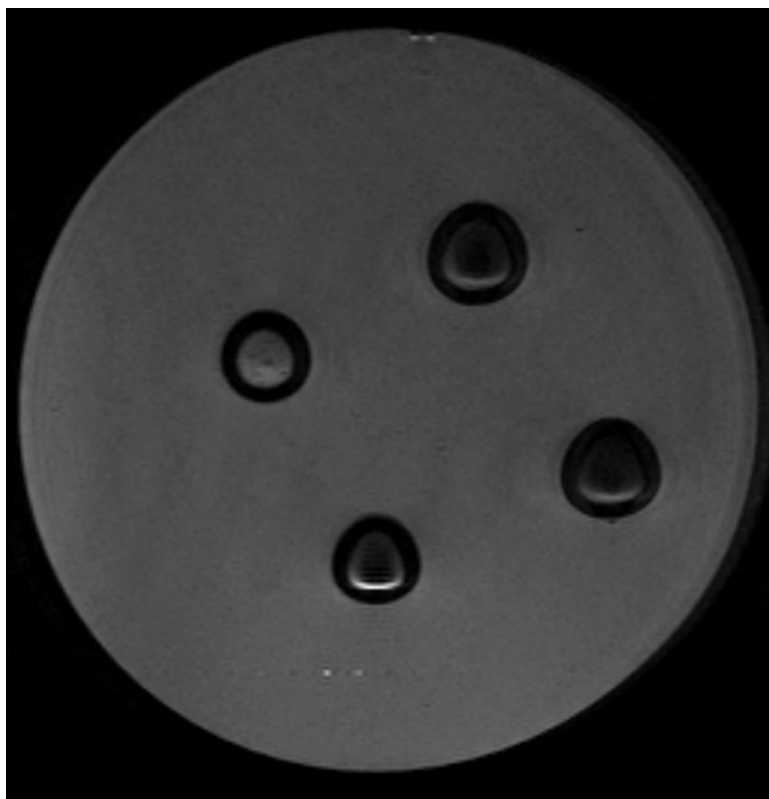
alespoň určitý podíl těchto částic se blíží tzv. režimu SDL (*static dephasing limit*), pro který je transversální relaxivita nezávislá na difuzním koeficientu vody a odráží jen teplotní závislost magnetizace samotných jader ($R_2(SDL) \approx R_2^*(SDL) \propto M$). Nicméně s ohledem na velikostní distribuci koprecipitačních částic se v experimentální teplotní závislosti projevuje i jemná frakce těchto částic, pro kterou je relevantní popis v režimu MAR.

Vezmeme-li do úvahy teploty (25°C až 37°C), při nichž standardně dochází k měření relaxivit a MRI obrazu, ať už v klinické či experimentální praxi, vykazují produkty s velkými magnetickými jádry (CoZnFe 292.10 a 292.14) výrazně vyšší hodnoty relaxivity oproti nanočásticím, které se dnes v klinické praxi běžně používají jako T_2 kontrastní látky (viz tabulka 3). Hodnota relaxivity nanočástic s malými magnetickými jádry (TCZF 140.21) odpovídá hodnotám relaxivity u podobně velkých komerčně používaných nanočástic.

Negativní T_2 kontrast byl také ověřen pomocí experimentálního tomografu s magnetickým polem 4,7 T (v IKEMu). Jako vzorek posloužily skleněné kapiláry do bodotávku s peletkami zafixovaných HeLa buněk, jež byly inkubovány s vybranými produkty: TCZF 140.21 (nanočástice s malými magnetickými jádry enkapsulované do siliky se zabudovaným fluorescenčním derivátem rhodaminu B), CoZnFe 292.10 (nanočástice s velkými magnetickými jádry enkapsulované do siliky se zabudovaným fluorescenčním derivátem rhodaminu B), ale také vzorek MK-178-24 (magnetické nanočástice perovskitové fáze o složení $\text{La}_{0.63}\text{Sr}_{0.37}\text{MnO}_3$, enkapsulované do křemičitého obalu se zabudovaným piperazinovým derivátem rhodaminu B, poskytnuté Michalem Kačenkou). Kapiláry byly postaveny do Petriho misky a zality želatinou. Na výsledném MRI snímku (viz obr. 14) je patrné, že všechny typy použitých nanočástic vykazují výrazný T_2 kontrast v porovnání s kontrolou (kapilárou s peletkou zafixovaných HeLa buněk bez nanočástic) a pozadím vzorků (želatinou v Petriho misce).

Vzhledem k vysokým hodnotám transversálních relaxivit a výraznému negativnímu kontrastu by bylo možné připravené produkty fluorescenčně značených nanočástic zinkem dopovaného kobaltnatého feritu využívat v praxi jako T_2 kontrastní látky pro MRI a to zejména pro vysoce citlivé značení buněk. Značení buněk pomocí magnetických nanočástic a jejich vizualizace prostřednictvím MRI nabízí značné možnosti v regenerativní medicíně. S využitím vysoce účinných kontrastních látek se dají

označit například kmenové buňky, které lze po transplantaci sledovat *in vivo* pomocí MRI, lze vyhodnotit jejich lokalizaci, zda se například uplatňují v místě léze apod.^[59]

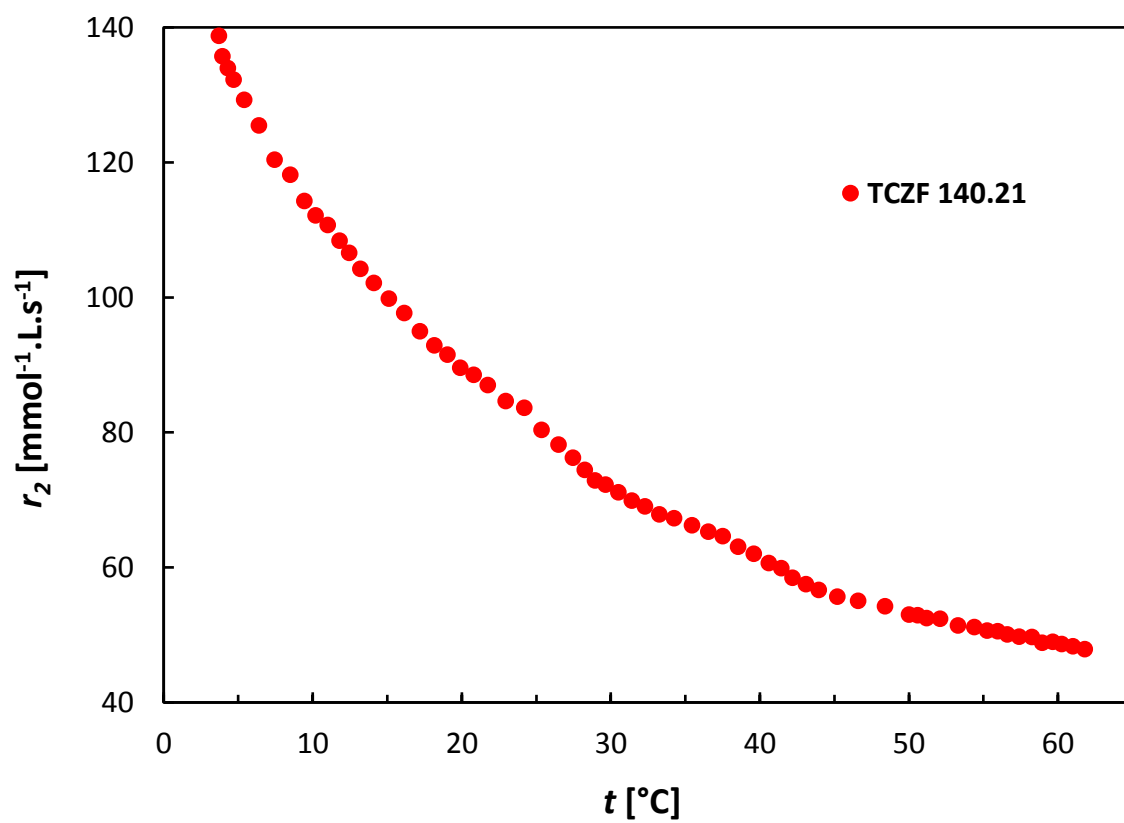
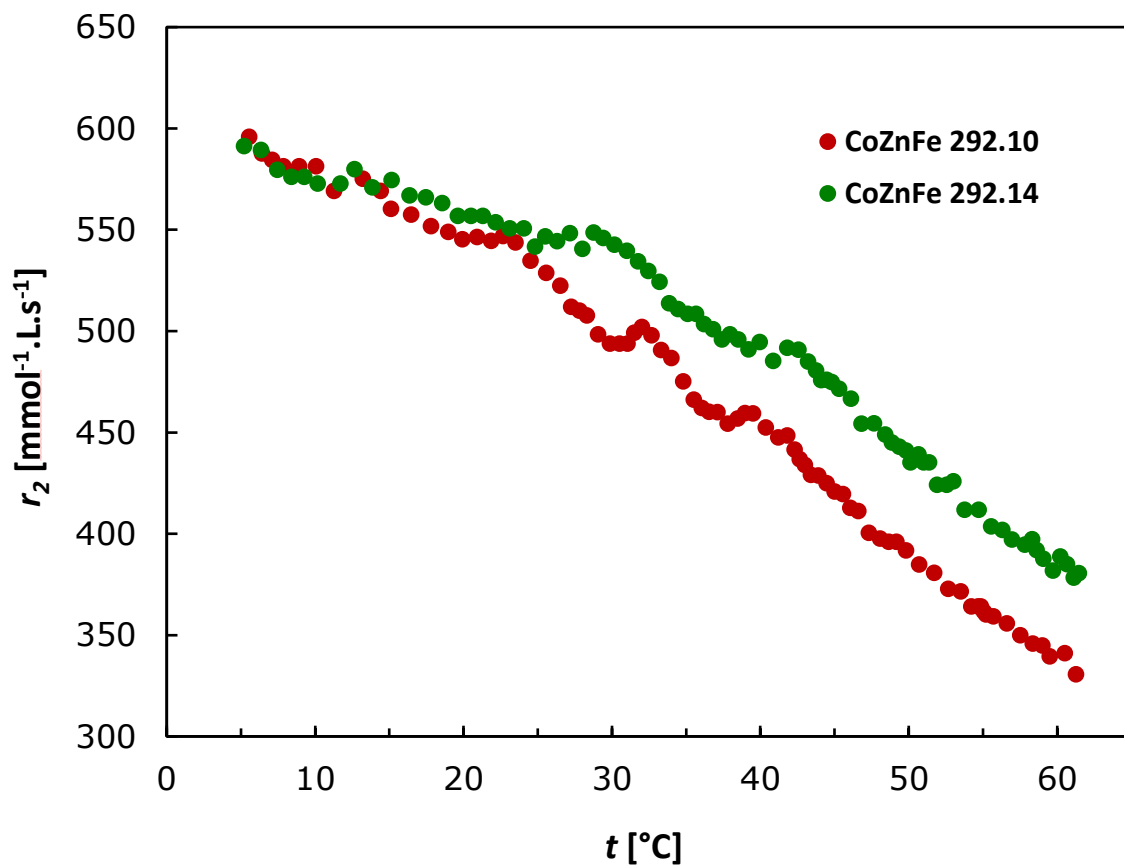


Obr. 14: Snímek pořízený na experimentálním MRI tomografu (4,7 T): červené šipky směřují na skleněné kapiláry se zafixovanými HeLa buňkami inkubovanými s příslušným typem nanočástic; modrá šipka směřuje na skleněnou kapiláru s kontrolními HeLa buňkami (bez nanočástic); žlutá šipka ukazuje na Petriho misku s želatinou. Použité suspenze nanočástic: TCZF 140.21, CoZnFe 292.10 a MK-178-24.

Tab. 3: Hodnoty r_2 relaxivit T_2 kontrastních látek na bázi oxidů železa běžně používaných v klinické praxi a hodnoty r_2 relaxivit připravených fluorescenčně značených nanočástic na bázi Co-Zn feritu. Podmínky měření: vodná suspenze nanočástic, teplota 37°C, magnetické pole: 0,47 T (v případě tabelovaných hodnot) a 0,5T (v případě měřených produktů).^[60, 61, 62, 63]

KOMERČNÍ NANOČÁSTICE POUŽÍVANÉ V MRI						
Typ nanočástic	Mezinárodní kód	Obchodní označení	Obalový materiál	Průměrná velikost nanočástic [nm]	Průměrná velikost jádra [nm]	r_2 relaxivita [$\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$]
SPIO	AMI-25	Ferridex IV/Endorem	dextran	80-150	4,5-5,6	80-150
	AMI-121	Luminer/Gastromark	siloxan	300	10	72
	SHU 555A	Resovist	karboxydextran	62	4,2	82-151
	OMP	Abdoscan	polystyren	3500	<50	-
USPIO	AMI-227	Sinerem/Combindex	dextran	20-40	4-6	60
	NC100150	Clariscan	PEG	20	4-7	35
NANOČÁSTICE PŘIPRAVENÉ V RÁMCI DIPLOMOVÉ PRÁCE						
Typ nanočástic	Pracovní označení	Obalový materiál	Průměrná velikost nanočástic [nm]	Průměrná velikost jádra [nm]	r_2 relaxivita [$\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$]	
Co-Zn ferit	CoZnFe 292.10	silika se zabudovaným derivátem rhodaminu B	120	36	456-459	
	CoZnFe 292.14	silika se zabudovaným fluoresceinem	110	36	495-500	
	TCZF 140.21	silika se zabudovaným derivátem rhodaminu B	55	13	63-65	

Graf 7: závislost transverzální relaxivity r_2 na teplotě t suspenzí fluorescenčně značených nanočástic: CoZnFe 292.10, CoZnFe 292.14 a TCZF 140.21.



7.7. Fluorescenční vlastnosti

Pomocí fluorescenčního spektrometru byla změřena excitační a emisní spektra fluorescenčně značených nanočástic TCZF 140.21 a samotného konjugátu Si@Rho-P. Měření prokázalo, že zabudováním fluoroforu (piperazinového derivátu rhodaminu B) do silikového obalu prakticky nedochází k ovlivnění jeho excitačních a emisních vlastností. Zjištěné vlnové délky příslušných excitačních a emisních maxim nanočástic a samotného konjugátu Si@Rho-P se lišily je o několik nm od hodnot excitačního a emisního maxima piperazinového derivátu rhodamin B, jež byly publikovány v práci.^[64]

Naměřené hodnoty excitačních a emisních maxim a publikované údaje shrnuje tabulka 4, emisní a excitační spektra pak ukazují grafy 8 a 9.

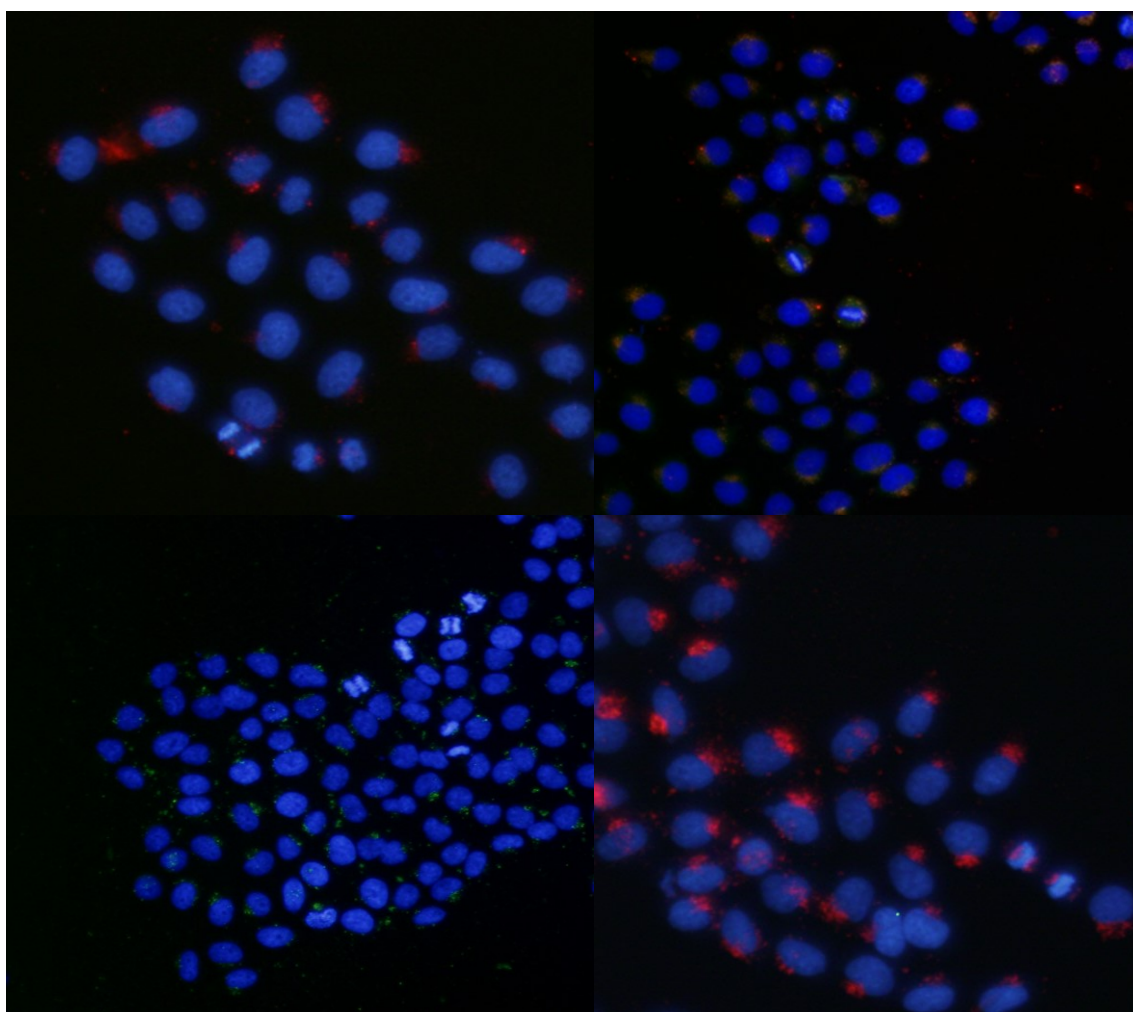
Tab. 4: Excitačních a emisních maxima rhodaminového fluoroforu v připravených částicích, v konjugátu Si@Rho-P a v piperazinovém derivátu Rho-P

Měřená látka	Excitační maximum λ_{MAX} [nm]	Emisní maximum λ_{MAX} [nm]
TCZF 140.21	569	583
Si@Rho-P	563	583
Rho-P ^[64]	567	589

U nanočástic, jejichž jádra byla připravena koprecipitací, nebylo možné naměřit excitační a emisní spektra, neboť jejich velká jádra vykazují silnou absorpci a výrazný rozptyl v dané oblasti viditelného záření.

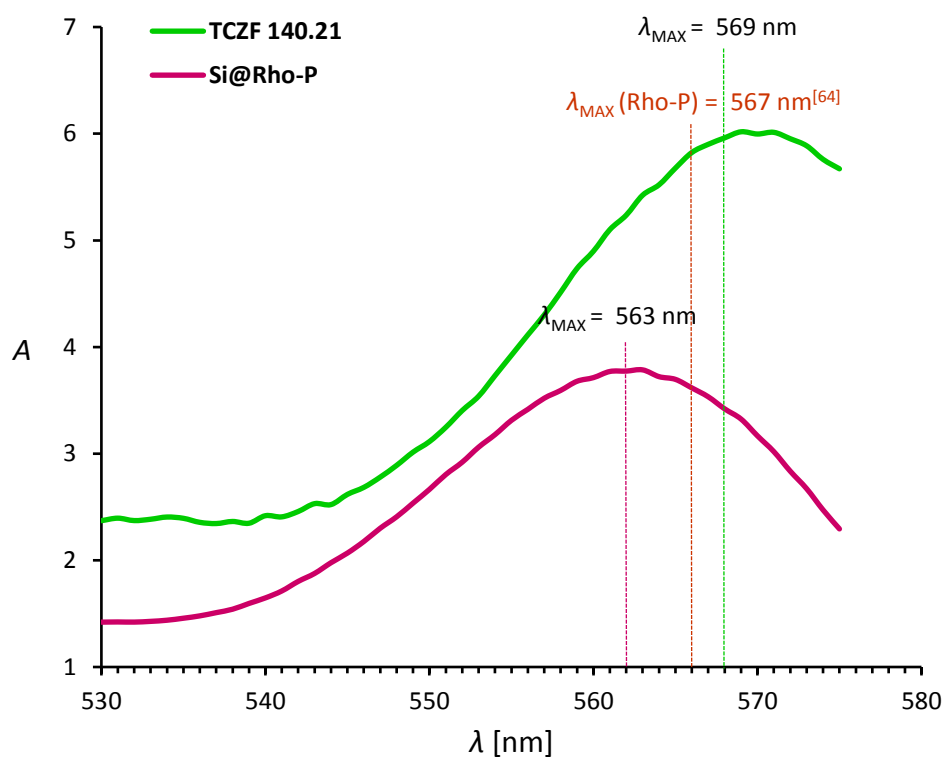
Dále byly fluorescenční vlastnosti připravených nanočástic ověřeny pomocí fluorescenční mikroskopie trvalých preparátů zafixovaných HeLa buněk a primárních lidských kožních fibroblastů. V závislosti na typu nanočástic použitých k inkubaci s buňkami je možné na níže uvedených snímcích pozorovat červenou (v případě nanočástic CoZnFe 292.10 a TCZF 140.21) nebo zelenou (v případě nanočástic CoZnFe 292.14) fluorescenci. Modře jsou pak obarvena jádra pomocí DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindolu), viz obr. 18, 19 a 20. Nanočástice obsažené ve váčcích vezikulárního transportu je možné pozorovat v celém intracelulárním prostoru primárních lidských kožních fibroblastů. V případě HeLa buněk byly váčky vezikulárního

transportu pozorovány spíše v blízkosti jádra a jen v určité části buňky. Na snímcích nebyla pozorována přítomnost nanočástic v buněčných jádrech, díky čemuž s největší pravděpodobností nedochází k narušení buněčných procesů spojených s jádrem a k poškození genetické informace. Nepřítomnost nanočástic v buněčných jádrech, byla prokázána také pomocí transmisní elektronové mikroskopie, viz kapitola 8.8. Zdá se, že přítomnost nanočástic v cytoplazmě nemá vliv ani na proliferaci (dělení) buněk, neboť na několika snímcích se podařilo zachytit dělící se buňky v různých fázích mitózy (viz obr. 15). Dobře jsou patrné typické struktury mitotických vřetének.

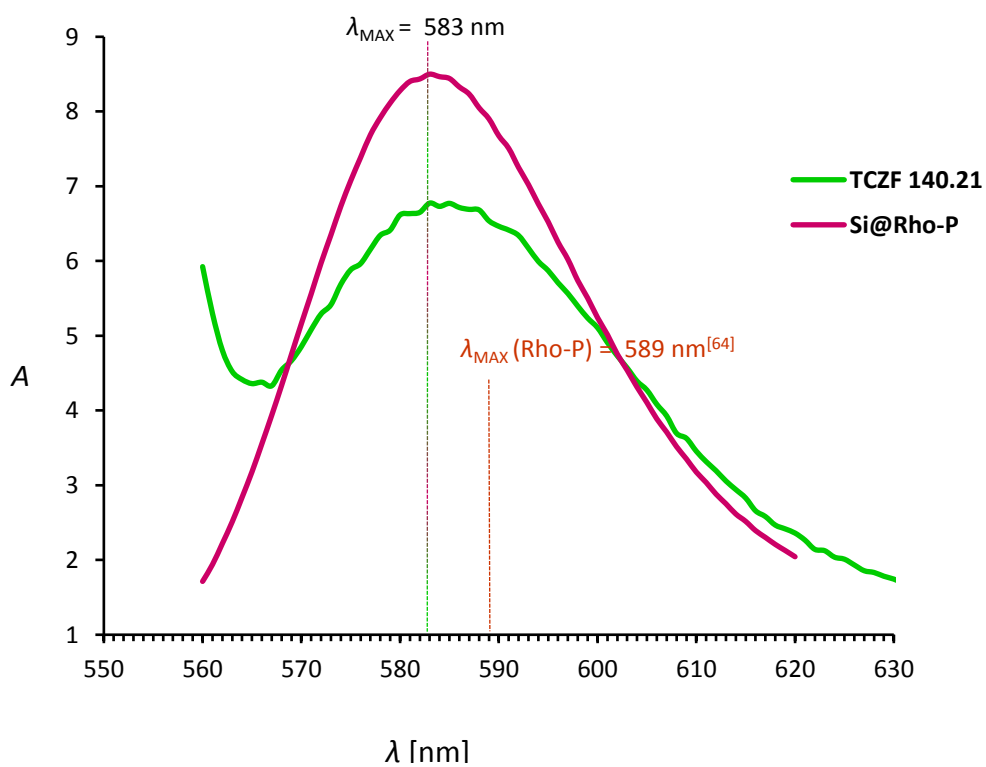


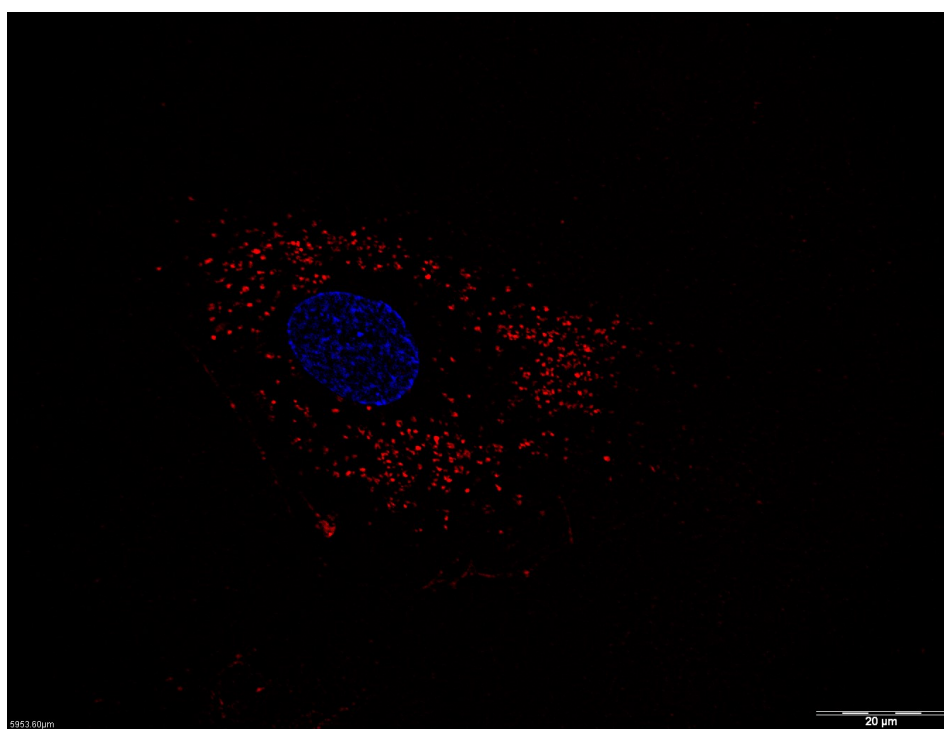
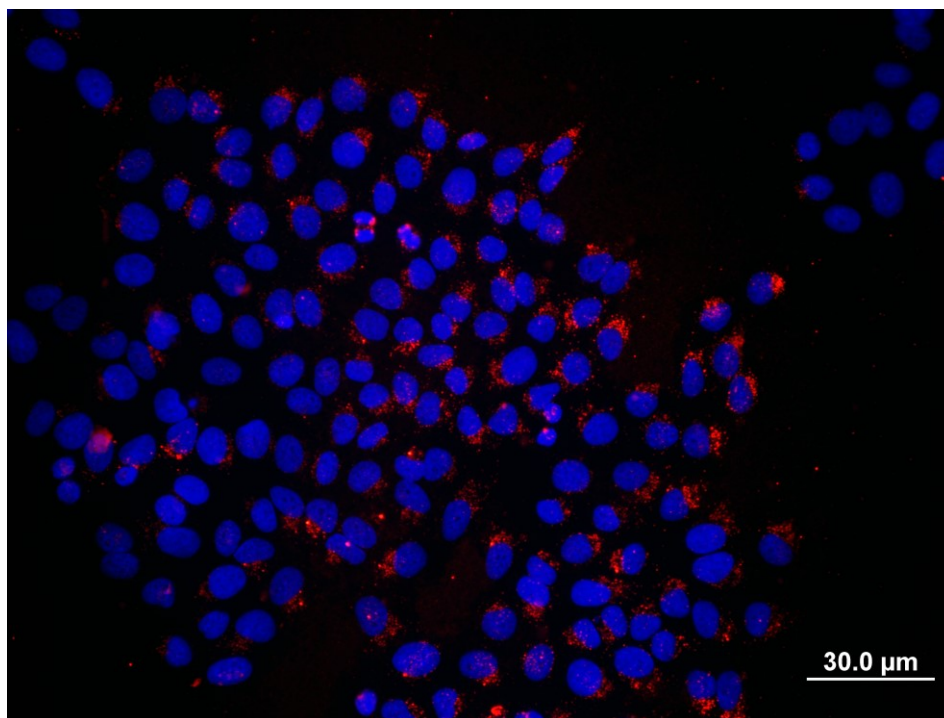
Obr. 15 Snímky HeLa buněk z fluorescenčního mikroskopu, které byly inkubovány A) s nanočásticemi TCZF 140.21 (MČ); B) s nanočásticemi TCZF 140.21 (MČ) a CoZnFe 292.14 (VZ); C) s nanočásticemi CoZnFe 292.14 (VZ); D) s nanočásticemi CoZnFe 292.10 (VČ) (zvětšení objektivu 20x). Červená fluorescence je způsobena derivátem rhodaminu B a zelená fluorescence je způsobena fluoresceinem obsaženým v nanočásticích, modře jsou obarvena jádra pomocí DAPI. Žlutými kroužky jsou označeny buňky v různé fázi dělení buněčného jádra.

Graf 8: Excitační spektrum. Zelená křivka prezentuje excitační spektrum nanočástic TCZF 140.21; růžová křivka prezentuje excitační spektrum alkylovaného piperazinového derivátu rhodaminu B (Si@Rho-P).

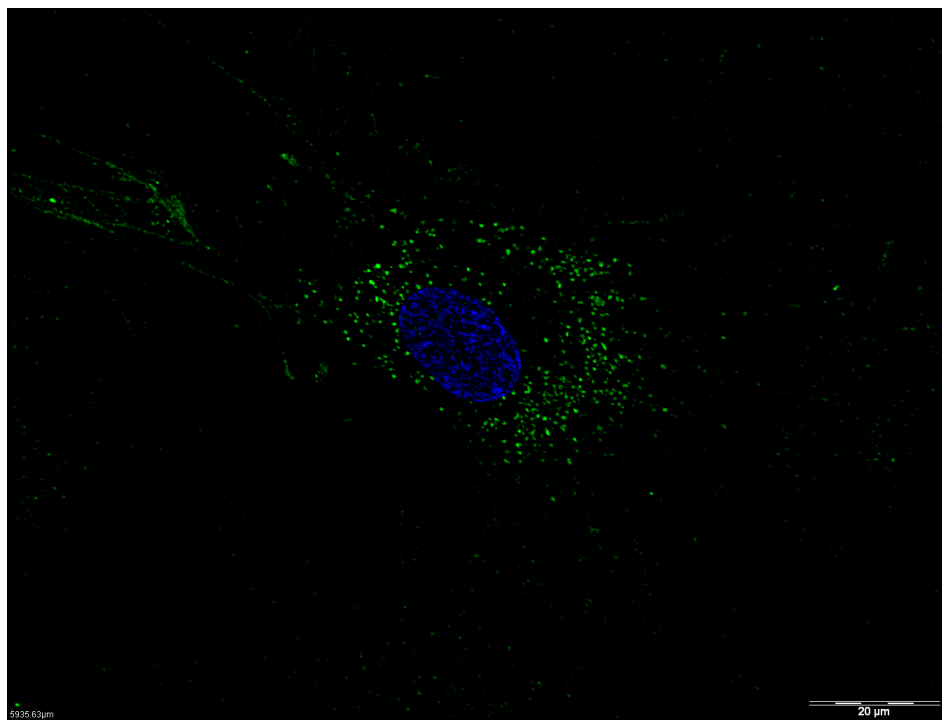
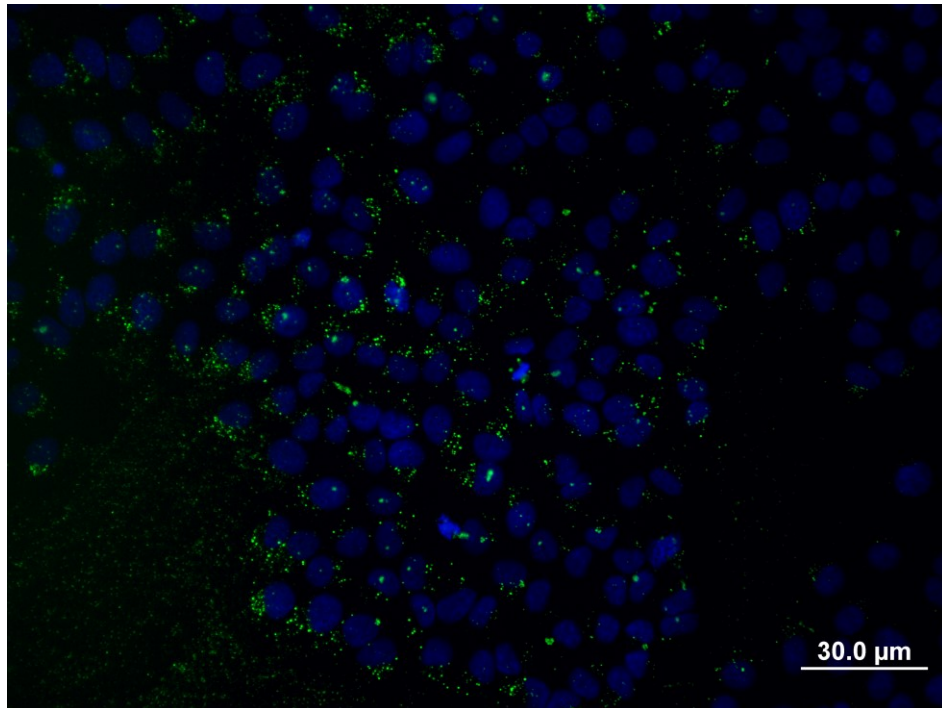


Graf 9: Emisní spektrum. Zelená křivka prezentuje emisní spektrum nanočástic TCZF 140.21; růžová křivka prezentuje emisní spektrum alkylovaného piperazinového derivátu rhodaminu B (Si@Rho-P).

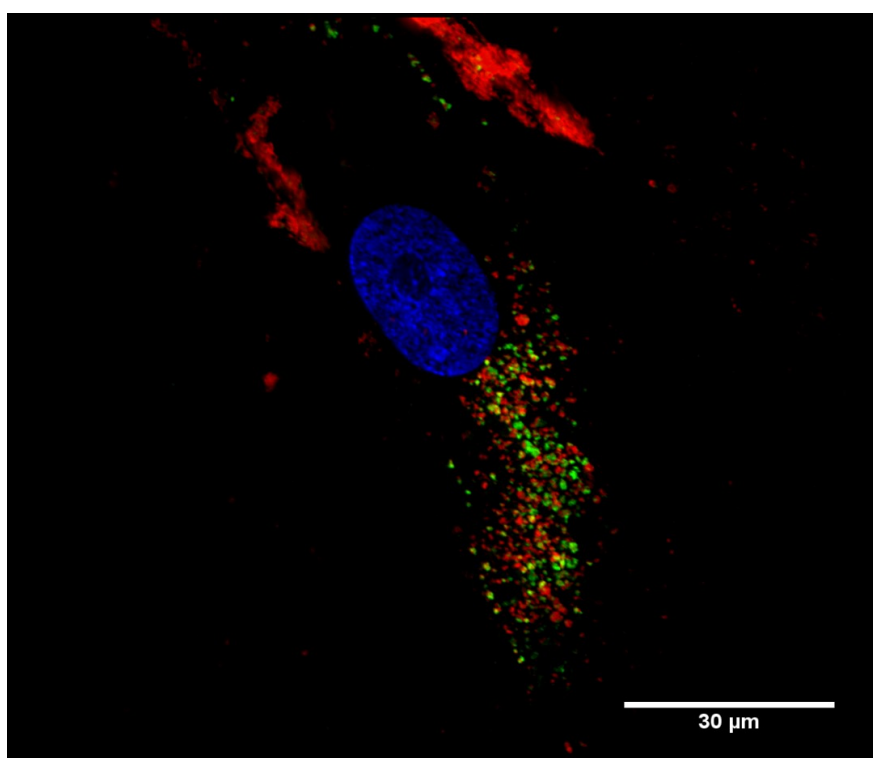
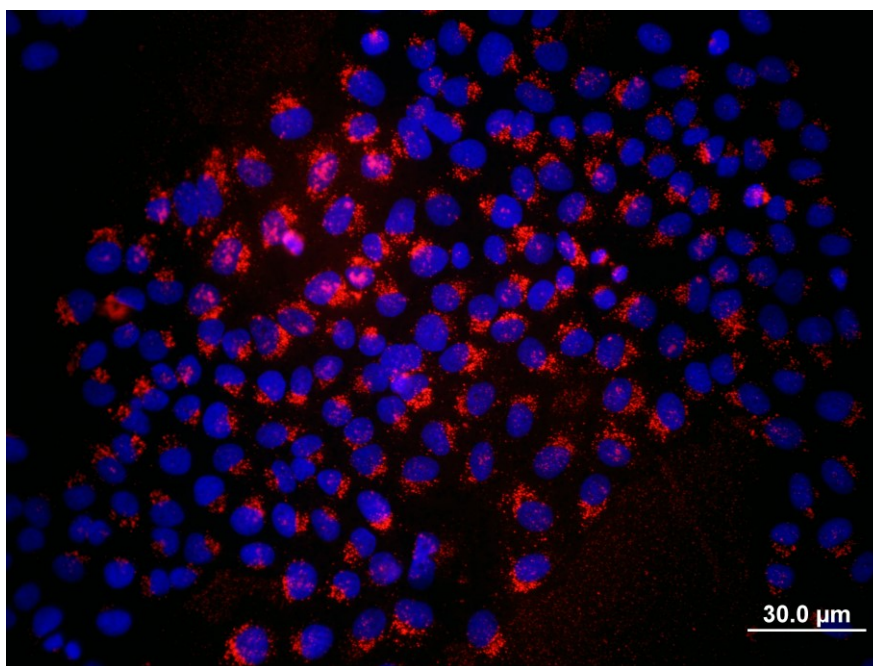




Obr. 18 Snímky buněk z fluorescenčního mikroskopu Cell-R, které byly inkubovány s nanočásticemi TCZF 140.21 (MČ): A) kultura HeLa buněk (zvětšení objektivu 40x), B) detail primárního kožního fibroblastu (zvětšení objektivu 60x). Červená fluorescence je způsobena derivátem rhodaminu B obsaženým v nanočásticích, modře jsou obarvena jádra pomocí DAPI.



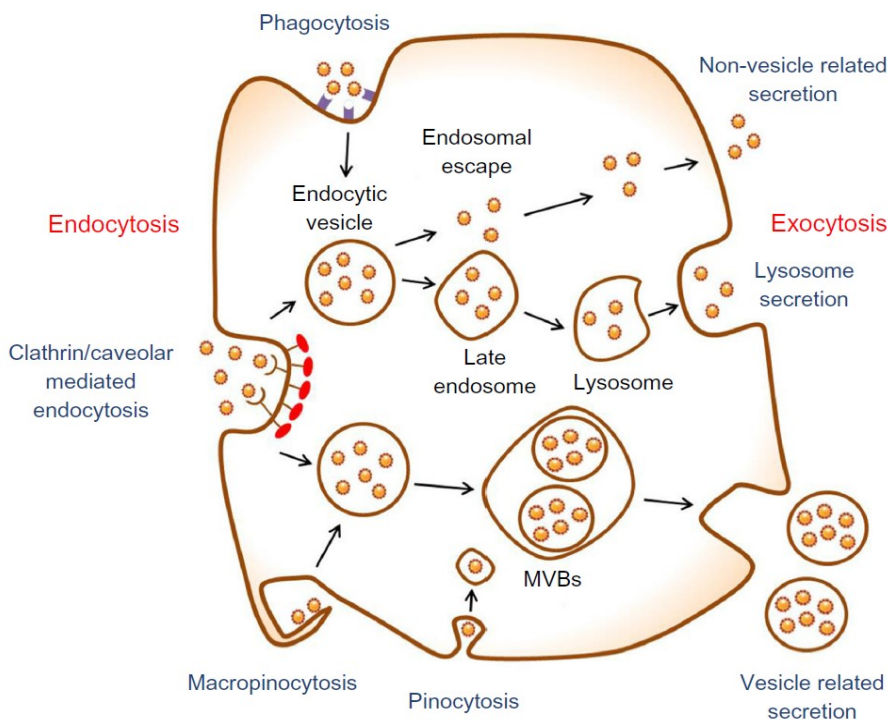
Obr. 19 Snímky buněk z fluorescenčního mikroskopu Cell-R, které byly inkubovány s nanočásticemi CoZnFe 292.14 (VZ): A) kultura HeLa buněk (zvětšení objektivu 40x), B) detail primárního kožního fibroblastu (zvětšení objektivu 60x). Zelená fluorescence je způsobena fluoresceinovým fluoroforem obsaženým v nanočásticích, modře jsou obarvena jádra pomocí DAPI.



Obr. 20 Snímky buněk z fluorescenčního mikroskopu Cell-R A) kultura HeLa buněk inkubovaná s nanočásticemi CoZnFe 292.10 (zvětšení objektivu 40x), B) Detail primárního kožního fibroblastu, který byl inkubován současně s nanočásticemi CoZnFe 292.10 (VČ) a CoZnFe 292.14 (VZ), zvětšení objektivu 60x. Červená fluorescence je způsobena derivátem rhodaminu B a zelená fluorescence je způsobena fluoresceiovým fluorofrem obsaženým v nanočásticích, modře jsou obarvena jádra pomocí DAPI.

7.8. Lokalizace nanočástic uvnitř buněk

Buňky přijímají nanočástice přidané do kultivačního média prostřednictvím cytoplazmatické membrány procesem zvaným endocytóza. Buňka vchlípí část membrány, která obklopuje přijímaný materiál za vzniku intracelulárního váčku tzv. endozómu. Pomocí dalších váčků vezikulárním transportu je přijatý materiál roztríděn, degradován a následně transportován do cílových struktur. Nežádoucích



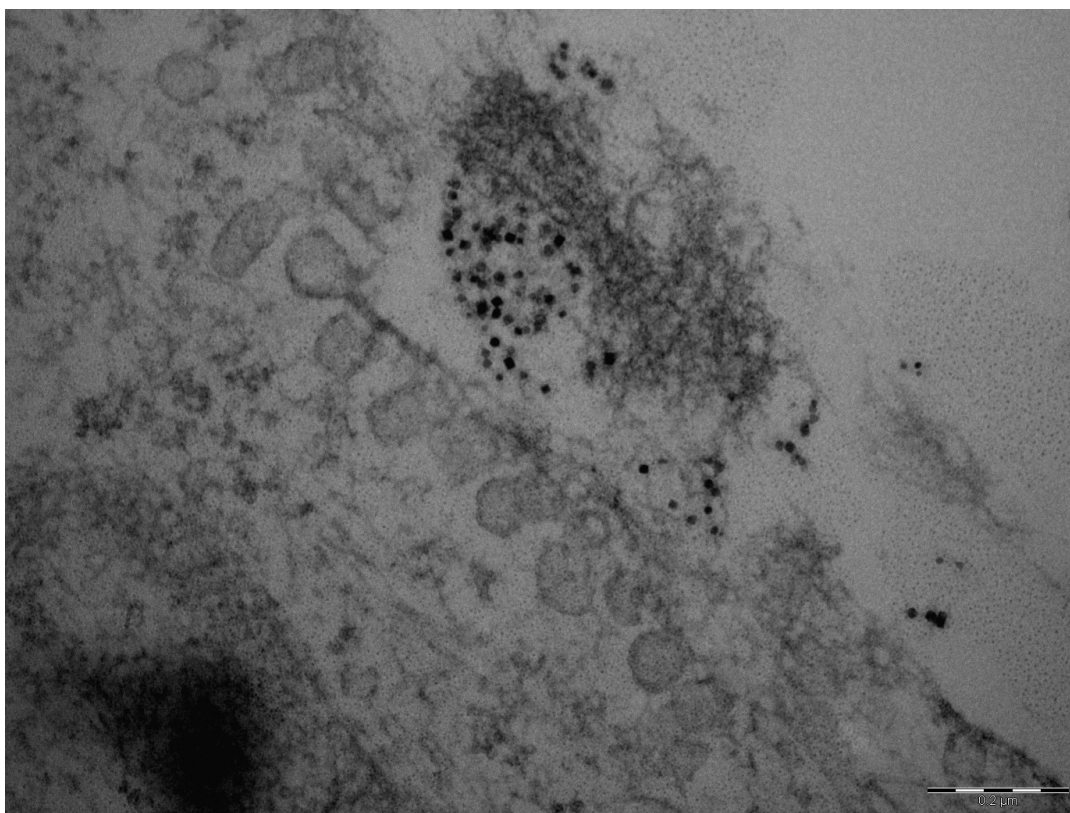
Obr. 21 Schéma možných cest vstupu (endocytózy) a cest výstupu (exocytózy) nanočástic do a z buňky: nanočástice mohou do buňky vstoupit pomocí fagocytózy („buněčným jedením“), pinocytózy („buněčným pitím“), makropinocytózy anebo pomocí klatrinem či kaveolinem zprostředkované endocytózy; nanočástice mohou být z buňky vyloučeny takzvanou lyzozomální sekrecí, sekrecí zprostředkovanou váčky anebo sekrecí s váčky nesouvisející. Použité zkratky: MVBs (multivezikulární tělíška). Obrázek převzat z literatury.^[65]

pozůstatků po degradaci se buňka posléze zbavuje procesem zvaným exocytóza. Pomocí transportních váčků pocházejících z endoplazmatického retikula či Golgiho aparátu je nežádoucí materiál vyvržen zpět do vnějšího prostředí buňky (viz obr. 22).^[65] Lze jistě předpokládat, že příjem nanočástic buňkou je přímým důsledkem příjmu média obklopujícího buňku, a že nejde o cílený příjem částic jako takových.

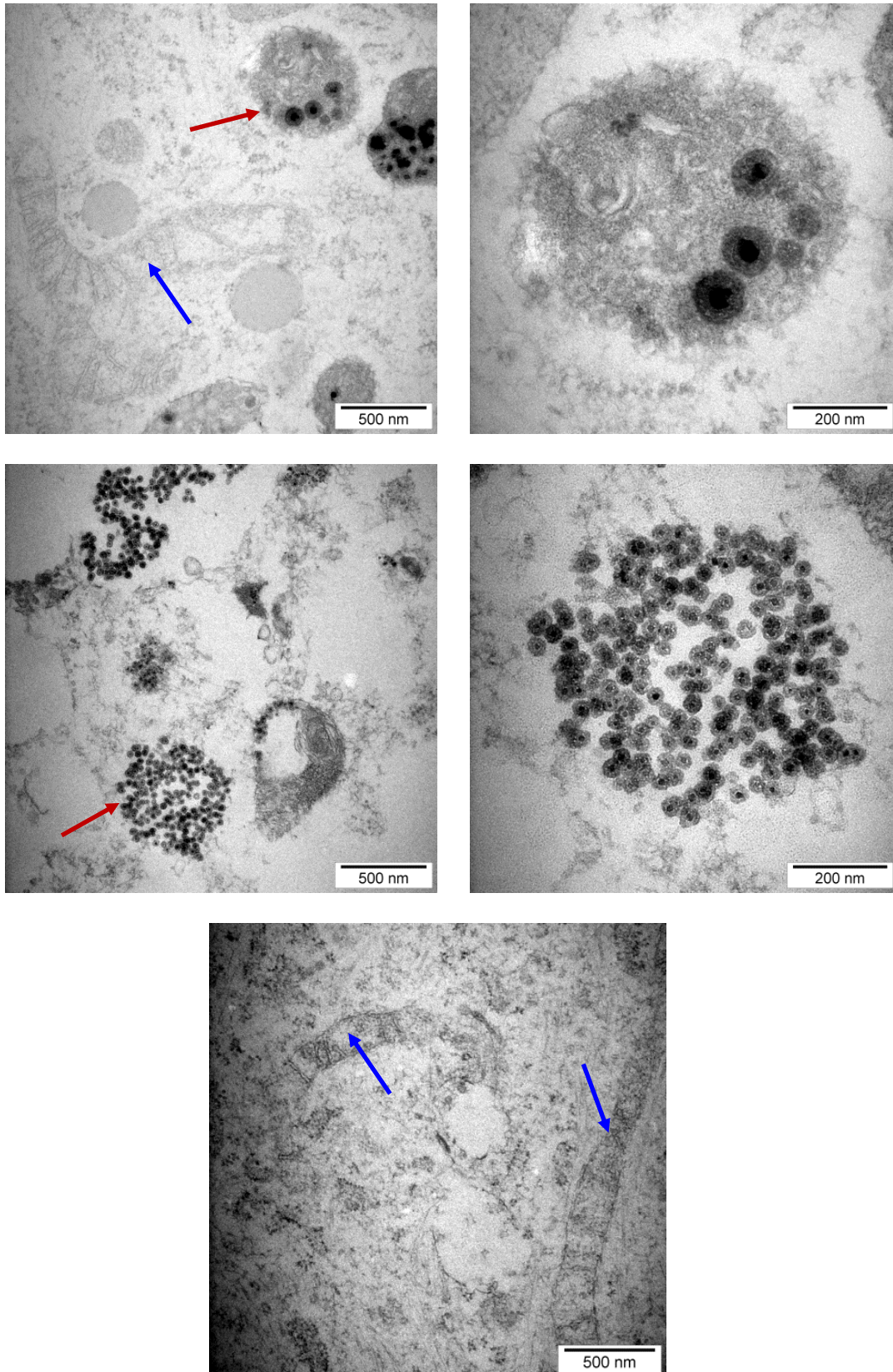
Pomocí transmisní elektronové mikroskopie byly pořízeny snímky intracelulárního prostředí buněk primárních lidských kožních fibroblastů (linie Cyril). Na snímcích jsou zachyceny blíže neurčené typy váčků vezikulárního transportu, jež obsahují pohlcené

nanočástice (CoZnFe 292.10 a TCZF 140.21), které se v průběhu inkubace buněk s nanočásticemi dostaly dovnitř procesem endocytózy. Na snímcích lze rozlišit jednotlivé partikule včetně detailů, jako jsou vlastní magnetická jádra a jejich křemičité obaly (viz obr. 23).

Na základě pořízených snímků lze usuzovat, že připravené fluorescenčně značené nanočástice se nenacházejí volně v cytoplazmě, nýbrž putují buňkou prostřednictvím vezikulárního transportu. V žádném z případů nebyla pozorována přítomnost nanočástic v jádře ani v mitochondriích, tudíž by nanočástice neměly narušovat strukturu ani syntézu DNA. Dále je možné říci, že nanočástice procházejí různými typy váčků, v nichž pravděpodobně podléhají částečné degradaci. K degradaci dochází vlivem vnitřního prostředí, které je pro jednotlivé typy váčků specifické (vnitřní prostředí některých váčků je poměrně kyselé, neboť obsahují velké množství protonových pump, jiné naopak obsahují nejrozličnější hydrolytické enzymy). U některých obalených částic se právě dalo pozorovat naleptání či částečné rozpuštění magnetických jader (viz obr. 23 D), které je snadno vysvětlitelné působením kyselého prostředí ve zmíněných váčcích a určitou



Obr. 22 Snímek z transmisního elektronového mikroskopu: hranice buňky tvořená cytoplazmatickou membránou. Struktura membrány je hojně zvrásněna váčky vezikulárního transportu (modré šipky). Vně buňky jsou patrná magnetická jádra (červené šipky), jejichž obal byl pravděpodobně degradován v některé části traktu vezikulárního transportu.



Obr. 23 Snímky z transmisního elektronového mikroskopu A) vnitřní struktury kožního fibroblastu, který byl inkubován s nanočásticemi CoZnFe 292.10 B) detail endosomálního váčku s nanočásticemi CoZnFe 292.10; C) vnitřní struktury kožního fibroblastu, který byl inkubován s nanočásticemi TCZF 140.21; D) detail endosomálního váčku s nanočásticemi TCZF 140.21; E) pohled na vnitřní struktury kontrolní buňky (bez nanočástic). Červené šipky ukazují na endosomální váčky s nanočásticemi, modré šipky ukazují na mitochondrie.

porozitou silikového obalu. Dodejme, že byla publikována i práce, která se pokouší kvantitativně sledovat právě vnitrobuněčnou degradaci nanočástic oxidů železa v endosomech, viz literatura^[66]. Nicméně na některých snímcích bylo však možné pozorovat i krystality magnetických jader, které měly narušený silikový obal, přičemž se s největší pravděpodobností jednalo o materiál po vyvržení buňkou do extracelulárního prostředí. Na těchto snímcích byly současně nápadné také váčky tvořené cytoplazmatickou membránou (viz obr. 22). V tomto druhém případě je interpretace bez dalšího podrobnějšího studia obtížná.

8. ZÁVĚR

Podařilo se připravit stabilní vodné suspenze fluorescenčně značených nanočástic zinkem dopovaného kobaltnatého feritu s různou velikostí magnetických jader. Feritová jádra měla spinelovou strukturu, byla ferrimagneticky uspořádaná, vykazovala vysokou magnetizaci a za pokojové teploty byla jejich odezva na magnetické pole bezhysterezní. S vysokými hodnotami magnetického momentu zejména větších nanočástic připravených koprecipitací souvisely také vysoké hodnoty transverzálních relaxivit, které jsou důležitým parametrem pro zobrazování magnetickou rezonancí. Feritová jádra byla obalena dvouvrstevným silikovým obalem, jehož vnitřní vrstva obsahovala fluorofory na bázi rhodaminu B a fluoresceinu. U připravených produktů nanočástic byly ověřeny fluorescenční, magnetické i kontrastní vlastnosti. Nanočástice vykazovaly výrazný negativní T_2 kontrast a podle typu připravených nanočástic také červenou či zelenou fluorescenci, což dovoluje například simultánní inkubaci buněk s částicemi obou velikostí a odlišení signálu malých a velkých částic

Bylo ukázáno, že nanočástice vstupují do buněk procesem endocytózy a v rámci buňky se pohybují uvnitř váčků vezikulárního transportu. Z buňky jsou posléze vyloučeny procesem exocytózy. Na základě snímků pořízených fluorescenční a transmisí elektronovou mikroskopií lze říct, že nanočástice nevstupují do organel přímo souvisejících s dědičnou informací (jádro, mitochondrie), což je důležité především z hlediska proliferace buněk, na kterou neměla přítomnost nanočástic vliv. U všech připravených produktů nanočástic byla testována také jejich cytotoxicita na různých buněčných liniích. V žádném z testů však nebyla prokázána zvýšená míra toxicity některého z produktů.

Díky fluorescenčním vlastnostem a výraznému negativnímu T_2 kontrastu se připravené nanočástice zinkem dopovaného kobaltnatého feritu jeví jako potenciálně vhodné multimodální kontrastní látky pro použití v zobrazovacích metodách experimentálního výzkumu.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) <http://www.gemselect.com/other-info/history-spinel.php> (citováno k 2.7.2018)
- 2) <http://www.mindat.org/photo-160197.html> (citováno k 2.7.2018)
- 3) <https://www.gia.edu/gem-synthetic> (citováno k 2.7.2018)
- 4) <https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Jakobsit> (citováno k 2.7.2018)
- 5) <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html> (citováno k 5.7.2018)

- [1] Kropáček V., Krs M. **Magnetism and ferromagnetism of natural minerals of the spinel group.** *Studia Geophysica et Geodaetica*, 1968, 12(4): 385-397
- [2] O'Neill H. St. C. and Navrotsky A., **Simple spinels - Crystallographic Parameters, Cation Radii, Lattice Energies, and Cation Distribution.** *American Mineralogist*, 1983, 68(1-2): 181-194
- [3] Seko A., Yuge K., Oba F., Kuwabara A., and Tanaka I. **First-Principles Study of Cation Disordering in $MgAl_2O_4$ Spinel with Cluster Expansion and Monte Carlo Simulation.** *Physical Review B*, 2006, 73(9): 094116-1 - 094116-6
- [4] Burdett J. K., Price G. D. and Price S. L., **Role of the Crystal-Field Theory in Determining the Structures of Spinel.** *Journal of the American Chemical Society*, 1982, 104(1): 92-95
- [5] Goldman Alex, **Modern Ferrite Technology.** 2nd Ed., Springer, 2006
- [6] Wang Y., Xu Ch. and Ow H., **Commercial Nanoparticles for Stem Cell Labeling and Tracking.** *Theranostics*, 2013, 3(8): 544-560
- [7] Zhang Z.-Q. and Song S.-Ch., **Thermosensitive/superparamagnetic iron oxide nanoparticle-loaded nanocapsule hydrogels for multiple cancer hyperthermia.** *Biomaterials*, 2016, 106: 13-23
- [8] Zhao W., Jin Y., Gao C. H., Gu W., Jin Z. M., Lei Y. L. and Liao L. S., **A simple method for fabricating pen junction photocatalyst $CuFe_2O_4/Bi_4Ti_3O_{12}$ and its photocatalytic activity.** *Materials Chemistry and Physics*, 2014, 143: 952-962
- [9] Parekh K., Upadhyay R. V., Belova L. and Rao K. V., **Ternary monodispersed $MnZnFe_2O_4$ ferrite nanoparticles preparation and magnetic characterization.** *Nanotechnology*, 2006, 17: 5970-5975
- [10] Monfared A. H., Zamanian A., Beygzadeh M., Sharifi I. and Mozafari M., **A rapid and efficient thermal decomposition approach for the synthesis of manganese-zinc/oleylamine core/shell ferrite nanoparticles.** *Journal of Alloys Compounds*, 2017, 693: 1090-1095

- [11] Vaidyanathan G., Sendhilnathan S. and Arulmurugan R., **Structural and magnetic properties of $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ nanoparticles by co-precipitation method.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007, 313: 293-299
- [12] Kasapoglu N., Birsöz B., Baykal A., Köseoglu Y. and Toprak M.S., **Synthesis and magnetic properties of octahedral ferrite $\text{Ni}_x\text{Co}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$ nanocrystals.** *Central European Journal of Chemistry*, 2007, 5(2):570-580
- [13] Vinosha P. A., Immaculate Nancy Mary G., Mahalakshmi K., Ansel Mely L. and Jerome Das S., **Study on Cobalt Ferrite Nanoparticles Synthesized by Co-Precipitation Technique for Photo-Fenton Application.** *Mechanics, Materials Science and Engineering*, 2017, 9(1)
- [14] Khan A. A., Javed M., Khan A. R., Iqbal Y., Majeed A., Hussain S. Z. and Durrani S. K., **Influence of preparation method on structural, optical and magnetic properties of nickel ferrite nanoparticles.** *Materials Science-Poland*, 2017, 35(1): 58-65
- [15] Liu X.-M., Fu S.-Y. and Huang Ch.-J., **Synthesis and magnetic characterization of novel $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-BiFeO}_3$ nanocomposites.** *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology*, 2005, 121(3): 255-260
- [16] Briceño S., Sanchez Y., Brämer-Escamilla W., Silva P., Rodriguez J. P., Ramos M. A. and Plaza E., **Estudio Comparativo de Los Métodos de Preparación de Nanopartículas de Ferritas CoFe_2O_4 .** *Acta Microscopica*, 2013, 22(1): 62-68
- [17] Lee Y., Lee J., Bae Ch. J., Park J.-G., Noh H.-J., Park J.-H. and Hyeon T., **Large-Scale Synthesis of Uniform and Crystalline Magnetite Nanoparticles Using Reverse micelles as Nanoreactors under Reflux Conditions.** *Advanced Functional Materials*, 2005, 15(3): 503-509
- [18] Kasapoglu N., Baykal A., Köseoglu Y. and Toprak M.S., **Microwave-assisted combustion synthesis of CoFe_2O_4 with urea, and its magnetic characterization.** *Scripta Materialia*, 2007, 57(5): 441-444
- [19] Gossuin Y., Hocq A., Gillis P. and Vuong Q. L., **Physics of magnetic resonance imaging from spin to pixel.** *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2010, 43(21): 1-15
- [20] McMahon K. L., Cowin G. and Galloway G., **Magnetic Resonance Imaging: The Underlying Principles.** *Journal of Orthopaedic and Sport Physical Therapy*, 2011, 41(11): 806-819
- [21] Aime S., Botta M., Fasano M., Crich S. G. and Terreno E., **Gd(III) complexes as contrast agents for magnetic resonance imaging: a proton relaxation enhancement study of the interaction with human serum albumin.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1996,1 (4): 312-319

- [22] Matsuoka H., Hamada M., Honda T., Kawakami H., Okayama H., Abe M., Shigematsu Y., Sumimoto T. and Hiwada K., **Precise Assessment of Myocardial Damage Associated with Secondary Cardiomyopathies by Use of Gd-DTPA-Enhanced-Magnetic Resonance-Imaging.** *Angiology*, 1993, 44(12): 945-950
- [23] Kirchin M. A., Pirovano G. P. and Spinazzi A., **Gadobenate dimeglumine (Gd-BOPTA) – An overview.** *Investigative Radiology*, 1998, 33(11): 798-809
- [24] Bernardino M., Young S. W., Lee J. K. and Weinreb J. C., **Hepatic MR imaging with Mn-DPDP: safety, image quality, and sensitivity.** *Radiology*, 1992, 183(1): 53-58
- [25] Kattel K., Park J. Y., Xu W., Kim H. G., Lee E. J., Bony B. A., Heo W. C., Lee J. J., Jin S., Baeck J. S., Chang Y., Kim T. J., Bae J. E., Chae K. S. and Lee G. H., **A Facile Synthesis, In vitro and In vivo MR Studies of D-Glucuronic Acid-Coated Ultrasmall Ln(2)O(3) (Ln = Eu, Gd, Dy, Ho and Er) Nanoparticles as a New Potential MRI Contrast Agent.** *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2011, 3(9): 3325-3334
- [26] Thorek D. L. J., Chen A. K., Czupryna J. and Tsourkas A., **Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Probes for Molecular Imaging.** *Annals of Biomedical Engineering*, 2006, 34(1): 23-38
- [27] Starsich F. H. L., Sotiriou G. A., Wurnig M. C., Eberhardt C., Hirtm A. M., Boss. A. and Pratsinis S. E., **Silica-Coated Nonstoichiometric Nano Zn-Ferrites for Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia Treatment.** *Advanced Health Care Materials*, 5 (20), 2016, 2698-2706
- [28] Liu F., Laurent S., Roch A., Vander Elst L. and Muller R. N., **Size-Controlled Synthesis of CoFe₂O₄ Nanoparticles Potential Contrast Agent for MRI and Investigation on Their Size-Dependent Magnetic Properties.** *Journal of Nanoparticles*, 2013, 9 pp.
- [29] Lasheras X., Insausti M., Gil de Muro I., Garaio E., Plazaola F., Moros M., De Matteis L., De La Fuente J. and Lezama L., **Chemical Synthesis and Magnetic Properties of Monodisperse Nickel Ferrite Nanoparticles for Biomedical Applications.** *The Journal of Physical Chemistry*, 2016, 120(6): 3492-3500
- [30] Liu X. L., Wang Y. T., Ng C. T., Wang R., Jing G.Y., Yi J. B., Yang J., Bay B. H., Yung, L. Y. L., Fan D. D., Ding J. and Fan H. M., **Coating Engineering of MnFe₂O₄ Nanoparticles with Superhigh T-2 Relaxivity and Efficient Cellular Uptake for Highly Sensitive Magnetic Resonance Imaging.** *Advanced Materials Interfaces*, 2014, 1(2): 1300069
- [31] Leng J., Li J., Ren J., Deng L. and Lin Ch., **Star-block copolymer micellar nanocomposites with Mn,Zn-doped nano-ferrite as superparamagnetic MRI contrast agent for tumor imaging.** *Materials Letters*, 2015, 152: 185-188

- [32] Sattarahmady N., Heidari M., Zare T., Lotfi M. and Heli H., **Zinc-Nickel Ferrite Nanoparticles as a Contrast Agent in Magnetic Resonance Imaging.** *Applied Magnetic Resonance*, 2016, 47(8): 925-935
- [33] Rodríguez I., Pérez-Rial S., González-Jimenez J., Pérez-Sanchez J. M., Herranz F., Beckmann N. and Ruíz-Cabello J., **Magnetic Resonance Method and Applications in Pharmaceutical Research.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97: 3637-3654
- [34] Joshi H. M., **Multifunctional metal ferrite nanoparticles for MRI paging applications.** *Journal of Nanoparticle Research*, 2013, 15(1): 1-19
- [35] Jenkins R., Burdette M. K. and Foulger S. H., **Mini-review: fluorescence paging in cancer cells using dye-doped nanoparticles.** *RSC Advances*, 2016, 6(70): 65459-65474
- [36] Yang H., Zhuang Y., Hu H., Du X., Zhang C., Shi X., Wu H. and Yang S., **Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles as a Platform for Targeted Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Cancer Cells.** *Advanced Functional Materials*, 2010, 20(11): 1733-1741
- [37] Wang C., Qiao L., Zhang Q., Yan H. and Liu K., **Enhanced cell uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through direct chemisorption of FITC-Tat-PEG₆₀₀-b-poly(glycerol monoacrylate).** *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 430(1-2): 372-380
- [38] Sheng Y., Shuai L., Zongquan D. and Zhang R. and Xue J., **Fluorescent magnetic nanoparticles as minimally-invasive multi-functional theranostic platform for fluorescence imaging, MRI and magnetic hyperthermia.** *Materials Chemistry and Physics*, 2018, 204: 388-396
- [39] Plaster B. R., **Dynamic Light Scattering and Diffusing Wave Spectroscopy Studies of the Microscopic Dynamics of Polystyrene Latex Spheres Suspended in Glycerol.** Bachelor thesis of Science in Physics, Massachusetts Institute of Technology, 1999
- [40] Kaman O., Dědourková T., Koptan J., Kuličková J., Maryško M., Veverka P., Havelek R., Královec K., Turnovcová K., Jendelová P., Schröfel A. and Svoboda L., **Silica-coated manganite and Mn-based ferrite nanoparticles: a comparative study focused on cytotoxicity.** *Journal of Nanoparticle Research*, 2016, 18 art. no. 100
- [41] Veverka M., Jiráček Z., Kaman O., Knížek K., Maryško M., Pollert E., Závěta K., Lančok A., Dlouhá M. and Vratislav S., **Distribution of cations in nanosize and bulk Co-Zn ferrites.** *Nanotechnology*, 2011, 22: 345701 (7pp)
- [42] Kaman O., Kořínková T., Jiráček Z., Maryško M. and Veverka M., **The superspin glass transition in zinc ferrite nanoparticles.** *Journal of Applied Physics*, 2015, 117, 17C706

- [43] Roca A. G., Veintemillas-Verdaguer S., Port M., Robic C., Serna C. J. and Morales M. P. **Effect of Nanoparticle and Aggregate Size on the Relaxometric Properties of MR Contrast Agents Based on High Quality Magnetite Nanoparticles.** *Journal of Physical Chemistry B.*, 2009, 113():7033-7039
- [44] Kaman O., **Příprava, struktura a vlastnosti hybridních nanočástic s jádrem perovskitového a spinelového typu.** Disertační práce, Praha, 2009, Univerzita Karlova, Fakulta Přírodovědecká
- [45] Kaman O., Pollert E., Veverka P., Veverka M., Hadová E., Knížek K., Maryško M., Kašpar P., Klementová M., Grünwaldová V., Vasseur S., Epherre R., Mornet S., Goglio G. and Duguet E. **Silica encapsulated manganese perovskite nanoparticles for magnetically induced hyperthermia without the risk of overheating.** *Nanotechnology*, 2009, 20(27): 1-9
- [46] Kaman O., Veverka P., Jiráček Z., Maryško M., Knížek K., Veverka M., Kašpar P., Burian M., Šepelák V. and Pollert E. **The magnetic and hyperthermia studies of bare and silica-coated La_{0.75}Sr_{0.25}MnO₃ nanoparticles.** *Journal of Nanoparticle Research*, 2011, 13(3): 1237–1252
- [47] Kačenka M., **Nanokrystalické perovskitové fáze pro MRI a fluorescenční mikroskopii.** Disertační práce, Praha, 2013, Univerzita Karlova, Fakulta přírodovědecká
- [48] Kačenka M., Kaman O., Kikerlová S., Pavlů, B., Jiráček Z., Jiráček D., Herynek V., Černý J., Chaput F., Laurent S., and Lukeš I., **Fluorescent magnetic nanoparticles for cell labeling: Flux synthesis of manganite particles and novel functionalization of silica shell.** *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, 447: 97-106
- [49] Armarego W. L. F. and Chai C. L. L., **Purification of Laboratory Chemicals.** 6th Ed., Pergamon Press, 2009
- [50] Langford J. I. and Wilson A. J. C., **Scherrer after sixty years: A survey and some new results in the determination of crystallite size.** 1978. *Journal of Applied Crystallography*, 11(2): 102-113.
- [51] Veverka M., Veverka P., Jiráček Z., Kaman O., Knížek K., Maryško M., Pollert E., and Závěta K., **Synthesis and magnetic properties of Co_{1-x}Zn_xFe₂O_{4+y} nanoparticles as materials for magnetic fluid hyperthermia.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2010, 322(16): 2386-2389
- [52] Kaman O., Dědourková T., Koktan J., Kuličková J., Maryško M., Veverka P., Havelek R., Královec K., Turnovcová K., Jendelová P., Schröfel A., and Svoboda L., **Silica-coated manganite and Mn-based ferrite nanoparticles: a comparative study focused on cytotoxicity.** *Journal of Nanoparticle Research*, 2016. 18(4): art. no. 100.

- [53] Kačenka M., Kaman O., Kotek J., Falteisek L., Černý J., Jiráček D., Herynek V., Zacharovová K., Berková Z., Jendelová P., Kupčík J., Pollert E., Veverka P. and Lukeš I., **Dual imaging probes for magnetic resonance imaging and fluorescence microscopy based on perovskite manganite nanoparticles.** *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(1): 157-164.
- [54] Hwang D. W., Lee D. S. and Kim S., **Gene Expression Profiles for Genotoxic Effects of Silica-Free and Silica-Coated Cobalt Ferrite Nanoparticles.** *Journal of Nuclear Medicine*, 2012, 53(1): 106-112
- [55] Zehani K., Bez R., Moscovici J., Mazaleyrat F., Mliki N. and Bessais L., **High Magnetic Moment of FeCo Nanoparticles Produced in Polyol Medium.** *IEEE Transactions on Magnetics*, 2014, 50(4): 1-5
- [56] Carroll M. R. J., Woodward R. C., House M. J., Teoh W. Y., Amal R., Hanley T. L. and St Pierre T. G., **Experimental validation of proton transverse relaxivity models for superparamagnetic nanoparticle MRI contrast agents.** *Nanotechnology*, 2010, 21(3), art. ID 035103.
- [57] Kaman O., Herynek V., Veverka P., Kubíčková L., Pashchenko M., Kuličková J. and Jiráček Z., **Transverse Relaxivity of Nanoparticle Contrast Agents for MRI: Different Magnetic Cores and Coatings.** *IEEE Transactions on Magnetics*, 2018, dostupné on-line, doi: 10.1109/tmag.2018.2844253
- [58] Holz M., Heil S. R. and Sacco A., **Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate ¹H NMR PFG measurements.** *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2000, 2(20): 4740–4742.
- [59] Vaněček V., Zablotskii V., Forostyak S., Růžička J., Herynek V., Babič M., Jendelová P., Kubinová Š., Dejneka A. and Syková E., **Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury.** *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7: 3719-3730.
- [60] Rohrer M., Bauer H., Mintorovitch J., Requardt M. and Weinmann H.-J., **Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media Solution at Different Magnetic Field Strengths.** *Investigative Radiology*, 2005, 40(11): 715-724
- [61] Gossuin Y., Gillis P., Hocq A., Vuong Q. L. and Roch A., **Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles.** *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2009, 1(3): 299-310
- [62] Wang Y.-X. J., Hussain S. M. and Krestin G. P., **Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging.** *European Radiology*, 2001, 11(11): 2319-2331

- [63] Wang Y.-X. J., **Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application.** *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2011, 1(1): 35-40
- [64] Nguyen T., Francis M. B. **Practical Synthetic Route to Functionalized Rhodamine Dyes.** *Organic Letters*, 2013, 5(18): 3245-3248
- [65] Oh N. and Park J.-H., **Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells.** *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9(1): 51-53
- [66] Mazuel F., Espinosa A., Luciani N., Reffay M., Le Borgne R., Motte L., Desboeufs K., Michel A., Pellegrino T., Lalatonne Y. and Wilhelm C., **Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels.** *ACS Nano*, 2016, 10(8): 7627-7638.

PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych ráda poděkovala všem, kteří se jakýmkoli způsobem podíleli na tvorbě této diplomové práce. Největší dík patří mému školiteli Ondrovi Kamanovi za zasvěcení do tajů světa nanočástic, a především pak za jeho trpělivé vedení, ochotu a cenné rady během vypracovávání této práce. V neposlední řadě mu patří velké díky také za měření TEM, RTG difrakce a SQUID.

Děkuji svému konzultantovi Honzovi Kotkovi za věcné rady a připomínky. Děkuji Jarmilce Kuličkové za změření excitačních a emisních spekter. Duckovi a Kubovi Koktanovi děkuji za provedené chemické analýzy. Děkuji Danovi Jirákovvi za měření MRI. Vítovi Herynkovi děkuji za pomoc při měření relaxivit. Děkuji všem bývalým i současným členům laboratoří „19“ (PřF UK) a „LOM“ (FZÚ AV ČR) za vytvoření přátelské atmosféry a za pomoc při překonávání experimentálních i životních překážek.

Děkuji Prof. RNDr. Janu Černému, Ph.D. a všem členům Laboratoře buněčné imunologie (PřF UK) za přátelskou atmosféru, za zasvěcení do práce s buněčnými kulturami, za nespočet konzultací, cenných rad a připomínek týkajících se buněčné biologie a fyziologie. Děkuji Valice Grobárové za měření na průtokovém cytometru; Báře Pavlů a Alče Koukalové pak velmi děkuji za pomoc při měření na tomto sofistikovaném stroji. Prof. Janu Černému děkuji také za pomoc při pořizování snímků na různých typech fluorescenčních mikroskopů, za tipy a rady při tvorbě trvalých preparátů a za prozrazení mikroskopovacích triků vedoucích ke skvělým snímkům a videím.

Také bych ráda poděkovala rodičům za všestrannou podporu během celého mého studia. Děkuji svému příteli a všem kamarádům, kteří se nejrůznějšími způsoby podíleli na zpestření volných chviliek mezi studiem, experimentováním, prací a sepisováním.

Speciální poděkování patří mému nadřízenému prof. MUDr. Luďku Červenkovvi, CSc. MBA, bez kterého by s největší pravděpodobností tato práce nikdy nespátřila světlo světa. Velké díky patří i všem kolegům z OKRV (IKEM) za jejich nekonečnou velkorysost a toleranci vůči mým studijním povinnostem v průběhu akademických let.