

Cytotoxicita nanočástic

Lucie Musilová

Bakalářská práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Musilová**
Osobní číslo: **T11455**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Cytotoxicita nanočástic**

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými informacemi o možnostech přípravy nanočástic a především možnostech testování jejich materiálových a biologických vlastností. Tyto informace pak shrne v rámci teoretické části své práce. Prakticky se seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a osvojí si základní techniky práce v laboratoři. V praktické části provede a vyhodnotí testy cytotoxicity připravených nanočástic.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Polymers for regenerative medicine. Publisher: Berlin ; New York : Springer, (2006) ISBN 3540333533.

Biomedical technology and devices handbook. Publisher: Boca Raton : CRC Press, (2004) ISBN 0-8493-1140-3

Cell Biology: A Laboratory Handbook, Four Volume Set. Publisher: Academic Press, 3 edition (July 18, 2005). ISBN-10: 0121647307.

Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique. Publisher: Wiley-Liss; 5 edition (July 29, 2005) ISBN-10: 0471453293.

Culture of Cells for Tissue Engineering. Publisher: Wiley-Liss; 1 edition (February 3, 2006) ISBN-10: 0471629359.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

10. ledna 2014

Termín odevzdání bakalářské práce:

28. května 2014

Ve Zlíně dne 7. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: MUSILOVA LUCIE.....

Obor: CHEMIE A.....
TECHNOLOGIE MATERIÁLŮ

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 1.5.2014


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Nanočástice magnetických oxidů železa mají vlastnosti vhodné pro využití v biomedicínských aplikacích a jejich nízké koncentrace nejsou považovány za cytotoxické. Předmětem práce bylo posoudit toto tvrzení a zjistit další možné vlivy nanočástic na buněčnou linii myších fibroblastů. Byl posuzován vliv extraktu nanočástic, přímý vliv nanočástic na buněčnou kulturu a vliv na buněčnou migraci.

Klíčová slova: Nanočástice, magnetit, maghemit, cytotoxicita, buněčná linie NIH/3T3.

ABSTRACT

Magnetic iron oxide nanoparticles have properties suitable for use in biomedical applications. One of them is the low cytotoxicity, mainly in low concentrations. The aim of this work was to determine not only its impact on cytotoxicity but also other possible effect of nanoparticles on the cell line of mouse fibroblasts. Extract of nanoparticles, influence of nanoparticles in direct contact with the cells and also the effect on cell migration were tested.

Keywords: Nanoparticles, magnetite, maghemite, cytotoxicity, cell line NIH/3T3.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Petrovi Humpolíčkovi, Ph.D., za vstřícný přístup a mnoho odborných rad, které mi poskytl při vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zdence Kucekové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři buněčných kultur.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 NANOMATERIÁLY	12
1.1 HISTORIE	12
1.2 VYUŽITÍ NANOMATERIÁLŮ	13
1.2.1 Medicína	13
1.2.2 Průmysl	13
1.2.3 Rizika nanomateriálů	14
2 OXIDY ŽELEZA	16
2.1 BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE	16
2.2 FORMY	18
2.3 STRUKTURA A MAGNETICKÉ VLASTNOSTI.....	19
2.3.1 Maghemit	21
2.3.2 Magnetit	22
2.4 PŘÍPRAVA	23
2.4.1 Chemické metody	24
2.4.1.1 Chemické vysrážení.....	24
2.4.1.2 Tepelný rozklad organokovových sloučenin	25
2.4.1.3 Redukce organických sloučenin.....	25
2.4.1.4 Metoda sol-gel.....	25
2.4.1.5 Hydrotermální reakce	26
2.4.2 Fyzikální metody	26
2.4.2.1 Výroba z magnetických pigmentů.....	26
2.4.2.2 Depozice z plynné fáze	27
2.4.2.3 Průtoková injekční syntéza	27
2.4.2.4 Elektrochemická metoda.....	27
2.4.3 Biologické metody.....	28
2.4.3.1 Biomineralizace magnetických oxidů železa	28
3 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ MATERIÁLŮ	29
3.1 OBECNÉ PRINCIPY BOKOMPATIBILITY	29
3.2 SPECIFIKA TESTOVÁNÍ NANOMATERIÁLŮ.....	30
3.3 MECHANISMY ÚČINKU.....	31
3.3.1 Reaktivní formy kyslíku	31
3.3.1.1 Volné reaktivní formy kyslíku	31
3.3.1.2 Fagocyty produkované reaktivní formy kyslíku	32
4 CHARAKTERIZACE NANOČÁSTIC	34
4.1 FYZIKÁLNÍ CHARAKTERIZACE.....	34
4.1.1 Dynamický rozptyl světla	34
4.1.2 Elektronová mikroskopie	34
4.1.3 Rentgen-difrakční metoda.....	35
4.1.4 Vibrační magnetometr	35
4.2 BIOLOGICKÉ CHARAKTERIZACE	35
4.2.1 In vitro.....	36

4.2.1.1	Buněčné kultury	36
4.2.1.2	Toxicita	37
4.2.1.3	Pronikání skrze membránu	38
4.2.1.4	Aktivace imunitního systému.....	39
4.2.2	In vivo	39
II	PRAKTICKÁ ČÁST	40
5	CÍL PRÁCE.....	41
6	MATERIÁL A METODIKA	42
6.1	TESTOVANÉ NANOČÁSTICE OXIDŮ ŽELEZA	42
6.2	POUŽITÉ BUNĚČNÉ KULTURY	42
6.3	PŘÍSTROJE.....	42
6.4	EXPERIMENT	43
6.4.1	Kultivace a trypsinizace.....	43
6.4.2	Přidání vzorku	43
6.4.3	MTT test.....	44
6.4.4	Fluorescenční mikroskopie	45
7	VÝSLEDKY	47
7.1	STANOVENÍ CYTOTOXICITY EXTRAKTU NANOČÁSTIC NA LINII NIH/3T3	47
7.2	STANOVENÍ CYTOTOXICITY PŘÍMÉHO KONTAKTU NANOČÁSTIC S BUNĚČNOU LINIÍ NIH/3T3.....	51
7.3	BUNĚČNÁ MIGRACE.....	53
8	DISKUZE	56
	ZÁVĚR	58
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	67
	SEZNAM TABULEK	68

ÚVOD

Cílem práce je stanovit cytotoxicitu nanočástic magnetických oxidů železa, která je jednou z mnoha položek testovaných v rámci stanovení biokompatibility. Pro stanovení byla využita buněčná linie myších fibroblastů, což jsou buňky vazivové tkáně. V práci byl dále posuzován vliv na buněčnou migraci, která je důležitá například při hojení ran.

Nanočástice magnetických oxidů železa jsou díky svým magnetickým vlastnostem, snadné syntéze a nanorozměrné velikosti vhodnými kandidáty pro biomedicínské aplikace. Pro použití v takovýchto aplikacích je vyžadována biokompatibilita materiálu, kterou rozumíme schopnost materiálu fungovat v živém organismu s požadovanou reakcí v konkrétní aplikaci. Konkrétně byl posuzován vliv magnetitu a maghemitu, které jsou vhodné pro své uplatnění v aplikacích, jako jsou nosiče léčiv, při lokální hypertermii a také jako kontrastní látky pro magnetickou resonanci.

Teoretická část práce je zaměřena nejen na mechanismy účinku nanočástic a konkrétní využití v biomedicině, ale i na fyzikální strukturu, vlastnosti a přípravu nanočástic oxidů železa. V praktické části práce je následně posuzován vliv nanočástic magnetických oxidů železa na buněčnou linii. Byl testován extrakt nanočástic, vliv nanočástic v přímém kontaktu s buňkami a vliv na buněčnou migraci. Vyhodnocení bylo provedeno MTT testem, fluorescenčním mikroskopem a mikroskopem s fázovým kontrastem, který umožnil zhodnotit morfolologii a výskyt apoptických buněk.

Jelikož jsou nanočástice oxidů železa známy poměrně dlouhou dobu jsou nízké koncentrace považovány za necytotoxické, což bylo dokázáno i v naší práci. Přestože bylo provedeno množství testů, jsou nanočástice magnetických oxidů železa i v současnosti předmětem výzkumu, díky nedávno objeveným interakcím s buněčnými mikrostrukturami.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NANOMATERIÁLY

Jako nanomateriály, nebo také nanostrukturní materiály, se označují materiály, jejichž stavebními prvky jsou nanočástice s přesně definovanými vlastnostmi a rozměry. Prostorové uspořádání nanočástic může tvořit struktury jako vlákna, trubice nebo tenké vrstvy (Šrámek, 2009). Za nanomateriál je považován materiál, který má alespoň jeden rozměr o velikosti 1-100 nm (Markides, Rotherham a Haj, 2012) a zároveň může mít jeden rozměr o několik řádů vyšší než nanometrový. Takové materiály nám nabízí široké spektrum využití. Obvykle jsou vyrobeny z látky, jejíž složení již známe, ale vlastnosti způsobené nanoformou jsou pro nás nové a mnohdy lepší. „V nanoformě je dosud k dispozici cca 44 prvků periodické tabulky a jejich sloučenin a další stále přibývají. V současnosti se ale nejčastěji používají nanočástice přechodných kovů (např. nanostříbro, nanoželezo), křemíku, uhlíku (uhlíkaté nanotrubičky, dendrimery) a oxidy kovů (titanu, zinku a ceru)“ (Sovová a Kočí, 2012, s. 82). Počet anorganických i organických nanomateriálů, které nám umožňují nové mechanické, katalytické, elektrické, magnetické, optické a elektronické funkce (Alagarasi, 2011), se stále zvyšuje, což dokazuje každoročně rostoucí počet článků týkajících se nanomateriálů a medicíny publikovaných na Web of scienceTM. Články vydané v roce 2000 tvořily 1 % z celkového počtu těchto článků. Počet se značně zvýšil okolo roku 2006, kdy články vydané v tomto roce představovaly 5,5 %. Každým rokem přibude téměř 1 %, což poukazuje na to, že obor nanotechnologií se neustále vyvíjí.

1.1 Historie

Nanomateriály nejsou původně lidským výtvořem, neboť jsou vytvářeny i bez lidské pomoci. Původcem přírodních nanomateriálů mohou být například požáry, vulkanická aktivita, eroze a další. Dále mohou nanomateriály vznikat i biologickými procesy, jako například metabolickými procesy magnetotaktických bakterií. Ale za produkci nanomateriálů může i lidská činnost, jako jsou spalovací procesy v dopravě i energetice, opotřebování pneumatik atd. (Sovová a Kočí, 2012).

První vědecká zpráva o nanomateriálech pochází z roku 1857, kdy byly syntetizovány částice koloidního zlata Michaelem Faradayem (Faraday, 1857). Na počátku čtyřicátých let 19. století byly vyráběny křemenné nanočástice, které se prodávaly v USA a Německu jako náhrada za jemnozrnné saze pro zpevnění pryže. Nanočástice oxidu křemičitého mají využití v množství každodenního spotřebního zboží, jako jsou například automobilové pneumatiky nebo optická vlákna (Alagarasi, 2011).

V 50. a 60. letech 19. století byla věnována větší pozornost využití nanočástic v oblasti léčiv. Prvním průkopníkem v této oblasti byl profesor Peter Paul Speiser. Jeho výzkumná skupina zkoumala polyakrylová léčiva pro perorální podání, poté se zaměřila na mikroskopii a na konci 60. let vyvinula první nanočástice pro účely řízeného uvolňování léčiv a vakcín (Prantha et al., 2010).

1.2 Využití nanomateriálů

Nanomateriály mají díky svým specifickým vlastnostem jedinečné využití, ale taktéž mohou představovat jisté nebezpečí, o kterém se více zmíním v podkapitole Rizika nanomateriálů.

1.2.1 Medicína

Nanomateriály nacházejí využití v širokém spektru biomedicínských aplikací jako je např. tvorba implantovatelných senzorů (Wujcik a Monty, 2013), v kinetice léčiv (Li et al., 2012), regenerativní medicíně (Bressan et al., 2013), léčbě nádorových onemocnění, nejčastěji prostaty (Sanna a Sechi, 2012) nebo při výrobě desinfekčních roztoků a gelů na rány (Wujcik a Monty, 2013). Nanočástice se také využívají jako nanoroboti o velikosti 0,5-3 μm , kteří slouží jako podpora imunity, pomáhají při ateroskleróze, poškození mozku a v zubním lékařství slouží k lokální anestezii i k opravám skloviny (Kanaparthi a Kanaparthi, 2011).

1.2.2 Průmysl

Jedním z nejznámějších nanomateriálů jsou saze, což jsou částice amorfního uhlíku o velikosti 10-500 nm. Saze se začaly průmyslově vyrábět před více než 100 lety a to nedokonalým spalováním organických látek, které jsou bohaté na uhlík. Dnes patří mezi nejpoužívanější nanomateriály, jejichž většina je spotřebována v gumárenském průmyslu pro výrobu technické pryže (VŠB-TU Ostrava, © 2007).

Další, výhradně uhlíkatou molekulou, jsou fullerény, které byly objeveny začátkem 90. let. V molekule je uspořádáno šedesát atomů uhlíku, které na povrchu tvoří vzor fotbalového míče. Fullerény jsou využívány především díky jejich vlastnostem, jako je supravodivost, tvrdost, magnetické účinky a léčivé chování jejich derivátů. V nedávné době bylo zjištěno, že lze fullerény vyrábět jako úzké, dlouhé trubičky, které vykazují vysokou pevnost, což umožňuje použití v konstrukčních aplikacích (Kubínek a Stránská, [b. r.]).

Využití mají i nanoprášky oxidu zirkoničitého (ZrO_2) a oxidu titaničitého (TiO_2), které se používají pro výrobu laků s reflexními vlastnostmi, skel s optimálním ztmavením, dobrým odrazem slunečních paprsků. Nanočástice oxidu křemičitého (SiO_2) se využívají v brýlích, zrcadlech v koupelnách nebo sklech automobilů, kde zabraňují srážení vody (Kubínek a Stránská, [b. r.]).

V elektronice nacházejí nanočástice uplatnění jako součást fotočlánků, optických zařízení, vysokokapacitních médií, čidel, detektorů a nanostrukturálních povlaků se také nanáší na některé části strojů, kde chrání před opotřebením a oděrem. Nanorozměrné kovové prášky se používají pro výrobu plynotěsných materiálů a porézních vrstev (Kubínek a Stránská, [b. r.]).

Mezi významné materiály patří ty, jež obsahují železo a to díky svým magnetickým vlastnostem. Hlavní výhodou nanorozměrného železa ve srovnání s ostatními nanomateriály je relativně nízká toxicita a biologická rozložitelnost. Navíc je železo poměrně levné a rozšířené. Nanomateriály obsahující železo mohou být užitečné při odstraňování mnoha nečistot z pitné vody, včetně virů, bakterií, chlóru, dezinfekcí a ostatních chemikálií (Amin a Pei-Yoong, 2009).

1.2.3 Rizika nanomateriálů

S rozvojem nanotechnologií přichází zvyšující se koncentrace nanočástic v životním prostředí. Například výskyt uhlíkových trubic, nanočástic na bázi kovů (Fe, Ti, Al, Zn), nanočástic zlata a stříbra, nanotextilií, nanočástic vzniklých rozpadem umělých hnojiv, nanomateriálů využívaných pro dekontaminaci a další. Jelikož gravitace působí na nanočástice díky jejich velikosti minimálně, vznášejí se ve vzduchu déle a nastává riziko inhalace nanočástic. Mezi významné zdroje nanočástic patří automobilová doprava. Používáním dieslových motorů, ale i brzděním, se do ovzduší dostává elementární uhlík ve formě sazí, což může způsobit kardiovaskulární, respirační a další onemocnění. Dalšími nanomateriály znečišťujícími životní prostředí jsou nanoprášky TiO_2 a ZnO , které se přidávají do opalovacích krémů. Po nedostatečném vstřebání a opláchnutí se tyto nanočástice mohou dostat do vodního prostředí. Nanoprášky jsou také přítomny v nátěrových hmotách a jsou složkou pigmentů, odkud se mohou po kontaminaci půd a vod dostat do rostlin průmyslově využívaných člověkem. Ovšem díky nekonvekčnímu chování nanomateriálů je těžké předpovědět vliv na populaci a životní prostředí (Filipová, Kukutschová a Mašláň, 2012).

To, že nanomateriály nemusí být jen užitečné, ale i škodlivé, zjistil například výzkumný tým Brenta Stephense, který se zabýval 3D tiskárnami používanými v domácnostech a kancelářských prostorách. Stolní 3D tiskárny neobsahují odsávací a likvidační zařízení, a proto nemohou likvidovat kapičky, které vznikají vstříkáním zahřátého termoplastu do formy. Při omezeném větrání se místnost plní aerosoly a to rychlostí 20-200 miliard částic za minutu, což závisí na zvoleném materiálu, který může být kyselina polymléčná nebo akrylonitril-butadien-styren. Ten ale není biokompatibilní s našimi buňkami a částice ani nemusí být toxické, aby mohly způsobit oxidační stres, záňety, infarkt a oslabit imunitní systém (Stephens et al., 2013).

2 OXIDY ŽELEZA

Jednou z významných a rozvíjejících se oblastí nanotechnologií jsou magnetické nanomateriály, které jsou široce využívány v mnoha aplikacích. Nejčastěji jsou využívány právě oxidy železa (iron oxides), které patří mezi nejběžnější oxidy na Zemi. Jsou součástí mnoha geologicky a archeologicky významných pozemských i mimozemských vzorků (Zboril, Mashlan a Petridis, 2002). Oxidy železa můžeme nalézt ve všech složkách globálního systému: atmosféře, pedosféře, biosféře, hydrosféře a litosféře a kromě hematitu, jsou v malé míře přítomny i v živých organismech (Cornell a Schwertmann, 2003).

Oxidy železa mohou být získávány jako většinou nepoužitelné vedlejší produkty při těžbě neželezných kovů. Železo je přítomno v rudách Co, Zn, Al, Pb, Mn a Ti a musí být odstraněno (jako oxidy železa) během zpracování. Oxidy železa jsou také nežádoucí složkou kaolínu, kde jejich přítomnost snižuje bělost porcelánu. Oxidy železa znečišťují dodávky vody a také způsobují nevzhledné oranžové skvrny na stěnách a chodnicích, které jsou způsobeny zaléváním trávníků vodou obsahující železo (Cornell a Schwertmann, 2003).

2.1 Biomedicínské aplikace

Pro biomedicínské aplikace jsou významné pouze dvě formy oxidů železa a to maghemit a magnetit, které se používají díky jejich velikosti, magnetickým vlastnostem, snadné syntéze a biokompatibilitě. Nanočástice magnetických oxidů železa tedy můžeme použít pro různé biomedicínské aplikace, jako jsou například genové terapie, značení buněk, magnetické separační technologie, včasné odhalení zánětlivých, nádorových onemocnění, diabetu a aterosklerózy a jako nosiče léčiv (Mody et al., 2010). Nosiče musí být dostatečně malé pro průchod kapilárami, mít adekvátní odpověď na magnetické pole a možnost nést množství chemických látek. Dále by uvolňování léčiv mělo být předvídatelné, snadno ovlivnitelné a neměl by být problém je rozložit nebo vyloučit z těla (Krishnan, 2010).

Nosiče léčiv jsou složeny z magnetického jádra, které umožní přesunutí celého systému do požadovaného místa za použití vnějšího magnetického pole. Jádro nosiče je pokryto obalem, který nese a následně uvolní léčiva (Reddy et al., 2012). Jako obal se například používá poly(N-isopropylakrylamid) (p-NIPAAm), což je polymer citlivý na teplotu. Pod teplotou 25-37 °C je hydrofilní, ale nad ní se stává hydrofobní. Tím dochází k porušení vazeb a následnému uvolnění léčiv do okolí. Pokud pokryjeme magnetické nanočástice železa

p-NIPAAm, můžeme teplotu zvýšit například externě použitím střídavého magnetického pole a tím uvolnit látky (Krishnan, 2010). Účinnost takto dopravených léčiv je dána jejich vzdáleností od cílové tkáně a také fyziologickým stavem pacienta (Reddy et al., 2012).

Jinou oblastí, ve které jsou hojně využívány magnetické částice, jsou kontrastní látky pro magnetickou rezonanci (MR), která poskytuje anatomické obrazy s vysokým rozlišením. Látky pro MR musí pozitivně působit na parametry, které ovlivňují kontrast a to nejlépe při co nejnižší koncentraci, aby nedocházelo k toxickým účinkům. Také musí být schopny zůstat v cílovém místě po dobu zobrazování a následně být odstraněny z těla, aby se minimalizovaly možné nežádoucí následky. Tyto látky musí být vysoce magnetické, abychom získali dobré rozlišení obrazů magnetické resonance, a jejich volba závisí na cílové tkáni, což ovlivňuje způsob, jakým budou látky do tkáně dodány (Krishnan, 2010). Obalené částice vydrží v krevním oběhu déle, proto jsou vhodné například pro zobrazování lymfatických uzlin a krevního oběhu. Pro označení buněk se nejčastěji využívají tyto dvě možnosti: připojení částic na povrch buněk nebo endocytóza částic buňkami díky ligandům, kterými se upraví povrch částic (Gupta a Gupta, 2005).

Magnetické nanočástice oxidů železa se dále využívají k fluidní hypertermii, kde je cílem lokální ohřev na 42 až 46 °C, což je teplota při které může dojít k poškození nebo zničení nádorových buněk a to díky větší afinitě částic k nádorovým buňkám. Ve většině nádorů je totiž malé množství živin, kyslíku a nižší pH, a díky tomu jsou nádory více citlivé na teplo ve srovnání s normální tkání. Právě toho se využívá při použití lokální hypertermie pro léčbu rakoviny. Zvýšení teploty má vliv nejen na nádorové buňky, ale i na funkce strukturních a enzymatických proteinů, které ovlivňují růst buněk a jejich diferenciaci, ale mohou také způsobit poškození nenádorových buněk. Proto musíme teplotu a čas určit tak, aby k tomuto nepříznivému účinku nedocházelo. Množství vyprodukovaného tepla je dáno magnetickými vlastnostmi nanočástic a také silou vnějšího magnetického pole (Krishnan, 2010).

V současnosti klinicky používány dva typy nanočástic magnetických oxidů železa, které se využívají při magnetické rezonanci pro zobrazování jater a sleziny. Prvním je Feridex I.V. ®, který byl vyvinut společností AMAG Pharma. Jedná se o superparamagnetické částice potažené dextranem o velikosti 120 – 180 nm. Druhým přípravkem je Resovist ®, který byl vyvinut společností Bayer Schering Pharma AG. Částice jsou superparamagnetické a jsou potaženy carboxydextranem s průměrem 45 – 60 nm (Wang, 2011).

Oxidy železa jsou v těle přítomny i přirozeně, kde stejně jako ostatní minerály, mají četné funkce například v udržování homeostázy, podílejí se na metabolismu železa, zajišťují tvrdost a hustotu struktur jako jsou například zuby (Cornell a Schwertmann, 2003).

2.2 Formy

Oxidy železa existují v přírodě v mnoha formách. Jako magnetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), který je pravděpodobně nejběžnější. Největší význam pro biomedicínské aplikace, díky svému magnetismu, má magnetit a maghemit, které jsou si podobné svou strukturou a vlastnostmi, a proto také mají shodné využití.

Většina oxidů a hydroxidů železa jsou krystalické. Krystalický stav a velikost krystalů závisí na podmínkách, za kterých krystaly vznikaly. Zatímco $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ má romboedrickou strukturu, Fe_3O_4 a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ mají krychlovou. Každá struktura má odlišné magnetické chování, které udává následné využití (Cornell a Schwertmann, 2003).

- $\alpha - \text{Fe}_2\text{O}_3$

Forma alfa, neboli hematit je nejdéle známý a nejvíce prozkoumaný z oxidů železa a je rozšířen v mnoha horninách a zeminách (Amin a Pei-Yoong, 2009). Je to červenohnědá, anorganická sloučenina, která je v přírodě paramagnetická (Mody et al., 2010) a je významnou rudou a neméně důležitým pigmentem. Hematit je nejčastěji se vyskytující polymorf v přírodě s romboedrickou strukturou. Hematit je jeden z konečných produktů tepelných přeměn různých železnatých i železitých sloučenin a také jiných oxidů železa (Cornell a Schwertmann, 2003). Lehce kalcinovaná forma hematitu se používá k leštění zlata a stříbra, zatímco silněji kalcinovaný hematit slouží k leštění mosazi a oceli (Zboril, Mashlan a Petridis, 2002).

- $\beta - \text{Fe}_2\text{O}_3$

Beta je fáze připravovaná pouze synteticky bez jakékoli zmínky přirozeného výskytu. Má prostorově centrovanou kubickou strukturu, je magneticky nestabilní při pokojové teplotě a vykazuje paramagnetické chování. Vyrobit $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ se zatím podařilo pouze v několika chemických a fyzikálních postupech a byly vyvinuty pouze dvě metody pro přípravu čistého $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Tato forma byla objevena jako meziprodukt při redukci hematitu uhlíkem a při teplotách nad $500\text{ }^\circ\text{C}$ přechází na fázi alfa (Cornell a Schwertmann, 2003).

- $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$

Gama je druhou fází, která se vyskytuje v přírodě jako červeno-hnědý minerál maghemit, který vzniká oxidací černého magnetitu. Vyskytuje se v půdách jako výsledek zvětrávání magnetitu nebo zahřívání ostatních oxidů železa (Cornell a Schwertmann, 2003). Maghemit má nejširší oblast použití a to díky své silné magnetické odezvě ve vnějším magnetickém poli a také díky tomu, že při malých rozměrech vykazuje superparamagnetismus (Cabáková, 2012).

- ϵ - Fe_2O_3

Epsilon fáze, která je nejmladší se strukturálně liší od hematitu i maghemitu a má kosočtverečnou strukturu. Tvoří přechod mezi fází alfa a gama. Důkazem je fakt, že se ϵ - Fe_2O_3 zatím nepodařilo připravit v čistém stavu. Vždy jde totiž o směs s alfa nebo gama fází. Při teplotách 500 °C – 750 °C přechází na hematit (Cornell a Schwertmann, 2003).

- Amorfní Fe_2O_3

Amorfní oxid železitý je tvořen z velmi malých částic, které mají méně než 5 nm v průměru. Amorfní oxidy mají velký potenciál v oblasti solární přeměny energie, elektroniky, elektrochemie, výrobě skladovacích magnetických médií a čistících procesů. Je významný pro své superparamagnetické chování, velký povrch nanočástic a má dobrou katalytickou aktivitu (Zboril, Mashlan a Petridis, 2002).

- Fe_3O_4

Magnetit je také známý jako černý oxid železa, magnetická železná ruda, magnetovec. V přírodě se vyskytuje ve velkých krystalech, u kterých dochází k velmi pomalé oxidaci, ale naopak u syntetických nanočástic do 100 nm je nutná ochrana proti korozi (Cornell a Schwertmann, 2003). Magnetit vykazuje nejsilnější magnetismus ze všech kovových oxidů (Mody et al., 2010). Můžeme ho nalézt nejen v přírodě, ale také v mnoha organismech, kde slouží jako pomůcka při orientaci. Takto magnetit využívají včely, holubi, magnetické bakterie a řasy (Cornell a Schwertmann, 2003).

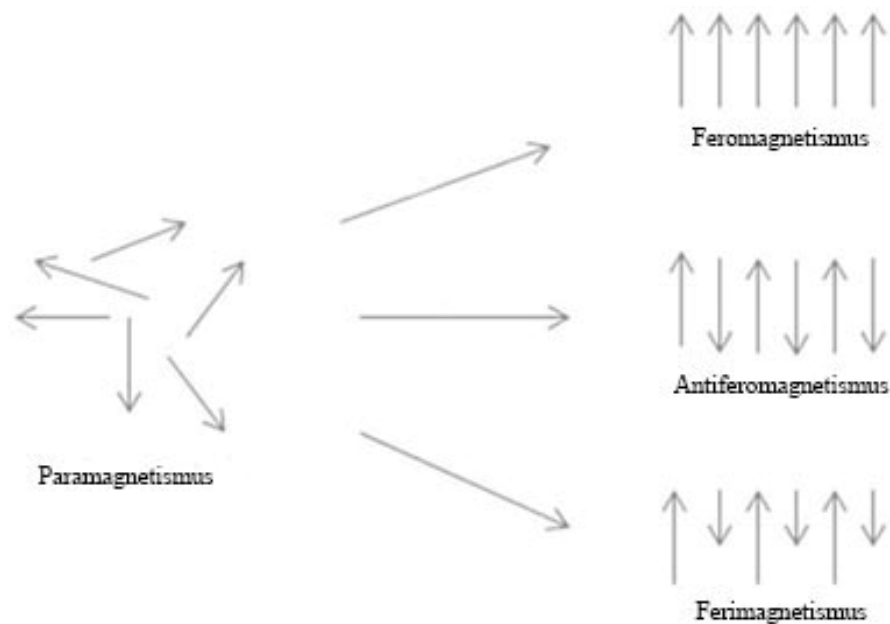
2.3 Struktura a magnetické vlastnosti

V nanometrových velikostech se vlastnosti materiálu podstatně mění v porovnání s běžným materiálem. Dochází především ke zvýšení poměru povrchu k objemu částic, čímž materiál získává nové, nepředpokládané vlastnosti, které jsou mnohdy lepší. Z tohoto důvodu potřebujeme určit vlastnosti těchto materiálů, které pak udávají účinnost a biomedicínské chování nanočástic uvnitř buněk (Munzar a Černožský, 2010). Jejich použití

může být výhodné například díky jejich chemické stabilitě, na rozdíl od běžně používaných velmi malých částic čistých kovů jako například železo, kobalt, nikl (Zboril, Mashlan a Petridis, 2002). Dalším důvodem pro použití oxidů železa jsou magnetické vlastnosti, které závisí na jejich fyzikální struktuře, tvaru částic, na chemické fázi ve které se vyskytují a také na velikosti. Například při rozměrech v rozmezí 6-15 nm vykazují částice superparamagnetismus, ale pokud jsou v rozsahu mikrometrů, jsou feromagnetické (Gupta a Gupta, 2005).

Pro klasifikaci materiálů z nanočástic magnetických oxidů železa je určující jejich reakce na vnější magnetické pole (Gupta a Gupta, 2005), přičemž spin a magnetické momenty elektronů v orbitalech a jádra atomu ovlivňují výsledné magnetické vlastnosti (Kazantseva, 2012). Atom železa má velký magnetický moment, díky jeho čtyřem nepárovým elektronům v jeho 3d orbitalech. Při vzniku krystalů z atomů železa, mohou vznikat různé magnetické stavy zobrazené na obr. 1. V paramagnetickém stavu, jsou jednotlivé atomové magnetické momenty náhodně uspořádány, což způsobuje nulový magnetický moment. Pokud je tento krystal vystaven vnějšímu magnetickému poli, některé z těchto momentů se mohou seřadit stejným směrem a krystal dosáhne malého magnetického momentu (Amin a Pei-Yoong, 2009). Ve feromagnetickém krystalu jsou spiny nepárových elektronů seřazeny stejně, ale feromagnetismus může být pozorován až od určitého počtu atomů. To znamená, že jednotlivé atomy ho nemohou dosáhnout. Po odstranění z magnetického pole vykazuje feromagnetický materiál zbytkovou magnetizaci (Gupta a Gupta, 2005). Ferimagnetický krystal má magnetický moment ze dvou druhů atomů s momenty různých sil, které jsou uspořádány antiparalelně. V případě, že jsou magnetické momenty ve stejném rozsahu, pak je krystal antiferomagnetický a má nulový výsledný magnetický moment (Amin a Pei-Yoong, 2009). Pokud rozměry částic snížíme na kritickou velikost (která je dána vlastnostmi materiálu) můžeme pozorovat významný jev zvaný superparamagnetismus. Výsledná velikost nanočástic je dána především zvolenou syntézou, jejíž průběh udává, jestli budou připravené částice obsahovat více domén s odlišnými magnetickými momenty, nebo jestli budou jedno-doménové. Pokud bude velikost nanočástic menší než je velikost jedné domény, budou vykazovat superparamagnetismus. Superparamagnetické materiály se vyznačují rychlým nárůstem magnetického momentu při aplikaci vnějšího magnetického pole a po jeho odstranění je magnetický moment nulový. To umožňuje stabilitu a disperzi nanočástic, jelikož díky nulovému magnetickému momentu na sebe nepůsobí přitaž-

livě. Proto jsou superparamagnetické nanočástice vhodné pro použití jako kontrastní látky pro magnetickou resonanci nebo jako nosiče léčiv (Kolhatkar et al., 2013).



Obrázek č. 1 Směr jednotlivých atomových magnetických momentů v různých typech materiálů. Upraveno dle Aryn a Pei-Yoong, 2009.

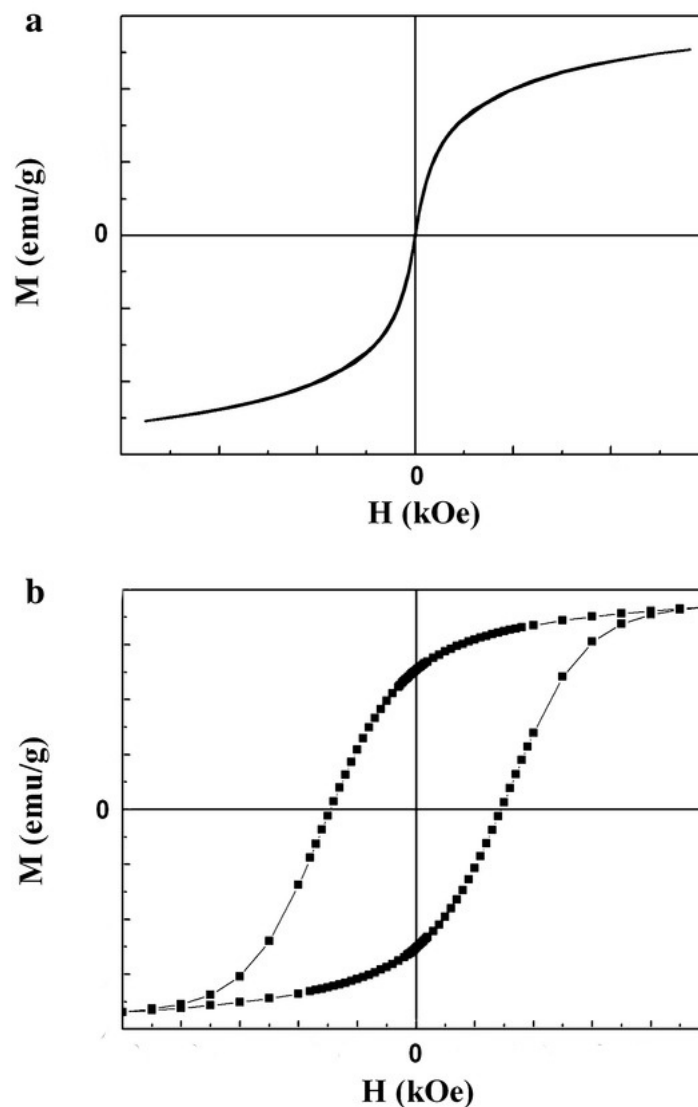
2.3.1 Maghemit

Maghemit je svou strukturou a magnetickými vlastnostmi podobný magnetitu, ale liší se tím, že všechno železo nebo jeho většina je trojmocná (Cornell a Schwertmann, 2003). Maghemit můžeme označit jako typického představitele ferimagnetického materiálu a ve velmi malých částicích (do 10 nm) vykazuje superparamagnetismus (Zboril, Mashlan a Petridis, 2002). Má kubickou soustavu o délce strany 0,834 nm, ve které je 8 železitých kationtů v tetrahedrál ní vrstvě a ostatní jsou rozšířeny po oktahedrál ní vrstvě, kde jsou přítomny i vakance, které také odlišují magnetit od maghemitu. Magnetické momenty železitých kationtů ve vrstvách jsou orientovány antiparalelně, což způsobuje ferimagnetické chování materiálu (Cornell a Schwertmann, 2003). Magnetický moment železitých kationtů v oktahedrál ní vrstvě je totiž větší než v tetrahedrál ní vrstvě (Cabáková, 2012). Uspořádání magnetických momentů klesá se zvyšující se teplotou a materiál ztrácí magnetizaci nad hodnotou T_c (Curierova teplota), jelikož dochází k dezorientaci magnetických momentů (Aryn a Pei-Yoong, 2009). Maghemit je tepelně nestabilní a při vyšších teplotách přechází do alfa fáze, a proto je obtížné přesně tuto teplotu určit, ale je přibližně odhadována v rozmezí od 820 K do 986 K.

2.3.2 Magnetit

Na rozdíl od maghemitu obsahuje magnetit železité i železnaté kationty s plošně centrovanou kubickou strukturou. Délka hrany jedné buňky je 0,839 nm a struktura je složená z oktaedrálních vrstev a tetraedrálních/oktaedrálních vrstev. Osm železitých iontů je v tetraedrálnej poloze, osm železnatých a osm železitých v oktaedrálnej poloze. V oktaedrálních a tetraedrálních vrstvách dochází u železitých kationtů k vzájemnému rušení magnetických momentů, ale magnetické momenty železnatých kationtů v oktaedrálnej vrstvě zůstávají a jsou příčinou ferimagnetismu magnetitu (Cornell a Schwertmann, 2003). T_c magnetitu je 850 K a při velikosti menší než 6 nm vykazuje superparamagnetismus, na který má vliv způsob syntézy (Amyn a Pei-Yoong, 2009).

Mezi důležité veličiny při charakterizaci magnetických materiálů patří magnetizace M a magnetické pole H . Závislost, kde je magnetizace vzorku funkcí vnějšího magnetického pole, je označovaná jako magnetická hysterezní smyčka viz obr. 2 b, která udává magnetické vlastnosti materiálu běžných rozměrů v magnetickém poli a je specifická pro každý materiál. Pokud vzorek není v přítomnosti magnetického pole ($H=0$), tak je demagnetizován a M je tedy rovno 0. Vystavíme-li pak toto těleso magnetickému poli se zvyšující se intenzitou, bude narůstat i jeho magnetizace, až do doby dosažení nasyceného stavu, kdy jsou všechny magnetické momenty orientovány ve směru vnějšího magnetického pole. Nad tímto bodem se při zvyšující intenzitě magnetického pole magnetizace nezvýší. Poté začne intenzita magnetického pole klesat a s ní i magnetizace. Při návratu z nasyceného stavu vzorek neprochází bodem $M=0$, ale bodem zvaným remanentní (zbytková) magnetizace, která v materiálu setrvá i po odstranění z magnetického pole ($H=0$). Koercitivní síla udává potřebnou sílu pro demagnetizaci materiálu, tedy pro odstranění zbytkové magnetizace. S rostoucí koercivitou roste magnetická tvrdost materiálu. Tyto cyklické změny popisuje hysterezní smyčka a její plocha je úměrná práci vnějšího magnetického pole nutné pro remagnetizaci vzorku (Kazantseva, 2012). V případě superparamagnetických nanočástic se nejedná o smyčku, ale pouze o křivku, která nevykazuje hysterezi viz obr. 2 (Kolhatkar et al., 2013).



Obrázek č. 2 Hysterezní křivka superparamagnetického materiálu (a) a feromagnetického materiálu (b), upraveno dle (Li et al., 2010).

2.4 Příprava

Průmyslová výroba částic oxidů železa je především zaměřena na výrobu barev, magnetických pigmentů a chemikálií. Počátečním materiálem pro výrobu oxidů železa jsou téměř vždy železnaté soli, protože výroba je levnější než ze solí železitých. Železité soli jsou používány jen pro produkty vysoké hodnoty. Syntéza je volena pro každý konkrétní výrobek a je ovlivňována mnoha podmínkami (Cornell a Schwertmann, 2003).

Již dlouho vědci a technologové usilovali o syntézu magnetických nanočástic, které by měly požadovaný tvar a velikost, a dnes je to možné. Jsou známy fyzikální metody, jako je depozice z plynné fáze a elektronová litografie, což jsou komplikované postupy, u kterých se nedá dobře řídit velikost částic. Mokré chemické metody jsou pro výrobu

magnetických nanočástic vhodnější, neboť jsou jednodušší, efektivnější a snadno můžeme kontrolovat velikost i složení. Navíc pomocí chemických metod můžeme získat jednotnou velikost částic, což umožňuje širší využití než u částic připravených fyzikálními metodami (Gupta a Gupta, 2005). Výsledná velikost nanočástic je důležitá pro možnost použití v biomedicínských aplikacích. Můžeme připravit ultra malé superparamagnetické částice (USPIO) do 10 nm, které jsou upřednostňovány například při použití v angiografii (vyšetření cév) nebo pro pronikání do nádorů. Dále můžeme vyrobit superparamagnetické částice (SPIO) ve velikosti 10-30 nm, které jsou využívány při vyšetření jater a také částice nad 30 nm, které nejsou z hlediska biomedicíny příliš významné (Roca et al., 2009).

2.4.1 Chemické metody

Jak již bylo zmíněno, chemické metody jsou upřednostňovány a používají se i pro nanočástice využívané v medicíně a to zejména chemické vysrážení a tepelný rozklad organokovových sloučenin.

2.4.1.1 Chemické vysrážení

Srážecí proces ve vodném roztoku je pravděpodobně nejjednodušší a nejefektivnější cestou k chemické syntéze superparamagnetických nanočástic oxidů železa. Metoda je založena na reakcích prováděných ve vodném prostředí, které umožňuje kontrolu nukleace i růstu jader nanočástic. Do zásaditého roztoku (např. NH_4OH nebo NaOH) se přikapává směs solného roztoku Fe (III) a Fe (II) v inertní atmosféře a za zvýšené teploty, čímž dochází k vysrážení magnetitu a maghemitu (Reddy et al., 2012). Jejich výsledná velikost a tvar závisí na typu použité soli (např. chloridy, sírany, dusičnany, chloristany, atd.) a na jejich poměru (Gupta a Gupta, 2005). Běžně se vodné roztoky FeCl_3 a FeCl_2 smísí v koncentračním poměru Fe (III) / Fe (II) = 2/1 ve vodném roztoku amoniaku, čímž se získají nanočástice Fe_3O_4 , $d = 3\text{-}15$ nm. Za účelem přípravy nanočástic s úzkou distribucí, musíme kromě použitých solí dbát na několik dalších parametrů jako pH, teplota a způsob míchání (Oh a Park, 2011). Například přidáváním vody můžeme dosáhnout částic o velikosti 2,7 nm s úzkou distribucí. Tyto částice pak mají na svém povrchu množství hydroxylových skupin, které jsou důležité pro následné biochemické využití (Roca et al., 2009).

Vyloučený magnetit má černou barvu.



Pokud nebude reakce probíhat v bezkyslíkatém prostředí, může docházet k oxidaci železnatých kationtů, čímž by došlo k ovlivnění fyzikálních a chemických vlastností magne-

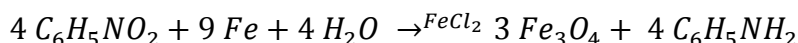
tických nanočástic (Gupta a Gupta, 2005). Aby se zabránilo případné oxidaci a docílilo se stability za fyziologických podmínek, tak se vzniklé nanočástice potahují při nebo po srážení. Mohou být potaženy polymery, organickými kyselinami, fluorescenčními sloučeninami, cukry, které také mohou rozšiřovat funkce celého komplexu (Roca et al., 2009).

2.4.1.2 Tepelný rozklad organokovových sloučenin

Jedná se o jednu z nejpoužívanějších metod přípravy nanočástic magnetických oxidů železa, jelikož umožňuje kontrolu tvaru i velikosti nanočástic s úzkou distribucí velikosti. Touto syntézou získáme vysoce čistý a krystalický magnetit, který získáme z prekursoru, což je acetylacetonát železitý. Významnou roli zde má kyselina olejová, což je povrchově aktivní látka, která umožňuje růst nanočástic a jejich stabilizaci, aby nedocházelo k agregaci. Nevýhodou kyseliny olejové ale je, že vzniklé nanočástice jsou ve vodě nerozpustné, což omezuje možné využití. Před použitím musí být nanočástice přivedeny do vodné suspenze. Přestože takto připravené nanočástice mají vhodně fyzikální vlastnosti pro biomedicínské aplikace, dosud nebyla jejich toxicita dostatečně prostudována, neboť většina testů se provádí na nanočásticích připravených vysrážením z roztoku, protože se příprava provádí ve vodné fázi a povrchová úprava je jednodušší (Gonzales et al., 2010).

2.4.1.3 Redukce organických sloučenin

Dříve byl nitrobenzen redukován na anilin, použitím železa, čímž byly vytvořeny šedo-černé nepoužitelné oxidy železa, ale později bylo zjištěno, že přidáním chloridu železnatého vzniknou oxidy železa vhodné pro použití jako pigmenty.



Po ukončení je anilin oddělen od oxidu železa destilací vodní parou a nezreagované železo je odstraněno. Parametry jako reakční rychlost, povaha a koncentrace přísad mohou ovlivnit výsledné vlastnosti pigmentu. Rychlost reakce má také vliv na velikost částic železa. Výhodou je, že vedlejší produkt anilin je dále použitelný a že nedochází ke vzniku látek škodlivých pro životní prostředí (Cornell a Schwertmann, 2003).

2.4.1.4 Metoda sol-gel

Při této metodě dochází k hydroxylaci a kondenzaci kovových alkoxidů v roztoku za vzniku nanorozměrných pevných částic. Dochází k tvorbě trojrozměrné sítě oxidu kovu, označované jako gel. Krystalický stav se získá při působení vyšších teplot na gel, který vzniká při pokojové teplotě. Proces syntézy ovlivňuje především pH, teplota a volba roz-

pouštědla. Hlavními výhodami této metody je ovlivnitelnost tvaru a velikosti nanočástic (Amin a Pei-Yoong, 2009).

2.4.1.5 Hydrotermální reakce

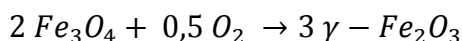
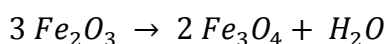
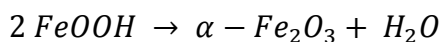
Vysokotlaké hydrotermální metody využívají schopnosti vody dehydratovat a hydrolyzovat soli kovů při vyšším tlaku a teplotě. Výhodná je také velmi nízká rozpustnost výsledných nanočástic ve vodě (Amin a Pei-Yoong, 2009). Reakce probíhá v reaktorech nebo autoklávech při vysoké teplotě (tj. > 200 °C) a vysokém tlaku (tj. > 13 790 kPa). Díky vysoké teplotě dochází k rychlé nukleaci a rychlejšímu růstu nově vznikajících částic, což umožňuje vznik nanočástic o malých rozměrech. Pokud dojde k prodloužení reakčního času, získáme větší částice, naopak pokud zvýšíme obsah vody, částice se budou srážet. Volbou poměru mezi tvorbou jader a růstem krystalů ovlivníme velikost vznikajících částic (Reddy et al., 2012). Výhodou je, že je tato metoda ekologicky neškodná, protože nezahrnuje jakákoliv organická rozpouštědla nebo jejich použití v následných úpravách (Amin a Pei-Yoong, 2009).

2.4.2 Fyzikální metody

Fyzikální metody se využívají zejména pro průmyslové aplikace, ve kterých není nezbytně nutná příprava nanočástic s úzkou distribucí velikosti.

2.4.2.1 Výroba z magnetických pigmentů

Pokud potřebujeme, aby výsledné nanočástice měly dobré magnetické vlastnosti, jako například při použití maghemitu pro magnetická nahrávací zařízení, je vhodné použít goethit (α -FeOOH) nebo lepidokrokit (γ -FeOOH) jako výchozí materiál. Je zapotřebí velmi čistý FeOOH, aby nebyly znehodnocovány magnetické vlastnosti produktu. Prvním krokem procesu je termální dehydroxylace FeOOH na hematit. Hematit je následně redukován při 350-600 °C na magnetit pomocí H_2 . Nakonec je magnetit oxidován na maghemit při 200-500°C (Cornell a Schwertmann, 2003).



2.4.2.2 Depozice z plynné fáze

Metody pro přípravu nanomateriálů v plynné fázi závisí na tepelném rozkladu (pyrolýze), redukci, hydrolýze, disproportionaci, oxidaci nebo jiné reakci, která vede k vysrážení pevných částic z plynné fáze. Pro reakci jsou vyžadovány vysoké teploty, což je nevýhodou této metody (Amin a Pei-Yoong, 2009). Tato metoda vede k jednorozměrným nanostrukturám oxidů železa, můžeme tedy připravit tenké filmy. Reakce je katalyzována částicemi zlata, které jsou přítomny na povrchu substrátu (Reddy et al., 2012).

2.4.2.3 Průtoková injekční syntéza

Syntéza probíhá v kapilárním reaktoru, kde dochází k míchání reaktantů při laminárním proudění. Výhodami této techniky je její jednoduchost a kontrolovatelnost procesu. Nanočástice připravené touto metodou mají úzkou distribuci velikosti v rozsahu 2-7 nm (Reddy et al., 2012).

2.4.2.4 Elektrochemická metoda

Nanočástice magnetitu a maghemitu můžeme připravit i pomocí elektrického proudu. Provádí se ve vodném prostředí, kde je železná anoda, ze které vznikají ionty a následně migrují k platinové katodě. Velikost vysrážených nanočástic je ovlivňována velikostí procházejícího proudu. Výhodou této metody je její jednoduchost a ovlivnitelnost velikosti, ale nevýhodou je velká spotřeba elektrické energie (Reddy et al., 2012).

2.4.3 Biologické metody

Poměrně novou metodou je tvorba magnetických nanočástic oxidů železa pomocí magnetotaktických bakterií.

2.4.3.1 *Biomineralizace magnetických oxidů železa*

Biomineralizací rozumíme biologicky řízenou tvorbu anorganických sloučenin. Tento proces probíhá ve všech organismech a železo může být produkováno v různých formách, ale nejčastěji jako magnetit, který produkují magnetotaktické bakterie například *Magnetospirillum gryphiswaldense*, lososi, pstruzi ale i člověk. Bakterie dokážou mineralizovat nanočástice magnetitu s vysokou čistotou a úzkou distribucí velikosti. Magnetické bakterie s tenkou dvouvrstvou membránou tvoří magnetozomy, které jsou organizovány v řetězcích a slouží při orientaci. Díky tomu se bakterie mohou orientovat a pohybovat podél geomagnetických siločar. Přestože magnetotaktické bakterie byly objeveny již dávno, pozornosti se jim dostalo až v nedávné době a proto podrobný mechanismus tvorby magnetitu není plně popsán. Základní kroky biomineralizace ale jsou známy: dojde k vytvoření váčků magnetozomů a vycytání železa z prostředí, které je následně přemístěno do váčků a nakonec je toto železo vysráženo ve formě magnetitu (Fdez-Gubieda et al., 2013).

3 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ MATERIÁLŮ

Pokud chceme materiál používat v živém organismu, je nutno před jeho použitím zjistit veškeré reakce a vlivy v živém systému.

3.1 Obecné principy biokompatibility

Biokompatibilita je obecný termín používaný k popisu vhodnosti materiálu pro vystavení tkáním nebo tělním tekutinám. Je to schopnost materiálu fungovat s požadovanou reakcí v konkrétní aplikaci. Pokud má být materiál v těle přítomen dlouhodobě či trvale, musí být otestován přesně podle normy ISO 10993-1 např. na cytotoxicitu, alergizaci, dráždivost nebo intrakutánní reaktivitu, systémovou toxicitu, genotoxicitu, implantaci a snášenlivost s krví. V případě zvnějšku vstupujícího nebo implantovaného prostředku se ještě musí provést testování na karcinogenitu a chronickou toxicitu (ČSN EN ISO 10993-1).

Jestliže je použit materiál, který není biokompatibilní, může dojít ke komplikacím, jako například ke vzniku zánětu v místě kontaktu, vzniku degradačních produktů, které mohou být pro tělo toxické, poškození buněk, podráždění kůže, tvorbě krevních sraženin, korozi implantátu a mnoha dalším (Li et al., 2012).

Mechanismus interakcí mezi nanočásticemi a živými systémy není ještě zcela znám. Složitost mechanismu je způsobena schopností částic vázat se a komunikovat s biologickými hmotami a měnit jejich povrchové vlastnosti v závislosti na prostředí, ve kterém se nachází. Dokonce částice stejného materiálu mohou vykazovat zcela rozdílné chování v důsledku drobných rozdílů v povrchové úpravě, náboji nebo velikosti. Jednou z významných složek biokompatibility je toxicita, která závisí na fyzikálně-chemických parametrech, jako je velikost částic, tvar, povrchový náboj a složení. Nanočástice mohou být získány mnoha způsoby a to ve formě polymeru, keramických, kovových nebo uhlíkatých částic. Podle způsobu přípravy mají nanočástice různou velikost, složení, tvar a mohou být s/bez povrchové úpravy. Všechny tyto faktory mohou ovlivnit interakce mezi nanomateriály a buňkami nebo tkáněmi. Složitost se zvyšuje při posunu z *in vitro* k *in vivo* modelům. Pokud jde o nanomateriály, určení míry nebezpečí na *in vivo* úrovni je stále v rané fázi. Plíce, střeva a kůže, které patří mezi hlavní vstupní cesty a domnělé cíle jako plíce, játra, srdce, a mozek již byly u některých nanočástic v *in vivo* systémech prozkoumány, ale dosud nejsou plně známy mechanismy účinku a pochody v těle (Li et al., 2012).

3.2 Specifika testování nanomateriálů

Testování toxicity nanomateriálů stále není plně ustanoveno, díky tomu, že nanotechnologie jsou relativně novou vědou. V současnosti se pracuje na normě ISO/TC 229, která je zaměřena právě na problematiku nanotechnologií, jak uvádí mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO).

Přesto je ale možné konstatovat, že při testování nanomateriálů je důležité určit vhodnou metodu dispergace, charakterizovat daný nanomateriál a zvolit referenční látku (Sovová a Kočí, 2012).

Pro dosažení dispergace je možno použít dispergační látky, sonikaci a míchání. Výhodou sonikace a míchání je, že nepřidáváme další látku, která by mohla mít vliv na výslednou toxicitu, ale nevýhodou je delší doba dispergace. Sonikace je vhodnější než míchání, ale obě jsou rizikové, protože je zde možnost opětovné agregace nanomateriálů po ukončení dispergace a taktéž může nastat poškození struktury nanomateriálů. Přidávkem dispergační látky docílíme jednoduché přípravy, časové nenáročnosti a je zde menší pravděpodobnost opětovné agregace. Dispergace je ale nutná, pokud chceme zjistit rozdíl mezi účinky nano a běžné formy a také, pokud chceme znát mechanismy toxického účinku (Sovová a Kočí, 2012).

Charakterizace testovaných látek je u nanomateriálů podstatně významnější než u konvenčních látek. U běžných látek pro charakterizaci postačí údaj o koncentraci, kdežto u nanomateriálů je podstatnou vlastností velikost, tvar a plocha povrchu částic. Tyto charakteristiky jsou podstatné pro určení toxicity nanočástic. Díky komplexnímu chování nanomateriálů je nutné látku popsat v daných podmínkách prostředí, ve kterém experiment probíhá, a tedy pouze údaj o velikosti není dostačující (Sovová a Kočí, 2012). Před samotným biologickým testováním je vhodné shromáždit existující data, odebrat vzorky, určit velikost a tvar částic, disperzi a povrchové vlastnosti. Při testování nanomateriálů se však můžeme setkat s problémy způsobenými komplexním chováním, které obvykle vyžaduje odlišné zacházení v porovnání s běžnými látkami (Powers et al., 2009).

Neméně důležité je zvolení vhodné referenční látky, jejíž toxicita a mechanismus účinku by již měly být známé. Studie, používající epiteliální buněčné linie a linie buněk makrofágů v dýchacím, zažívacím ústrojí a také v kůži a cévách, patří mezi nejběžnější *in vitro* modely používané pro stanovení toxicity nanočástic. Důležité je napodobit prostředí

in vivo pro získání co nejpřesnějších výsledků a pro pozdější aplikace *in vivo* (Gormley a Ghandehari, 2009).

3.3 Mechanismy účinku

Z účelu, ke kterému nanomateriály slouží, vyplývají i odlišné účinky. Mezi nejčastější mechanismy působení nanomateriálů patří: „1) Poškození membrán a membránového potenciálu, 2) poškození buněčných proteinů, 3) genotoxicita, 4) narušení transportu elektronů v buňce, 5) vznik reaktivních forem kyslíku a 6) uvolňování toxických látek.“ (Sovová a Kočí, 2012, s. 84).

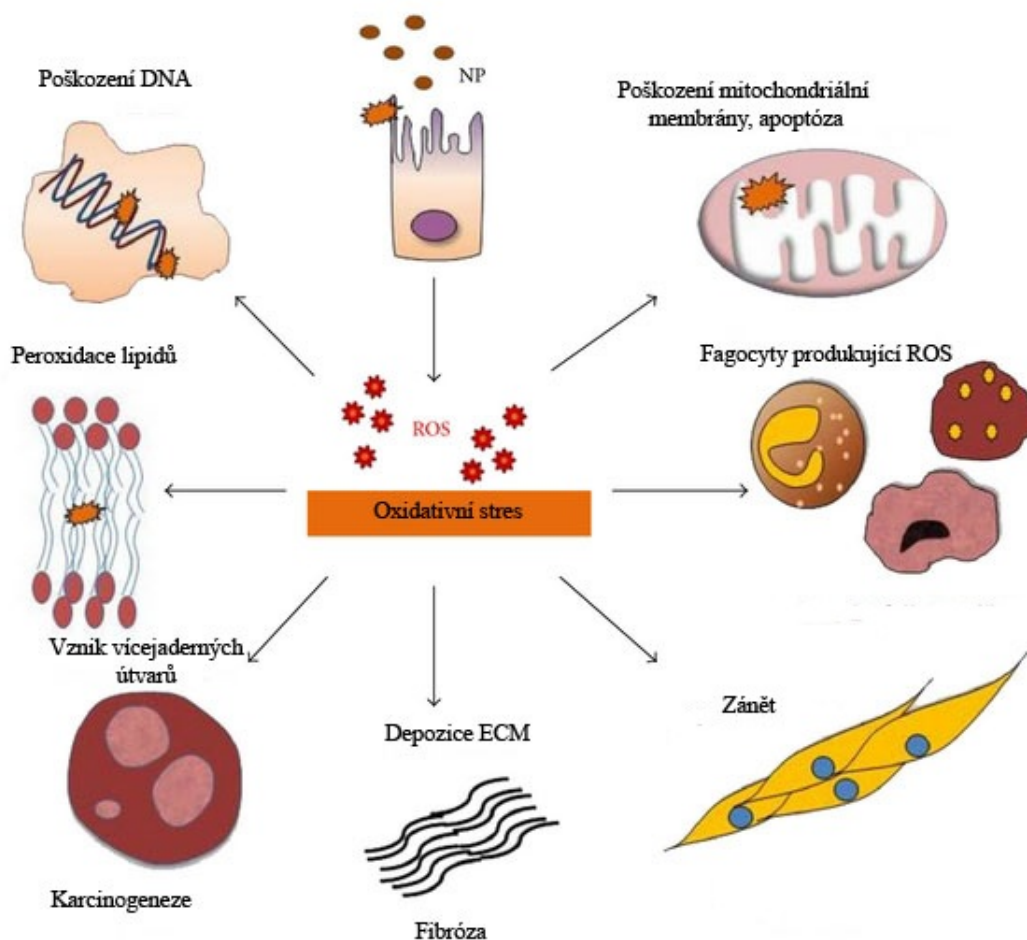
3.3.1 Reaktivní formy kyslíku

Hlavním mechanismem toxicity nanomateriálů je oxidativní stres, který je způsoben nadbytkem reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species). Méně časté jsou reaktivní formy dusíku (RNS), které stejně jako ROS mohou narušit DNA a proteiny, být příčinou zánětu a působit karcinogenně. ROS jsou ve stopovém množství v těle běžně přítomny, ale jsou v rovnováze s antioxidanty, a pokud je tato rovnováha narušena, dochází ke vzniku oxidativního stresu (Manke, Wang a Rojanasakul, 2013). Možné důsledky oxidativního stresu můžeme také vidět na obrázku č. 3.

3.3.1.1 Volné reaktivní formy kyslíku

Mezi nanomateriály způsobující oxidativní stres patří především uhlíkové nanotrubičky a oxidy kovů. Ty mohou produkovat ROS tím, že dochází k reakci peroxidu vodíku s ionty kovů (Fe, Cu, Cr, Co) za vzniku vysoce reaktivních radikálů (O_2 , $HO\cdot$, $HOO\cdot$), které mohou být produkovány také neutrofily a makrofágy při zánětlivé reakci, v přítomnosti nádorových buněk a mikrobů (viz následující podkapitola), nebo mohou vznikat v buňkách, během metabolismu, v respiračním řetězci v mitochondriích, při autooxidaci ad. (Manke, Wang a Rojanasakul, 2013). Mohou tedy být produkovány uvnitř nebo vně buňky a slouží k udržení homeostázy, jsou to signální molekuly a regulují genovou expresi. V nadbytku dochází k oxidativnímu stresu, kdy organismus může reagovat zánětem a následnou protizánětlivou reakcí organismu dochází k uvolnění dalších ROS, zejména z makrofágů (Filipová, Kukutschová a Mašláň, 2012). Tyto částice pak škodí organismu tím, že poškozují biologické makromolekuly změnou jejich struktury a biologické funkce, čímž může dojít například k poškození membránových fosfolipidů, které mohou způsobit depolarizaci membrány a její nefunkčnost může dojít až k buněčné smrti – apoptóze. Bylo prokázáno,

že konkrétně nanočástice oxidů železa způsobují nekrózu a apoptózu buněk myších makrofágů, vykazují akutní cytotoxicitu na lidských bronchiálních epiteliálních buňkách či ovlivňují propustnost lidských vláseničových endoteliálních buněk (Manke, Wang a Rojanasakul, 2013).



Obrázek č. 3 Účinky ROS, upraveno dle Manke, Wang a Rojanasakul, 2013.

3.3.1.2 Fagocyty produkované reaktivní formy kyslíku

Pokud zvažujeme možnosti vstupu nanočástic do buněk, je vhodné vzít v potaz i vstup do makrofágů, což jsou profesionální fagocytující buňky imunitního systému a jsou primární odpovědí na přítomnost cizích látek při *in vivo* testech. Jak uvádí Pisanic, Jin a Shubayev, v mnoha studiích *in vivo* byla zaznamenána velká infiltrace makrofágů a vychytávání nanočástic magnetických oxidů železa. Tyto buňky následně mohou produkovat ROS uvnitř buňky, kde slouží na zničení cizích látek, které byly buňkou pohlceny, nebo vně, kdy dochází ke změnám v mitochondriích, interakcím s dýchacím řetězcem, aktivaci en-

zymových systémů nebo k pozměnění antioxidantní obrany. Následný oxidativní stres je způsoben neschopností biologického systému rychle se zbavit reaktivních meziproductů (Li et al., 2012).

Nanočástice mohou také pomocí endocytózy proniknout membránou buňky a šířit se synapsemi nervových buněk, cévami krevního oběhu a lymfatickými cévami (Li et al., 2012). Různá složení částic, z nichž každé má své specifické vlastnosti, mohou ovlivnit buněčnou fyziologii a způsobovat cytotoxické účinky, které jsou specifické pro každý druh nanočástic, jako je například vnitřní toxicita těžkých kovů. Významná je i velikost. Malé rozměry částic totiž vedou ke konstrukčním změnám a jiným elektrickým vlastnostem a ty způsobují vznik reaktivních skupin na povrchu. Volné radikály mohou být přímo vázány na povrch částic nebo mohou být volně přítomny ve vodné suspenzi. Tyto radikály jsou škodlivé pro buněčné makromolekuly, jako jsou lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny. Poškození DNA je prvním krokem pro mutagenezi, karcinogenezi a stárnutí (Manke, Wang a Rojanasakul, 2013).

4 CHARAKTERIZACE NANOČÁSTIC

Metod pro charakterizaci je velmi mnoho, zde ale budou zmíněny jen některé, související s popisovanou problematikou.

4.1 Fyzikální charakterizace

Jedinečné vlastnosti a funkce nanočástic jsou dány jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Proto je nezbytné stanovení těchto vlastností pro pochopení mechanismu působení nanočástic. To nám také umožní lépe předpovědět účinky nanočástic při testování *in vivo*.

4.1.1 Dynamický rozptyl světla

Velikost je charakteristika, která definuje nanočástice více, než kterákoli jiná. Z tohoto důvodu určení této hodnoty patří mezi první, které by měly být popsány. Určit průměr částic nám například umožňuje dynamický rozptyl světla laserovým zářením, při kterém dochází k „měření fluktuace intenzity rozptýleného světla ze zdroje okolo její průměrné hodnoty“ (Kvítek, Novotný a Píkal, 1998, s 431). Mezi přístroje využívající dynamický rozptyl světla patří Zeta analyzátoři, které mimo charakterizace koloidních disperzí umožňují určit i Zeta potenciál. „Přístroj je schopen měřit vzorky v širokém rozmezí koncentrací a velikostí částic od několika desetin nanometrů až do řádů několika jednotek mikrometrů“ (Karlina, 2012).

4.1.2 Elektronová mikroskopie

Elektronovou mikroskopií se zkoumají pevné předměty pomocí svazku elektronů a mezi hlavní metody patří skenovací a transmisní elektronová mikroskopie.

U transmisní elektronové mikroskopie je zdrojem paprsku elektronů elektronová tryska a pomocí elektromagnetických čoček je proud elektronů zaostřen na vzorek, kterým musí elektrony projít pro obdržení obrazu. Vzorek ale musí být tenký (do 100 nm), proto jsou nanomateriály vhodným vzorkem. Následně elektrony prochází elektromagnetickou optikou, čímž získáme zvětšený obraz a dále jsou elektrony promítnuty na stínítko. Rozdílná propustnost materiálů a odlišné chemické složení ovlivní výsledný obraz. Vhodné vzorky jsou práškové preparáty nebo ultratenké vrstvy. Transmisním elektronovým mikroskopem můžeme určit také distribuci velikosti, tvar částic a velikost je možno rozlišit v rádech desetin nanometru. Tloušťka vzorku se obvykle pohybuje v rozmezí mezi 5 až 300 nm (Dolníček, 2005).

Při skenovací elektronové mikroskopii paprsek elektronů, jehož zdrojem je obvykle wolframové žhavené vlákno neprochází skrz vzorek, ale elektrony se od něj odráží a jsou převedeny na optický signál. Jelikož není třeba, aby elektrony procházely vzorkem, můžeme použít roztoky nebo tlustší vzorky, které musí být vodivě pokovovány, stejně jako u transmisní elektronové mikroskopie. Rozlišení skenovacích elektronových mikroskopů je 2-10 nm a možné zvětšení až 200 000x (Dolníček, 2005).

4.1.3 Rentgen-difrakční metoda

Podrobnější informace o struktuře můžeme dostat Rentgenovým zářením, kde dochází k interakci elektromagnetického záření o vlnové délce okolo 0,1 nm s atomy vzorku ve formě prášku. Pokud je vzdálenost mezi atomy v krystalové struktuře podobná vlnové délce záření, dochází k ohýbání paprsků krystalu (Cornell a Schwertmann, 2003).

4.1.4 Vibrační magnetometr

Tento přístroj slouží k určení magnetických vlastností vzorku a patří mezi nejpoužívanější. Jedná se o magnetometr, ve kterém měřený vzorek vibruje mezi dvěma elektromagnety generující homogenní magnetické pole. Měřením v magnetostatickém poli, které má sílu do 10 kOe, získáme magnetizační křivky, ze kterých můžeme určit hodnotu saturační magnetizace, zbytkové magnetizace a koercivity. Pokud změním sílu elektromagnetického pole, můžeme získat i hysterezní křivku. Vzorek může být ve formě prášku, pevné látky i kapaliny. Velikost vzorku je limitována prostorem mezi póly elektromagnetu (Univerzita Palackého v Oloumouci, © 2009). Zjištěné vlastnosti jsou důležité pro následné použití například při MR.

4.2 Biologické charakterizace

Pro biologickou charakterizaci můžeme testování provádět v prostředí *in vitro* za laboratorních podmínek; *in vivo* neboli v živém prostředí anebo *in silico*, které využívá počítačových simulací dosud známých buněčných procesů.

4.2.1 In vitro

Při testování *in vitro* se používají buněčné kultury živočišných nebo lidských buněk. Mezi výhody testování *in vitro* patří rychlejší získání výsledků, nižší cena, etika, reprodukovatelnost a možnost použití lidských buněk. Nevýhodou ovšem je, že nezjistíme komplexní reakci organismu. *In vitro* umožňuje zkoumat toxicitu a její mechanismy jako je vliv na buňku, cytotoxicita, oxidativní stres, vstup do buňky a další (Filipová, Kukutschová a Mašláň, 2012).

4.2.1.1 Buněčné kultury

Pro následující text je nezbytné uvést, že pojmy buněčná, tkáňová a orgánová kultura nejsou totéž. Buněčné kultury se dnes staly hlavním nástrojem používaným v biomedicině. Buněčnou kulturou rozumíme odstranění buněk z části orgánu před, nebo během kultivace, čímž dojde k narušení vztahů se sousedními buňkami. Tkáňové kultury je pojem pro přemístění buněk, tkání nebo orgánů z živočichů nebo rostlin a jejich následné umístění do umělého prostředí podporující růst buněk. Toto prostředí je obvykle tvořeno vhodnou skleněnou nebo plastovou nádobkou, obsahující tekuté nebo polotekuté médium, které dodává živiny nezbytné pro přežití a růst. Kultura celých orgánů nebo neporušených částí orgánů, u kterých chceme studovat jejich souvislé funkce, nebo vývoj se nazývá orgánová kultura (Ryan, 2008).

Poté co jsou buňky chirurgicky odstraněny z organismu a přemístěny do vhodného kultivačního prostředí, mohou se spojit, rozmnožit a růst. Nazýváme je primární kultura. Pro dosažení rozmnožování buněk jsou dvě možnosti: Vyjmout malý kousek tkáně, který se umístí do skleněné nebo plastové nádoby a ponoří se do kultivačního média. Po několika dnech, se jednotlivé buňky oddělí od tkáně a přesunou se na stěnu kultivační nádoby, kde se začnou dělit a růst. Druhá metoda je více používaná a urychlená přidáním proteolytických enzymů, jako trypsin nebo kolagenáza, které naruší pojivo držící buňky pohromadě. Dojde k vytvoření suspenze jednotlivých buněk, které jsou potom přemístěny do kultivačních nádob obsahujících médium umožňující růst a dělení. Když buňky primární kultury vyrostou a spotřebují všechny substrát, musí jim být pasážováním poskytnut další prostor pro pokračování růstu. To se obvykle provádí jejich šetrným odstraněním ze substrátu s enzymy. Používají se podobné enzymy jako pro primární kulturu, které naruší proteinové vazby spojených buněk. Po oddělení může být buněčná suspenze rozdělena a umístěna do nových kultivačních nádob. Buněčné kultury mohou být dále rozšířeny, cha-

rakterizovány, skladovány. Potencionální nárůst počtu buněk a jejich jednotnost umožňují mnohem širší experimentální možnosti (Ryan, 2008).

Pro růst buněk se používají dva základní kultivační systémy. Jsou především založeny na schopnosti buněk růst buď přisedlé na pevném podkladu (sklo, plast) nebo se volně vznášejí v kultivačním médiu. Buněčné kultury jsou obvykle popisovány na základě jejich morfologie (tvar a vzhled) nebo jejich funkce. Důležité je mít na paměti, že kultivační podmínky hrají důležitou roli ve tvaru buněk. Funkční charakteristika buněčných kultur je dána jejich původem (játra, srdce aj.) a schopností adaptace ke kultivačním podmínkám. Často jsou původní vlastnosti buněk vykazované v *in vivo* ztraceny nebo změněny z důvodu umístění v umělém prostředí. Některé buněčné linie mohou zastavit dělení a vykazovat známky stárnutí, ale jiné se mohou stát nesmrtelnými a dělit se donekonečna. Tato situace může nastat spontánně, nebo může být způsobena záměrným použitím léčiv, radiace nebo virů (Ryan, 2008).

4.2.1.2 Toxicita

Toxicita magnetických nanočástic je ovlivňována rozsahem a kombinací faktorů závisících na vlastnostech samotné magnetické nanočástice, konstrukčních vlastnostech, dávkování a zamýšleném použití. Chemické složení samotných částic může být přirozeně toxické. Bylo zjištěno, že některé kovy, jako je kobalt, nikl, kadmium a zinek jsou toxické a proto nejsou vhodné pro biomedicínské aplikace, zatímco jiné, jako je titan a železo, jsou pro buňky podstatně méně škodlivé. Je zajímavé, že některé materiály, například zlato, o kterém je známo, že je inertní, je v řádech nanometrů toxické (Markides, Rotherham a Haj, 2012). Postup přípravy, který je odlišný pro každý typ částic, může mít také vliv na toxicitu těchto nanočástic (Soenen a Cuyper, 2010).

Toxické účinky nanočástic magnetických oxidů železa byly pozorovány při koncentracích, které byly přibližně 40x nižší než chemická toxicita iontů železa, přičemž bylo zjištěno, že další důležitou vlastností je rozpustnost částic. Samotné nanočástice vyžadují testování akutních cytotoxických účinků, zatímco pomalu rozložitelné (obalené) nanočástice by měly být posuzovány podle jejich dlouhodobého účinku. Pouze změny v obalech nanočástic magnetických oxidů železa, skládající se z laktózy, maltózy nebo glukózy vedou k výrazně odlišným účinkům na morfologii lidských fibroblastů a maltózou funkcionizované nanočástice magnetických oxidů železa výrazně snižují životaschopnost buněk (Soenen a Cuyper, 2010).

Výsledky testů toxicity superparamagnetických nanočástic magnetických oxidů železa také vykazují rozdíly. Mnohé rozdíly byly pozorovány mezi různými druhy buněčných linií a značné rozdíly jsou i mezi obalenými a neobalenými částicemi. Například částice potažené karboxydextranem působily nepříznivě na proliferaci, migraci a životaschopnost lidských kožních fibroblastů, kdežto neobalené částice měly účinek mnohem menší (Soenen a Cuyper, 2010). Existuje mnoho příkladů rozdílných reakcí na toxicitu nanočástic, kdy byly přesně stejné nanočástice ve styku s různými buňkami. Některé z těchto příkladů jsou uvedeny níže v diskuzi. Předpokládá se, že tyto značné rozdíly ve výsledcích mohou být způsobeny různými detoxikačními přístupy, které buňky používají pro boj s nanočásticemi (Mahmoudi et al., 2011).

Dalším důležitým aspektem, který dosud neobdržel patřičnou pozornost, je důležité spojení mezi toxickými účinky a intracelulární koncentrací nanočástic. Několik studií prokázalo, že vysoké množství nanočástic uvnitř buněk může vést k drastickým dopadům například na buněčné proliferace, neboť v případě obalených částic dochází ke snižování intracelulární degradace nanočástic (Soenen a Cuyper, 2010).

Dnes jsou v klinické praxi používány produkty s obchodními názvy Feridex® a Resovist®, které byly schváleny pro použití v lidském těle. Přesto u některých pacientů byla zaznamenána vazodilatace a parestézii v případě Rosovistu® a silná bolest, která ve 2,5 % vedla k ukončení infuze látky při použití Feridexu® (Wang, 2011).

4.2.1.3 Pronikání skrze membránu

V *in vitro* kulturách nanočástice nevyhnutelně interagují s mnoha buňkami a biomolekulami. Interakce s povrchy buněk poskytuje možnost průchodu přes plazmatickou membránu a vstup do cytoplazmy skrze různé mechanismy, což umožňuje průběh mnoha toxických reakcí v buňce. Mezi nejčastější způsoby průniku do buňky patří: 1) nespecifická endocytóza, což je obalování částice pánčkami lipidové dvojvrstvy, 2) fagocytóza, 3) klathrinem zprostředkovaná endocytóza, 4) makropinocytóza a 5) prostá difuze přes membránu nebo 6) přes četné iontové kanály a proteiny, které jsou umístěny v membráně a umožňují přenos určitých látek z nebo do buňky. Mechanismus vstupu do buňky je závislý na fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je tvar, složení, velikost, náboj a povrchové vlastnosti nanočástic (Pisanic, Jin a Shubayev, 2009).

Tým Giovanna Fragneta zjistil, že kladně nabitě částice zlata mohou pronikat do buňky a mohou ji při určité koncentraci zničit, kdežto záporně nabitě částice, které nemohou

prostupovat buněčnou stěnou, mají opačný efekt. Při dané koncentraci brání membráně v jejím rozkladu a pomáhají odolávat extrémním podmínkám, jako jsou zvýšené hodnoty pH, který by ji jinak významně narušily. To může pomoci při vývinu nanočástic, které by mohly být použity pro speciální biomedicínské aplikace, jako jsou nosiče léčiv, léčba rakoviny a biosenzory (Dumé, 2013).

4.2.1.4 Aktivace imunitního systému

Jelikož jsou reakce imunitního systému vysoce komplexní, zmíním zde pouze jednu z mnoha možných cest. Pokud se nanočástice dostanou do organismu, mohou být považovány za cizí látky a poté mohou být například opsonizovány. To znamená, že se na povrch antigenů (nanočástic) navážou opsoniny, což jsou protilátky nebo částice komplementu. Tyto látky následně mohou rozpoznat fagocyty (např. makrofág, neutrofil) díky svým receptorům které mají na povrchu. Poté jsou spolu s opsoniny fagocytovány i nanočástice. Během zánětlivé reakce dochází k vylučování cytosinů, které mohou reagovat s nanočásticemi a měnit odpověď imunitního systému, to podle Baenza-Squibana a Laonezávisí na typu obou látek (Filipová, Kukutschová a Mašláň, 2012).

4.2.2 In vivo

Při testování *in vivo* se pozoruje žijící organismus jako celek a to testováním na zvířatech nebo klinickým testováním, které je nezbytné pro potvrzení výsledků *in vitro*. Výhodou *in vivo* testování je, že získáme údaje o nanomateriálech, jako jsou míra vstřebávání, distribuce, metabolismus, vylučování a interakce mezi nanomateriály a biomolekulami, což v současné době nemůže být dostatečně simulováno na buněčné úrovni v *in vitro* (Feng, Wang a Zhao, 2009).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

- Stanovení toxicity extraktu nanočástic magnetických oxidů železa na buněčných modelech
- Stanovení vlivů nanočástic na buněčné modely v přímém kontaktu
- Stanovení vlivů nanočástic na buněčnou migraci

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Testované nanočástice oxidů železa

Nanočástice magnetických oxidů železa byly připraveny Ing. Ilonou Smolkovou z Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Nanočástice magnetitu a maghemitu byly vyrobeny vysrážením z roztoku a princip této metody je uveden výše. Pomocí Rentgenového záření a transmisního elektronového mikroskopu byl zjištěn průměr nanočástic a také zastoupení maghemitu a magnetitu v připravené směsi. Průměrná velikost nanočástic byla 13 nm, 72 % připravených nanočástic bylo tvořeno magnetitem a 28 % maghemitem. Takto připravené nanočástice mají nízkou distribuci velikosti s indexem polydisperzity 0,3, vykazují ferimagnetismus, magnetické nasycení látky je rovno 56 ± 2 emu/g a koercivita je rovna 11 ± 4 Oe. Použité nanočástice nebyly povrchově upraveny, a tudíž docházelo ke vzniku agregátů. Více podrobností o vlastnostech připravených nanočástic je uvedeno v článku *Correlation between coprecipitation reaction course and magneto-structural properties of iron oxide nanoparticles* od Ilony Smolkové et al., který byl předložen *Materials Chemistry and Physics* a je v recenzním řízení. Před testováním s buněčnými kulturami byly nanočástice sterilizovány suchým teplem při 120°C po dobu 40 minut.

6.2 Použité buněčné kultury

V experimentu byly použity buněčné kultury myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658). Médiem bylo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Catalog No. 30-2002), ke kterému bylo přidáno hovězí sérum v koncentraci 10% konečného objemu. K médiu byla dále přidána antibiotika – Penicilin/Streptomycin 100 µg/ml (PAA Laboratories GmbH, Austria). Vhodné podmínky pro kultivaci těchto buněčných linií jsou při teplotě 37 °C, přítomnost oxidu uhličitého v koncentraci 5 % a relativní vlhkost atmosféry 90 %.

6.3 Přístroje

Pro experiment byly využívány následující přístroje a zařízení: Biologický inkubátor Heracell 150i (Thermo Scientific, USA), fluorescenční mikroskop a mikroskop s fázovým kontrastem Olympus CKX 41 (Olympus, Japonsko), laminární box s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe KSP (Thermo Scientific, USA), spektrofotometr Sunrise (Tecan, Švý-

carsko) a centrifuga Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Německo). Tkáňový plastik byl zakoupen od firmy TPP (Švýcarsko).

6.4 Experiment

V následujících podkapitolách je uveden postup pro přípravu buněčných kultur, přidání vzorku a použité metody pro vyhodnocení testů.

6.4.1 Kultivace a trypsinizace

Po dosažení konfluence byly buňky zkontrolovány na mikroskopu a přeneseny do laminárního boxu. Z kultivační nádoby (T75) bylo odsáto médium, tak aby nedošlo k poškození buněk. Buňky byly opláchnuty 0,2 ml/cm² fosfátového pufru (PBS), což odpovídá množství 15 ml, od zbytků média a následně byl pufr odsát. Dále bylo přidáno 0,1 ml/cm² trypsinu, což odpovídá množství 7,5 ml, pro přerušení vazeb mezi buňkami a kultivační nádoba byla uložena do inkubátoru na dobu 15-20 minut. Uvolnění buněk bylo průběžně kontrolováno na mikroskopu. Po přerušení vazeb bylo do nádoby přidáno 7,5 ml média a tento roztok byl odpipetován z kultivační do zkumavky a ta vložena do centrifugy, která byla předem vytemperována na 37°C. Během centrifugace, která probíhala 3 minuty při otáčkách 1100 rpm, buňky sedimentovaly, což umožnilo odsát médium s trypsinem. Počet takto získaných buněk byl přibližně 2×10^7 , který byl následně rozředěn médiem na požadovanou koncentraci 1×10^5 buněk/ml. Takto získaná buněčná suspenze byla pomocí pipety rozředěna do 96-ti jamkových plat, kde v každé jamce byl objem 1 μ l suspenze a do 12-ti jamkových plat, kde v každé jamce byl 1 ml buněčné suspenze. Plata s buňkami byla vložena do inkubátoru na 24 hodin.

6.4.2 Přidání vzorku

K testovaným nanočásticím bylo přidáno kultivační médium, tak aby koncentrace odpovídala 0,2 g částic /1 ml média. Takto vytvořená suspenze byla umístěna do třepačky na 24 hodin při otáčkách 450 rpm a teplotě 37 °C. Po 24 hodinové kultivaci buněk v inkubátoru bylo odsáto médium z 96-ti jamkového plata. V referenční části plata bylo vyměněno 100 μ l média za nové a v testovací části bylo k buňkám přidáno médium s extraktem 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 1 % a plato bylo vloženo do inkubátoru.

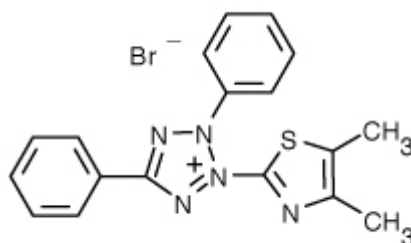
Dále byly buňky po 24 hodinách kultivace testovány v přímém kontaktu s částicemi. V tomto případě bylo použito 12-ti jamkové plato a do testovací části byl

k buňkám, vždy po dvou jamkách, přidán 1 ml média s částicemi v následujících koncentracích: 10, 8, 6, 4, 2 mg/ml média a na dalších 24 hodin byly buňky kultivovány v inkubátoru.

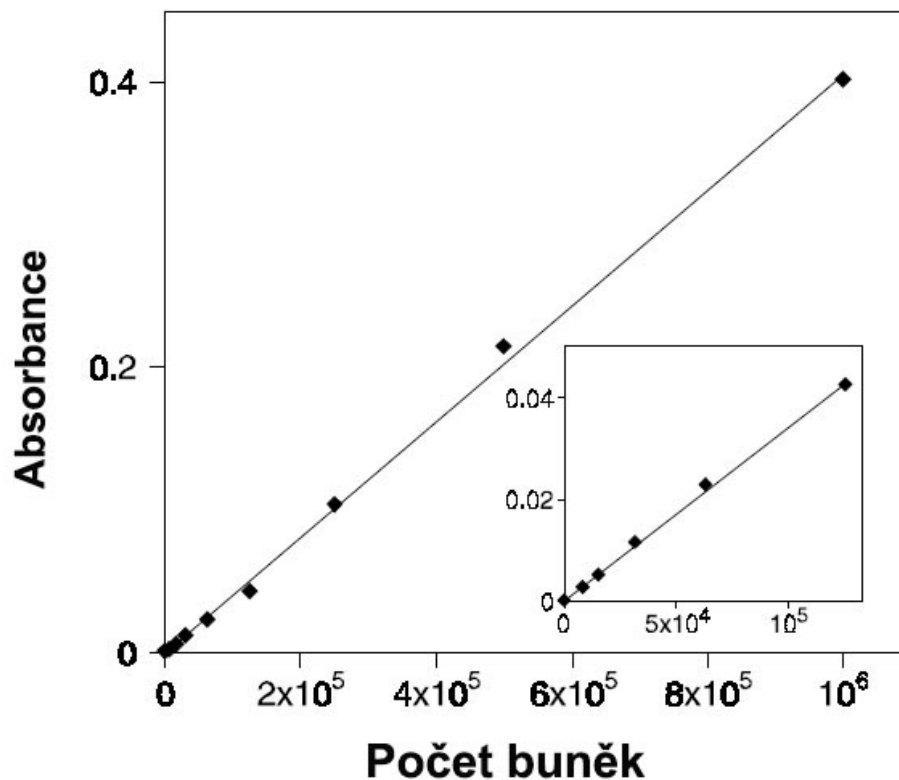
Pro test buněčné migrace bylo opět použito 12-ti jamkové plato a k buňkám byl přidán 1 ml suspenze nanočástic v médiu o koncentracích 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml média.

6.4.3 MTT test

Po 24 hodinové kultivaci buněk v 96-ti jamkovém platu s různými koncentracemi extraktu bylo odsáto médium ze všech jamek. Do každé jamky bylo přidáno čisté médium a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid – MTT (Molecular Probes, USA). Buňky byly odloženy na další 4 hodiny do inkubátoru. Během této doby byl MTT metabolizován na formazan, který má hvězdicovitý tvar. Dále bylo odsáto 40 μl roztoku. Toto množství bylo ponecháno v pipetě a poté byl odsát zbytek roztoku a navraceno 40 μl z pipety do každé jamky. K tomuto množství bylo přidáno 80 μl dimethylsulfoxidu – DMSO (Molecular Probes, USA) pro rozpuštění formazanu, který se nechal působit 15 minut. Poté bylo výsledné zabarvení měřeno spektrofotometrem při vlnové délce 570 nm, přičemž výsledná absorbance odpovídala počtu živých buněk. S vyšším počtem živých buněk se bude zvyšovat koncentrace metabolizovaného formazanu, a tedy bude narůstat i absorbance, což je patrné z obr. č. 4 (Molecular Probes, 2002).



Obrázek č. 4 Strukturální vzorec 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid (Molecular Probes, 2002).

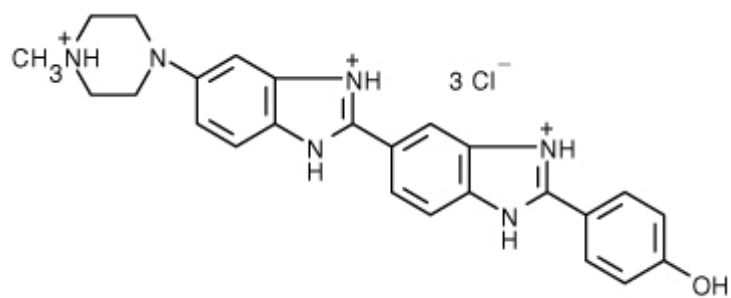


Obrázek č. 5 Graf závislosti absorbance na koncentraci buněk, upraveno dle Molecular Probes, 2002.

6.4.4 Fluorescenční mikroskopie

Pro testování pomocí fluorescenční mikroskopie byly použity buňky buněčné linie NIH/3T3, ke kterým byly přidány částice v přímém kontaktu v koncentracích 10, 8, 6, 4, 2 mg/ml média. Po kultivaci v inkubátoru bylo k buňkám přidáno 40 μ l/ml fluorescenční barvivo Hoechst 33258 (Molecular Probes, USA), neboli pentahydrát (bis-benzimide). Plato bylo uloženo na 15 minut do inkubátoru. Médium s barvivem bylo odsáto a buňky v každé jamce byly opláchnuty 1 ml PBS. Následně byla vyhodnocena viabilita buněk pozorováním na fluorescenčním mikroskopu a pořízením mikrofotografií.

Použité barvivo Hoechst je modré fluorescenční barvivo, které je schopno vázat se s buněčnou DNA, konkrétně na nukleotidový pár adenin a thymin. Barvivo absorbuje světelné záření o dané vlnové délce. Tím dochází k zvýšení energie a vyzáření světla o delší vlnové délce, čímž dojde ke zviditelnění DNA. To nám umožňuje využít barviva pro detekci DNA, a tedy i pro zjištění počtu buněk (MolecularProbes, 2005).



Obrázek č. 6 Strukturní vzorec fluorescenčního barviva Hoechst 33258
(Molecular Probes, 2005).

7 VÝSLEDKY

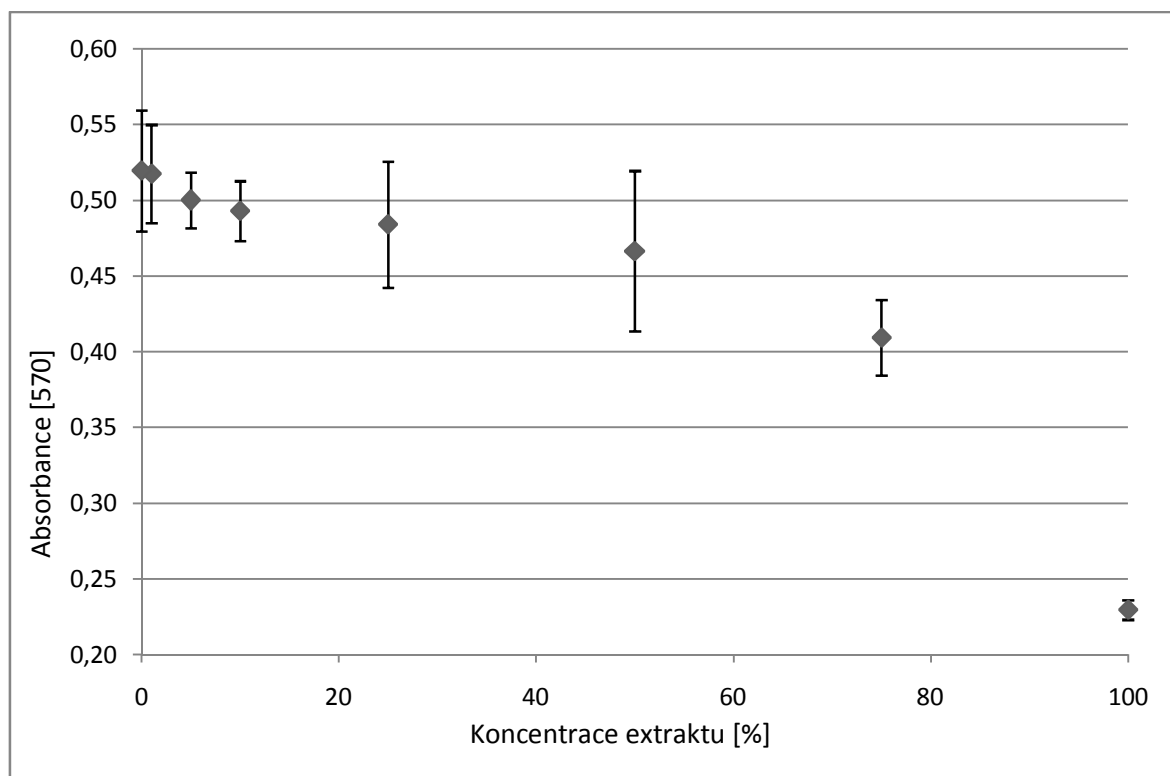
V následujících podkapitolách budou uvedeny výsledky testování potenciálně toxické látky, kterou byly nanočástice magnetických oxidů železa. Ke stanovení cytotoxicity byl nejprve použit extrakt nanočástic v různých koncentracích. Cytotoxicita extraktu částic byla vyhodnocena pomocí MTT testu a mikrofotografií pořízených na mikroskopu s fázovým kontrastem.

Dále pro stanovení cytotoxicity byl použit přímý kontakt nanočástic s buňkami. Z důvodu možné reakce nanočástic a MTT bylo pro vyhodnocení použito mikrofotografií získaných pomocí fluorescenčního mikroskopu a mikroskopu s fázovým kontrastem. V přímém kontaktu částic s buňkami byl také proveden test na buněčnou migraci.

Výsledky jsou prezentovány ve formě tabulek a obrázků. V tabulkách jsou uvedeny průměrné hodnoty absorbance vzorků, přičemž průměr byl získán ze čtyř měření každé koncentrace. V tabulkách je také vyhodnoceno procentuální porovnání viability buněk s referencí dle normy ISO10 993-5: hodnota rovna 100 znamená 100 % životaschopných buněk; > 80 vyjadřuje necytotoxický efekt; 60 – 80 slabá cytotoxicita; 40 – 60 střední cytotoxicita; < 40 silná cytotoxicita. Dále jsou zde zobrazeny mikrofotografie zprostředkované fluorescenčním mikroskopem a mikroskopem s fázovým kontrastem.

7.1 Stanovení cytotoxicity extraktu nanočástic na linii NIH/3T3

Výsledky zobrazeny v grafu č. 1 odpovídají koncentraci buněk (vyjádřených absorbancí) jednotlivých koncentrací extraktu nanočástic magnetických oxidů železa při testu MTT. 100% extrakt byl získán ze suspenze o koncentraci 0,2 g částic v 1 ml kultivačního média. Jak lze vyčíst z grafu, se zvyšující koncentrací extraktu klesá absorbance, tedy i množství přeživších buněk. Výraznější pokles absorbance, tedy nárůst cytotoxicity je patrný při koncentraci 75 % extraktu. Ještě výraznější nárůst cytotoxicity je v případě nejvyšší koncentrace. Naopak, koncentrace nižší než 75 % extraktu vykazují podobnou absorbanci jako reference. U těchto koncentrací tedy došlo k minimálnímu úmrtí buněk.



Obrázek č. 7 Graf závislosti absorpance na koncentraci extraktu nanočástic

Koncentrace extraktu nanočástic oxidů železa [%]	Průměr ± SD	p	Životaschopnost [%]
100	0,2295 ± 0,0055	0,0000	44,17
75	0,4094 ± 0,0217	0,0000	78,79
50	0,4929 ± 0,0458	0,2175	94,87
25	0,4840 ± 0,0361	0,0954	93,16
10	0,4665 ± 0,0171	0,0120	89,78
5	0,5175 ± 0,0160	0,9194	99,60
1	0,4999 ± 0,0280	0,3441	96,21
Reference	0,5196 ± 0,0395	0,0000	100

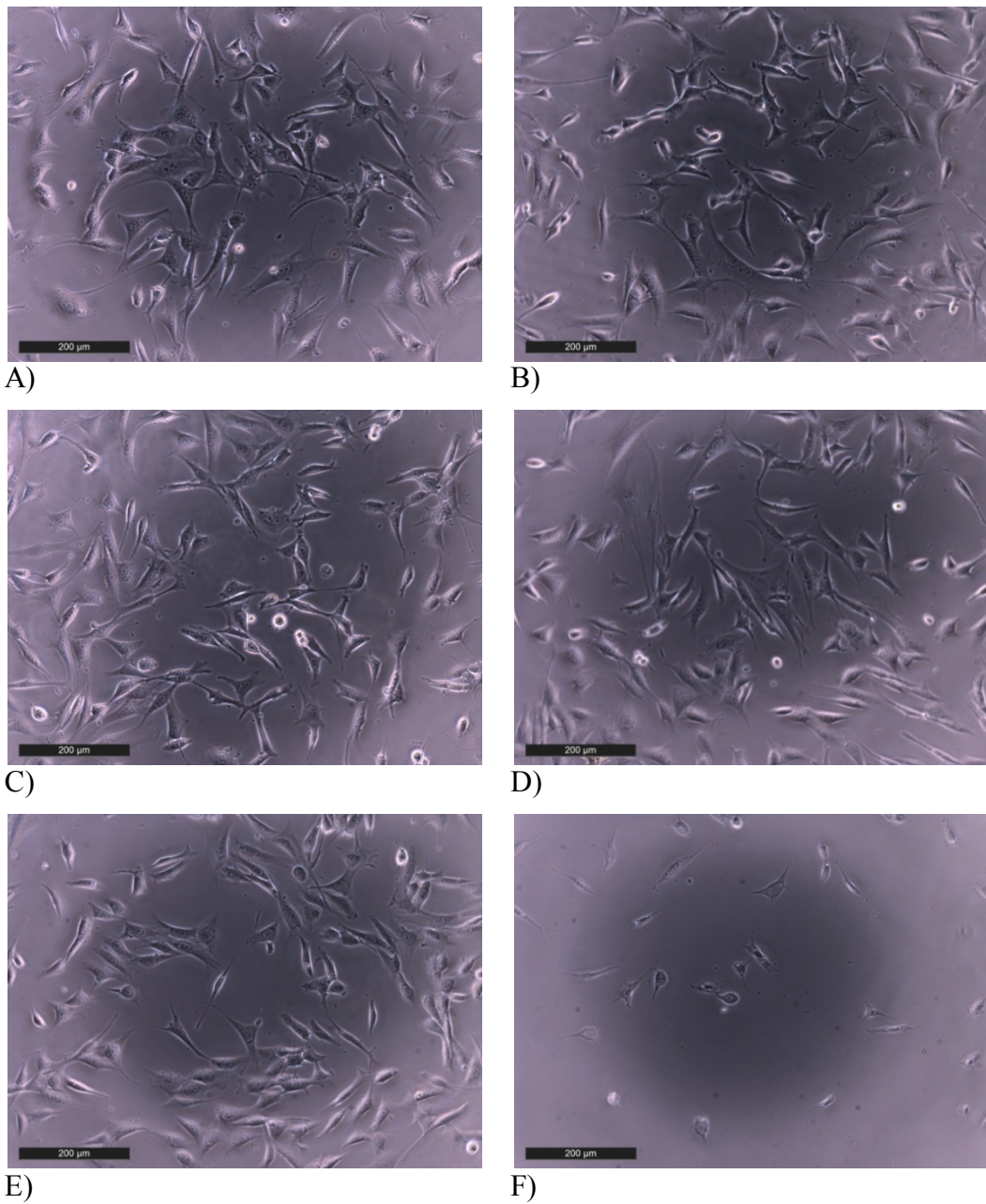
Poznámka: >80% =necytotoxický efekt; 60–80% = slabá cytotoxicita; 40–60 %= střední cytotoxicita; <40% = silná cytotoxicita.

Tabulka č. 1 Stanovení vlivu extraktu nanočástic železa na buněčnou viabilitu.

Tabulka č. 1 potvrzuje a doplňuje výsledky uvedené v grafu. Vyhodnocení proběhlo pomocí Studentova T- testu, který vyjadřuje průkaznost rozdílů v cytotoxicitě jednotlivých koncentrací. Druhým způsobem vyjádření vlivu testované látky na buněčnou viabilitu je pak pomocí ISO normy, která vyjadřuje procentuální pokles životaschopnosti buněk v porovnání s referencí. Z vyhodnocení T – testu je zřejmé, že viabilita buněk kultivova-

ných za přítomnosti 100%, 75% a 10% extraktu nanočástic je statisticky průkazně odlišná, jelikož se hladina významnosti u těchto koncentrací blíží k nule nebo je jí rovna. Nízká hodnota hladiny významnosti u 10% koncentrace byla způsobena menší směrodatnou odchylkou a nižším průměrem. Při vyjádření vlivu pomocí ISO však tento výkyv nebyl významný, protože ve všech koncentracích 1 až 50 % je životaschopnost buněk srovnatelná s referencí. Vliv těchto koncentrací na buňky je tedy nízký. Pokud tyto výsledky zhodnotíme podle ISO normy, zjistíme, že koncentrace 1 %, 5 %, 10 %, 25 % a 50 % v porovnání s referencí vykazují životaschopnost v rozmezí 80 – 100 %, a proto můžeme říct, že tyto koncentrace extraktů nevykazují cytotoxicitu. U koncentrace 75 % je životaschopnost buněk 78,79 %, což vypovídá o slabé cytotoxicitě této koncentrace. Stoprocentní extrakt nanočástic magnetických oxidů železa snižuje životaschopnost buněk podstatně více. Při 100 % koncentraci vykazovaly buňky jen 44,17 % životaschopnosti, proto tuto koncentraci můžeme označit jako středně cytotoxickou.

Pro zhodnocení morfologie či výskytu apoptických buněk je MTT test nedostačující. Proto bylo použito focení mikroskopem s fázovým kontrastem. Vybrané výsledné mikrofotografie můžeme vidět na obrázku č. 7. Konkrétně jsou zobrazeny snímky reference a koncentrace 5 %, 25 %, 50 %, 75 % a 100 %. Z mikrofotografií můžeme usoudit, že nanočástice magnetických oxidů železa nemají patrný vliv na morfologii buněk a co se týče počtu živých buněk, snímky odpovídají výsledkům MTT testu uvedeným v tabulce. Na mikrofotografiích B) až D) je počet i vzhled buněk srovnatelný s referencí na snímku A), což odpovídá necytotoxickému účinku těchto koncentrací. Na snímku F), který odpovídá 100% koncentraci extraktu, je vidět jednoznačný rozdíl od ostatních koncentrací. Nedošlo ale k zániku všech buněk, můžeme tedy potvrdit střední cytotoxicitu této koncentrace dokázanou v tabulce č. 1. Na snímcích vidíme zdravé buňky, bez výskytu morfologicky odlišných buněk nebo apoptických tělísek. Ty by vypovídaly o programované buněčné smrti, ke které by došlo v případě poškozené DNA.

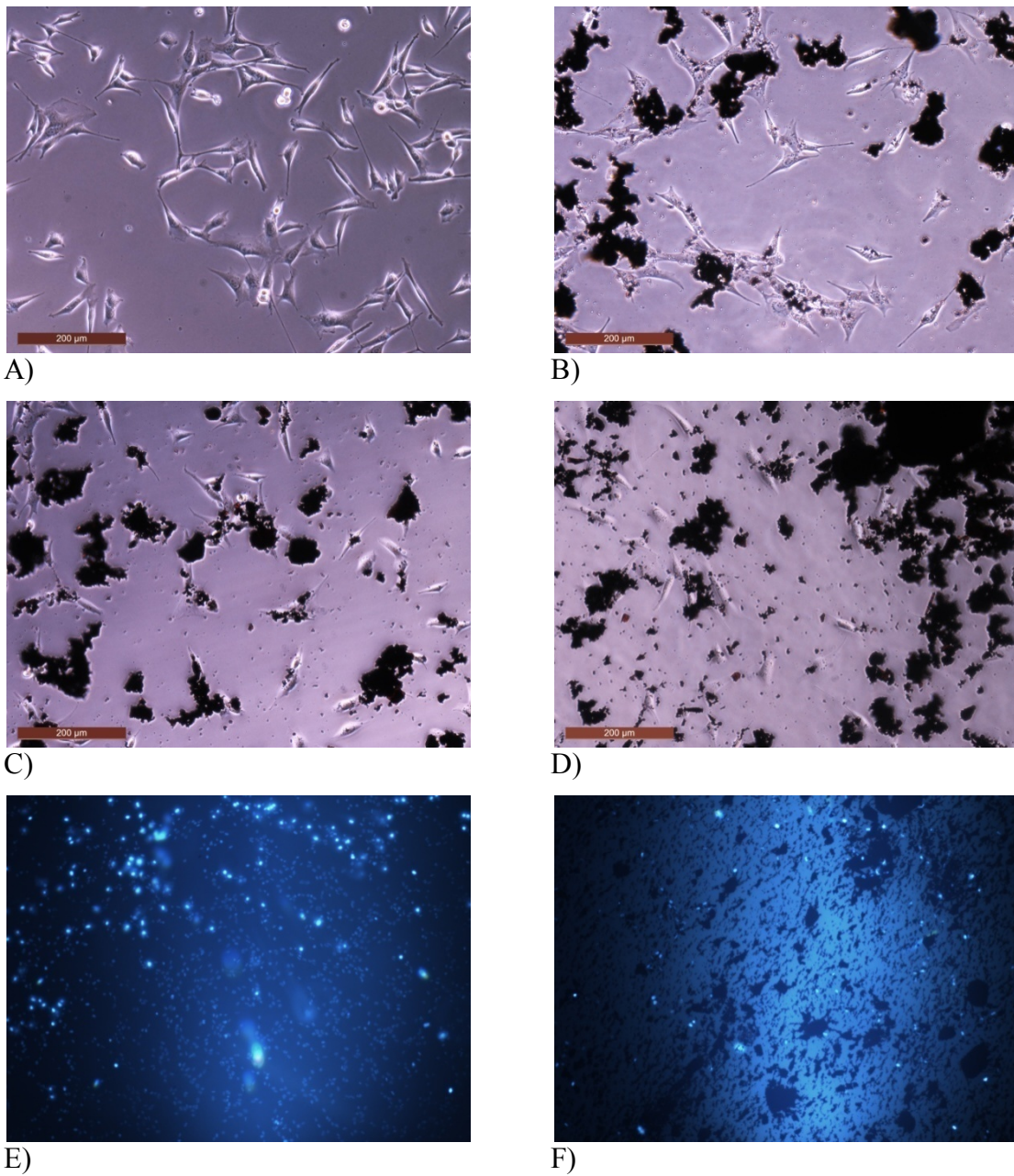


Obrázek č. 8 Mikrofotografie buněčné linie NIH/3T3 při vyhodnocení cytotoxicity extraktu: A) refernce B) 5 %; C) 25 %; D) 50 %; E) 75 %; F) 100 %. Zvětšení mikrofotografií je 100×.

7.2 Stanovení cytotoxicity přímého kontaktu nanočástic s buněčnou linií NIH/3T3

Cytotoxicita nanočástic byla dále posuzována v přímém kontaktu s buňkami. Pro vyhodnocení byl použit mikroskop s fázovým kontrastem a fluorescenční mikroskop.

Na obrázku č. 8 jsou zobrazeny mikrofotografie přímého kontaktu částic. Zajímavým zjištěním bylo hromadění částic v místech výskytu buněk. Tato interakce by mohla být předmětem budoucího výzkumu. Na vybraných snímcích A) až D), pořízených mikroskopem s fázovým kontrastem, můžeme pozorovat úbytek buněk se zvyšující se koncentrací. Koncentrace 8 mg/ml a 10 mg/ml média nejsou zobrazeny, neboť buňky byly hůře viditelné kvůli vyšší koncentraci částic. Výsledky přímého kontaktu se shodují s výsledky při testování extraktu. Zvětšení pro tyto snímky bylo 100×. Mikrofotografie E), F) byly pořízeny fluorescenčním mikroskopem při 40× zvětšení po obarvení barvivem Hoechst 33258. Díky barvivu, které obarvilo DNA můžeme vidět počet přeživších buněk. Pro srovnání byly použity mikrofotografie reference – E) a koncentrace 6 mg/ml média – F), kde můžeme pozorovat nižší počet buněk.

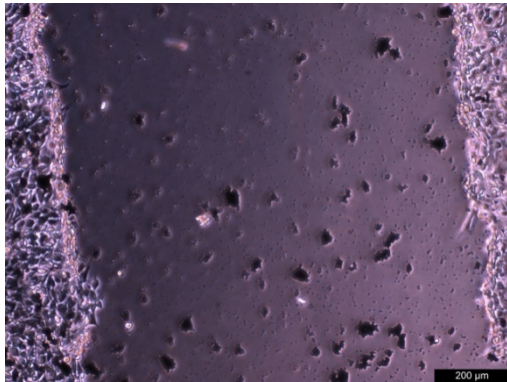


Obrázek č. 9 Mikrofotografie přímého kontaktu nanočástic s buněčnou linií NIH/3T3. Snímky A) – D) pořízeny mikroskopem s fázovým kontrastem a snímky E), F) pořízeny fluorescenčním mikroskopem. Koncentrace částic v 1 ml média: A) 0 mg- reference, B) 2 mg, C) 4 mg, D) 6 mg, E) 0 mg- reference, F) 6 mg

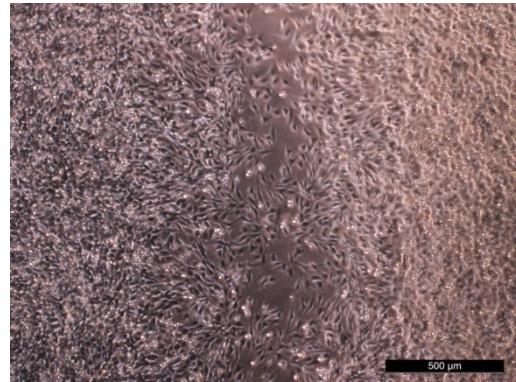
7.3 Buněčná migrace

V mnohobuněčném organismu buňky migrují při mnoha důležitých procesech. K tomu dochází například při hojení ran, během embryonálního vývoje nebo při imunitních reakcích. V rámci mé bakalářské práce jsme testovali migraci buněk v přítomnosti nanočástic magnetických oxidů železa.

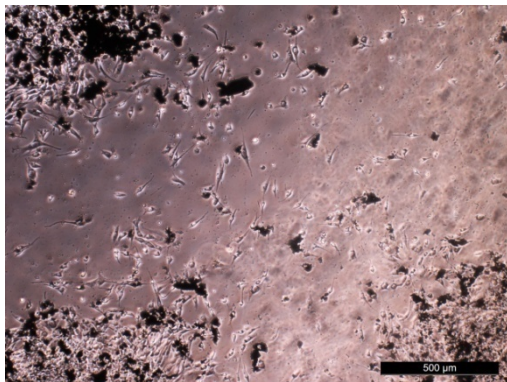
Buňky byly dva dny kultivovány v inkubátoru pro dosažení plné influence v jednotlivých jamkách. Poté byly do vrstvy buněk udělány pipetou rýhy a byly přidány nanočástice. Jelikož při větších koncentracích nanočástic jsou buňky méně viditelné, byly zvoleny nižší koncentrace než v předchozím testu. Byly použity suspenze částic o koncentracích 1, 2, 3, 4, a 5 mg/ml kultivačního média. Po přidání nanočástic bylo plato vloženo do inkubátoru. Mikrofotografie byly pořízeny mikroskopem s fázovým kontrastem. Snímek A) zobrazuje koncentraci 1 mg/ml před kultivací. Mikrofotografie B) až E) byly vyfoceny po 24 hodinách v inkubátoru. Na snímku B) jsou buňky bez nanočástic a můžeme vidět že, buňky porůstají prázdná místa. Se zvyšující se koncentrací nanočástic v médiu tato schopnost klesá. Ze snímku E), na kterém je zobrazena koncentrace 4 mg/ml můžeme pozorovat tendenci nanočástic shlukovat se v místě výskytu buněk, stejně jako v předchozím testu. To je také viditelné na snímku F), kde je zobrazeno celé plato po 24 hodinách od přidání nanočástic. Ze snímku lze potvrdit to, co bylo popsáno výše. V referenčních jamkách je buňkami pokryta celá plocha, kdežto se zvyšující koncentrací pozorujeme, jak nanočástice negativně ovlivňují vazbu buněk na dně jamek. Adheze buněk k povrchu je důležitá pro řízení buněčných funkcí, růstu, migrace a diferenciaci. K ovlivňování adheze může docházet tím, že nanočástice ovlivňují receptory na povrchu buněk a buňky ztrácí schopnost adheze, nebo nanočástice mohou buňky strhávat svou vlastní vahou. Pravou příčinu ale momentálně nedokážeme posoudit. Mikrofotografie G) a H) byly vyfoceny pátý den od vložení do inkubátoru. Můžeme vidět, že i při koncentraci 4 mg/ml postupně došlo k porůstání prázdného prostoru buňkami. Koncentrace 5 mg/ml není zobrazena pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem, neboť při této koncentraci byl viditelný jen malý počet buněk.



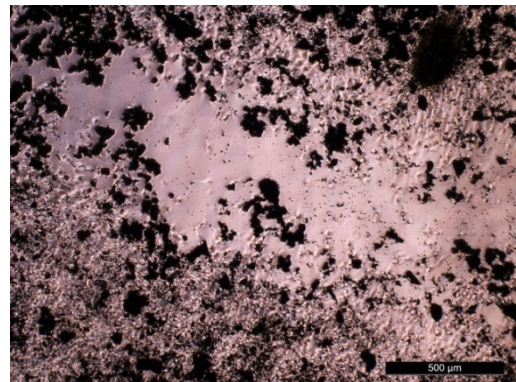
A)



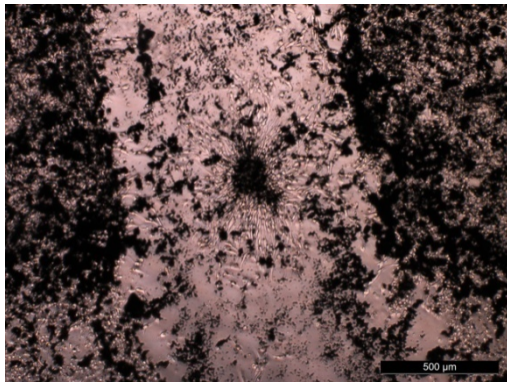
B)



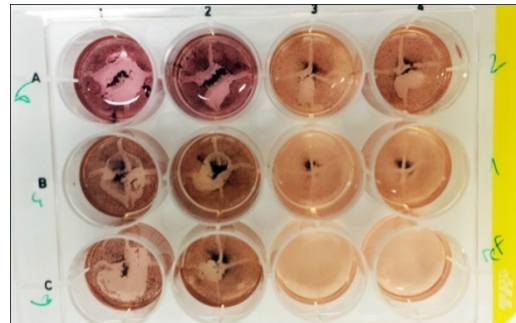
C)



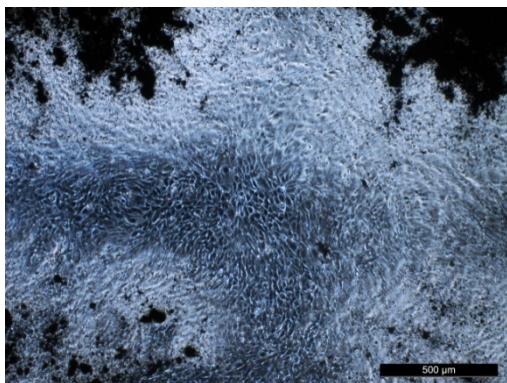
D)



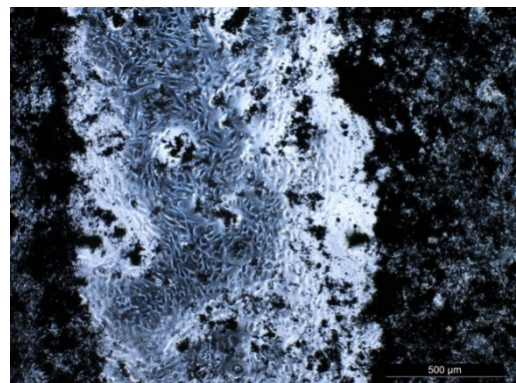
E)



F)



G)



H)

Obrázek č. 10 Mikrofotografie migrace buněčné linie NIH/3T3 při přímém kontaktu s nanočásticemi. Koncentrace nanočástic v 1 ml média: A) 1 mg (před vložení do inkubátoru) B) 0 mg - reference, C) 1 mg, D) 2 mg, E) 4 mg, F) fotografie plata, G) 1 mg, H) 4 mg.

8 DISKUZE

Nanočástice magnetických oxidů železa jsou stále předmětem výzkumu pro jejich uplatnění v biomedicínských aplikacích, především jako nosiče léčiv, kontrastní látky pro MR a při lokální hypertermii, o kterých je více pojednáno v teoretické části této práce. O využití nanočástic v biomedicíně se začalo uvažovat v 70. letech minulého století a od té doby bylo provedeno množství testů na jejich cytotoxicitu (Pisanic, Jin a Shubayev, 2009). V medicíně se částice železa obalené dextranskem využívají cca 25 let a jsou považovány za netoxické. Nicméně v nedávných *in vitro* studiích byly zjištěny nové nežádoucí interakce mezi částicemi a buněčnými mikrostrukturami (Soenen a Cuyper, 2010). Proto jsou nanočástice magnetických oxidů železa neustále předmětem výzkumu.

Výsledky vlivu nanočástic na buněčné linie se v mnoha studiích značně liší v závislosti na typu použitých nanočástic a také na použité buněčné linii. Příkladem můžeme uvést test, který provedl Brunner et al. na myších fibroblastech a na buňkách lidského mezoteliomu, při koncentracích 0 – 30 ppm neobalených nanočástic magnetických oxidů železa. Po třech dnech byly myší fibroblasty k holým částicím necitlivé i při nejvyšších koncentracích, kdežto pro lidské mezoteliomální buňky byla letální koncentrace 7,5 ppm (Brunner et al., 2006). Kdežto při testování cytotoxicity holých částic v koncentraci 50 – 250 $\mu\text{g/ml}$ na lidské mezenchymální kmenové buňky, které provedl Omidkhoda et al., nebyl zjištěn negativní vliv (Markides, Rotherham a Haj, 2012). Dále Gupta et al. při aplikaci holých nanočástic magnetických oxidů železa na lidskou plicní epiteliální buněčnou linii nezaznamenali u koncentrace 20-80 $\mu\text{g/ml}$ toxicitu, zatímco při aplikaci na lidské fibroblasty byla při stejné koncentraci zjištěna prudká toxicita. Zatímco při aplikaci na myší fibroblasty nebyla zjištěna žádná toxicita a to ani u koncentrace 500 $\mu\text{g/ml}$ (Mahmoudi et al., 2011). Tomu odpovídají i naše výsledky z MTT. Byly testovány koncentrace 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% a 100% extraktu a slabý cytotoxický účinek byl pozorován až u koncentrace 75 %. Nižší koncentrace tedy můžeme označit za necytotoxické. To, že nanočástice nevykazují cytotoxicitu při nižších koncentracích, potvrzuje například studie provedená Brunnerem et al., ve které byly taktéž použity myší fibroblasty. Cytotoxický vliv nebyl zaznamenán ani při nejvyšší testované koncentraci, což bylo 30 ppm. Cílem v mé práci tedy bylo zjistit koncentraci, která již bude ovlivňovat životaschopnost buněk. Toho bylo dosaženo u 75% extraktu nanočástic magnetických oxidů železa, který byl slabě cytotoxický.

Další odlišnosti ve výsledcích způsobují obaly nanočástic. Jako příklad můžeme uvést test, který provedl Berry et al. na lidských fibroblastech. Po uplynutí 48 hodin měly částice obalené karboxydextranem větší vliv na morfologii, životaschopnost, proliferaci a migraci buněk než částice neobalené (Soenen a Cuyper, 2010). O nanočásticích magnetických oxidů železa je velké množství různorodých testů a pro budoucí vývoj by bylo vhodné provádět více specifických testů.

Při testování vlivu nanočástic magnetických oxidů železa na buněčnou migraci, byl zjištěn negativní vliv, což je patrné z přiložených mikrofotografií. Vliv na buněčnou migraci byl zaznamenán také při testování nanočástic obalených karboxydextranem na lidské dermální fibroblasty (Berry et al., 2004) a dále při testování na prasečích endoteliálních buňkách (Yang, Tang a Wang, 2010). Dále bylo při testu buněčné migrace zjištěno, že nanočástice snižují buněčnou adhezi k povrchu plat. Toto zjištění se shoduje s testem provedeným Guptou a Curtisem, 2004, kteří tento vliv pozorovali na lidských fibroblastech a to jak u nanočástic čistých, tak i u obalených polyetylen glykolem. Po 24 hodinách bylo přichyceno jen 36,04 % buněk v přítomnosti neobalených částic, kdežto částice obalené polyetylen glykolem neměly na adhezi příliš velký vliv, neboť 86,62 % buněk zůstalo přichycených k povrchu. Můžeme tedy usoudit, že i materiál použitý na obal částice má podstatný vliv na buněčnou adhezi.

ZÁVĚR

V praktické části této bakalářské práce bylo hlavním cílem stanovení cytotoxického vlivu nanočástic magnetických oxidů železa, což je jeden z mnoha testů, které dle normy ČSN EN ISO 10993 – 1 musí být provedeny před použitím materiálu v lidském těle. Přestože nejsou nanočástice magnetických oxidů železa novým objevem, pozornost jim je věnována dodnes, neboť v nedávných studiích *in vitro* byly objeveny nové interakce mezi nanočásticemi a buněčnými liniemi.

Konkrétně byl posuzován vliv nanočástic magnetitu a maghemitu na buněčnou linii myších fibroblastů. Pro vyhodnocení cytotoxicity nanočástic magnetických oxidů železa byl použit MTT test pro extrakt nanočástic, dále test přímého kontaktu nanočástic s buňkami a vliv částic na buněčnou migraci. Jelikož je známo, že nízké koncentrace nanočástic magnetických oxidů železa nejsou cytotoxické, byly zvoleny koncentrace tak, abychom mohli stanovit limitní hodnotu necytotoxicity. Hodnoty získané u konkrétních koncentrací byly porovnávány s referencí – vzorek buněk bez testovaných částic. K výsledným hodnotám z MTT testu bylo doplněno statistické vyhodnocení pomocí T-testu. Bylo zjištěno, že 75% koncentrace extraktu připraveného z 0,2 nanočástic v 1 ml média vykazuje slabou cytotoxicitu, tedy nižší koncentrace jsou necytotoxické, což se shoduje s testy provedenými v minulosti. MTT test byl doplněn mikrofotografiemi pro zhodnocení morfologie a výskytu apoptických buněk, které ale nebyly zaznamenány.

Test přímého kontaktu nanočástic magnetických oxidů železa a test buněčné migrace byl vyhodnocen pomocí mikrofotografií, které byly pořízeny mikroskopem s fázovým kontrastem. Bylo zjištěno, že částice se zvyšující se koncentrací mají vliv na migraci buněk, což můžeme označit jako negativní jev. V obou testech bylo pozorováno, že dochází ke shlukování částic v místě buněk a dále k ovlivňování adheze buněk k povrchu. Jedná se o složité mechanismy, které dosud nebyly plně popsány a objasněny, a proto by mohly být předmětem budoucího výzkumu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALAGARASI, A., [2011]. *Introduction to nanomaterials*[online]. [cit. 2013-07-22]. Dostupné z: <http://www.nccr.iitm.ac.in/2011.pdf>
2. AMYN, S. T. a K. PEI-YOONG, 2009. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in crystal growth and characterization of materials* [online]. Iss. 55, s. 22-45 [cit. 2013-07-23]. ISSN 0960-8974. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960897408000168>
3. AZONANO, 2013. History and development of nanomaterials. In: AZoM. *Azonano: The A to Z of Nanotechnology* [online]. 16. 4. 2013 [cit. 2013-07-22]. Dostupné z: <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3393>
4. BERRY, C. et al., 2010. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalization. In: SOENEN, S. J. H. a M. D. CUYPER, 2010. *Assessing iron oxide nanoparticle toxicity in vitro: current status and future prospects. Nanomedicine* [online]. Vol. 5, iss. 8, s. 1261-1275. [cit. 2013-08-04]. ISSN 1748-6963. Dostupné z: <http://lib.bioinfo.pl/paper:21039201>
5. BRESSAN, E. et al., 2013. Nanotechnology to drive stem cell commitment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanotechnology* [online]. Vol. 8, iss. 3, s. 469-486 [cit. 2013-08-08]. ISSN 1939-0041. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wnan.1213/abstract>
6. BRUNNER, T. J. et al., 2006. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science & Technology* [online]. Vol. 40, iss. 14, s. 4374 - 4381 [cit. 2014-02-27]. ISSN 1520-5851. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/6884608_In_vitro_cytotoxicity_of_oxide_nanoparticles_comparison_to_asbestos_silica_and_the_effect_of_particle_solubility
7. CABÁKOVÁ, S., 2012. *Nestechiometrie částic γ -Fe₂O₃ a Fe₃O₄ a její projev v magnetických vlastnostech*. Olomouc. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální fyziky. Vedoucí diplomové práce Jiří Tuček. Dostupné z: http://theses.cz/id/0lpmm6/Diplomka-Silvie_Cabakova.pdf
8. CORNELL, R. M. a U. SCHWERTMANN, 2003. *The iron oxides: Structure, properties, occurrences and uses*. 2. vydání. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH &

- Co. KGaA. ISBN: 3-527-30274-3. Digitální kopie ve formátu PDF také dostupná z:
http://www.qi.fcen.uba.ar/materias/cqi/2011/infosuplementaria/practicas/practical/TheIronOxidesandUses_muya.pdf
9. ČSN EN ISO 10993-1, 2010. *Všeobecné předpisy a směrnice pro výroby zdravotnické techniky – Biologické hodnocení prostředků zdravotnické techniky – Část 1: Hodnocení a zkoušení*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. Katalogové číslo 86057.
 10. DOLNÍČEK, Z., 2005. *Laboratorní metody výzkumu* [elektronická skripta]. [cit. 2013-09-11]. Dostupné z: http://www.geology.upol.cz/Soubory/2005_Dolnicek_Zdenek_Metody_laboratorniho_vyzkumu.pdf
 11. DUMÉ, B., 2013. Positive or negative? Nanoparticle surface affects cell-membrane interactions. In: *Physic World. Physic World* [online]. 2013.7. 6. [cit. 2013-09-10]. Dostupné z: <http://physicsworld.com/cws/article/news/2013/jun/07/positive-or-negative-nanoparticle-surface-charge-affects-cell-membrane-interactions>
 12. FARADAY, M., 1857. *Experimental relations of gold (and other metals) to light*. Philosophical transactions of the Royal Society of London, vol. 147 (1857), s. 145-181. Published by: The Royal Society of London.
 13. FDEZ-GUBIEDA, L. M. et al., 2013. Magnetite biomineralization in magnetospirillum gryphiswaldense: Time-resolved magnetic and structural studies. *ACS Nano* [online]. Vol. 7, iss. 4, s. 3297-3305 [cit. 2013-11-08]. ISSN 1936-086X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nm3059983>
 14. FENG, W., B. WANG a Y. ZHAO, 2009. Nanotoxicity of metal oxide nanoparticles *in vivo*. In: SAHU, S. C. a D. A. CASCIANO. *Nanotoxicity*. From *in vivo* and *in vitro* models to health risks. Great Britain: John Wiley & Sons, Ltd. S. 1-29. ISBN 978-0-470-74137-5.
 15. FILIPOVÁ, Z., J. KUKUTSCHOVÁ a M. MAŠLÁŇ, 2012. *Rizika nanomateriálů*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN: 978-80-244-3201-4. Online dostupné ve formátu pdf z: <http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/rizika.pdf>
 16. GONZALES, M. et al., 2010. Cytotoxicity of iron oxide nanoparticles made from the thermal decomposition of organometallics and aqueous phase transfer with Pluronic F127. *Contrast media & molecular imaging* [online]. Vol. 5, iss. 5, s. 286-293

- [cit. 2014-04-13]. ISSN 1555-4317. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3020093/?report=classic>
17. GORMLEY, A. J. a H. GHANDEHARI, 2009. Evaluation of toxicity of nanostructures in biological systems. In: SAHU, S. C. a D. A. CASCIANO. *Nanotoxicity. From in vivo and in vitro models to health risks*. Great Britain: John Wiley & Sons, Ltd. S. 115-159. ISBN 978-0-470-74137-5.
18. GUPTA, A. K. a A. S. G. CURTIS, 2004. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* [online]. Vol. 15, iss. 4, s. 493-496 [cit. 2014-03-14]. ISSN 0957-4530.
Dostupné z: <http://search.proquest.com.proxy.k.utb.cz/docview/756334993>
19. GUPTA, A. K. a M. GUPTA, 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. Vol. 26, iss. 18, s. 3995-4021 [cit. 2013-08-08]. ISSN 0142-9612.
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961204009317>
20. IOWA STATE UNIVERSITY, © 2001-2012. *Introduction to magnetic particle inspection: The hysteresis loop and magnetic properties*. [cit. 2013-16-10].
Dostupné z: <http://www.ndted.org/EducationResources/CommunityCollege/MagParticle/Physics/HysteresisLoop.htm>
21. KALINA, M., 2012. Využití disperzního analyzátoru Zetasizer Nano ZS pro charakterizaci disperzních soustav. In: Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně. *Chempoint* [online]. 2012-05-07 [cit. 2013-09-16]. Dostupné z:
<http://www.chempoint.cz/vyuziti-disperzniho-analyzatoru-zetasizer-nano-zs-pro-charakterizaci-disperznich-soustav>
22. KANAPARTHY, R. a A. KANAPARTHY, 2011. The changing face of dentistry: nanotechnology. *International Journal of Nanomedicine* [online]. Vol. 6, s. 2799-2804 [cit. 2013-10-07]. ISSN: 1178-2013. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224707/>
23. KAZANTSEVA, N. E., 2012. Magnetic particle-filled polymer microcomposites. *Polymer Composites* [online]. Vol. 1, s. 613-672 [cit. 2013-16-10]. ISSN 9783527645213. Po zaplacení poplatku dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527645213.ch20/summary>

24. KUBÍNEK, R. a V. STRÁNSKÁ, [b. r.]. Úvod do problematiky nanotechnologií. In: *Upol.cz* [online]. [cit. 2013-07-22].
Dostupné z: <http://exfyz.upol.cz/didaktika/oprlz/nanotechnologie.pdf>
25. KRISHNAN, K. M., 2010. Biomedical nanomagnetism: A spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE transactions on magnetics* [online]. Vol. 46, iss. 7, s. 2523-2558. [cit. 2013-16-10]. ISSN 0018-9464.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949969/>
26. KOLHATKAR, A. G. et al., 2013. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 14, iss. 8, s. 15977-16009. [cit. 2014-04-11]. ISSN:1422-0067.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3759896/>
27. KVÍTEK, L., R. NOVOTNÝ a P. PIKAL, 1998. Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. *Chemické listy* [online]. Č. 92, s. 431-433 [cit. 2013-18-10]. ISSN 1213-7103.
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_05_431-433.pdf
28. LI, X. et al., 2010. Synthesis and magnetic properties of nearly monodisperse co-Fe₂O₄ nanoparticles through a simple hydrothermal condition. *Nanoscale Research Letters*. Vol. 5, iss. 6, s. 1039-1044 [cit. 2014-04-11]. ISSN:1931-7573.
Dostupné z: http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007_s11671-010-9599-9-3
29. LI, X. et al., 2012. Biocompatibility and toxicity of nanoparticles and nanotubes. *Journal of Nanomaterials* [online]. Vol. 2012 [cit. 2013-08-04]. ISSN 1687-4110.
Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2012/548389/>
30. MAHMOUDI, M. et al., 2011. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Cell vision versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS Nano* [online]. Vol. 5, iss. 8, s. 7263-7276 [cit. 2013-08-07]. ISSN 1936-086X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn2021088>
31. MANKE, A., L. WANG a Y. ROJANASAKULL, 2013. Mechanisms of nanoparticle induced oxidative stress and toxicity. *Bio Med Research International* [online]. Vol. 2013 [cit. 2013-11-08]. ISSN 2314-6141.
Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/942916/>

32. MARKIDES, H., ROTHERHAM M. a J. E. HAJ, 2012. Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. *Journal of nanomaterials* [online]. Vol. 2012 [cit. 2013-08-04] ISSN 1687-4110.
Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2012/614094/>
33. MODY, W., 2010. Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of pharmacy and bioallied sciences* [online]. Vol. 2, iss. 4, s. 282-289 [cit. 2013-07-23]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21180459>
34. MOLECULAR PROBES, 2002. *Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-12154)* [online]. [cit. 2014-02-18]. Life technologies.
Dostupné z: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp13154.pdf>
35. MOLECULAR PROBES, 2005. *Hoechst stains* [online]. [cit. 2014-02-18]. Life technologies. Dostupné z: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp21486.pdf>
36. MUNZAR, M. a T. ČERNOHORSKÝ, 2009. Testování mechanických vlastností nanomateriálů. *Chemagazín* [online]. Roč. 19, č. 4 [cit. 2013-08-04]. ISSN 1210-7409. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/chxix_4_cl1.pdf
37. OH, J. K. a J. M. PARK, 2011. Iron oxide based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical. *Progress in polymer science* [online]. Vol. 36, iss. 1, s. 168-189 [cit. 2013-07-23] ISSN 0079-6700. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670010000936>
38. PISANIC, T. R., S. JIN a V. I. SHUBAYEV, 2009. Iron oxide magnetic nanoparticle nanotoxicity: Incidence and mechanisms. In: SAHU, S. C. a D. A. CASCIANO. *Nanotoxicity. From in vivo and in vitro models to health risks*. Great Britain: John Wiley & Sons, Ltd. S. 397-425.
ISBN 978-0-470-74137-5.
39. POWERS, K. W. et al., 2009. Characterization of nanomaterials for toxicological evaluation. In: SAHU, S. a D. A. CASCIANO. *Nanotoxicity. From in vivo and in vitro models to health risks*. Great Britain: John Wiley & Sons, Ltd. S. 1-29. ISBN 978-0-470-74137-5.
40. REDDY, L. H. et al., 2012. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemistry*

- cal reviews* [online]. Vol. 112, iss. 11, s. 5818-5878 [cit. 2013-08-04]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr300068p>
41. ROCA, A. G. et al., 2009. Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for application in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics* [online]. Vol. 42,iss. 22 [cit. 2013-16-10]. ISSN 1361-6463.
Dostupné z: <http://iopscience.iop.org/0022-3727/42/22/224002>
42. RYAN, J. A., 2008. Introduction to animal cell culture. In: *Corning* [online]. [cit. 2013-16-10]. Dostupné z: http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro_animal_cell_culture.pdf
43. SANNA, V. a M. SECHI, 2012. Nanoparticle therapeutics for prostate cancer treatment. *Nanomedicine. Nanotechnology, biology and medicine* [online]. Vol. 8, iss. 1, s. 31-36 [cit. 2013-08-08]. ISSN 1549-9634.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22640911>
44. SOENEN, S. J. H. a M. D. CUYPER, 2010. Assessing iron oxide nanoparticle toxicity in vitro: current status and future prospects. *Nanomedicine* [online]. Vol. 5, iss. 8, s. 1261-1275. [cit. 2013-08-04]. ISSN 1748-6963.
Dostupné z: <http://lib.bioinfo.pl/paper:21039201>
45. SOVOVÁ, T. a V. KOČÍ, 2012. Ekotoxikologie nanomateriálů. *Chemické listy* [online]. Č. 106, s. 82-87 [cit. 2013-08-07]. ISSN 1213-7103.
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_02_82-87.pdf
46. STEPHENS, B. et al., 2013. Ultrafine particle emissions from desktop 3D printers. *Atmospheric environment* [online]. Vol. 79, s. 334-339 [cit. 2013-08-21]. ISSN 1352-2310. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231013005086>
47. ŠRÁMEK, J., 2009. Nanotechnologie v medicíně [elektronická skripta]. [cit. 2013-07-22]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/biofyz/doc/NMgr/>
48. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOUMOUCI, © 2009. Fyzikální princip měření magnetického pole. *Atmilab.upol.cz* [online]. [cit. 2013-16-10].
Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/texty/squid.pdf>
49. VŠB-TU OSTRAVA, © 2007. Historie moderních technologií. *Vsb.cz* [online]. [cit. 2013-08-04]. Dostupné z: http://nanotechnologie.vsb.cz/Historie/nano_historie.pdf

50. WANG, Y. J., 2011. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quantitative imaging in medicine and surgery*. Vol. 1, iss. 135 [cit. 2014-04-13]. ISSN: 2223-4292. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3496483/>
51. WUJCIK, E. K. a C. N. MONTY, 2013. Nanotechnology for implantate sensors: carbon nanotubes and graphene in medicine. *Nanomedicine. Nanotechnology, Biology and Medicine*[online]. Vol. 5, iss. 3, s. 233-249 [cit. 2013-08-08]. ISSN 1549-9634. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450525>
52. YANG, J., TANG W. a X. WANG, 2010. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles may affect endothelial progenitor cell migration ability and adhesion capacity. *Cytotherapy*. Vol. 12, no. 2251 [cit. 2014-03-26]. ISSN:1465-3249. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S1465324910703868?_rdoc=1&_fmt=high&_origin=gateway&_docanchor=&md5=b8429449ccfc9c30159a5f9aeaa92ffb&ccp=y
53. ZBORIL, R., MASHLAN M., PETRIDIS D, 2002. Iron(III) oxides from thermal processes-synthesis, structural and magnetic properties, Mössbauer spectroscopy characterization and applications. *Chemicalmaterials* [online]. Vol. 14, s. 969-982 [cit. 2013-08-04]. ISSN 969-982. Dostupné z: <http://www.rcptm.com/wp-content/uploads/2012/08/2002-CHEMISTRY-OF-MATERIALS-IronIII-oxides-from-thermal-processes-synthesis-structural-and-magnetic-properties-Mossbauer-spectroscopy.pdf>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

p-NIPAAM	Poly(N-isopropylakralamid)
MR	Magnetická resonance
ROS	Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
NIH/3T3	Buněčná linie myších fibroblastů
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Směr jednotlivých atomových magnetických momentů v různých typech materiálů. Upraveno dle Aryn a Pei-Yoong, 2009.....	21
Obrázek č. 2 Hysterezní křivka superparamagnetického materiálu (a) a feromagnetického materiálu (b), upraveno dle (Li et al., 2010).....	23
Obrázek č. 3 Účinky ROS, upraveno dle Manke, Wang a Rojanasakul, 2013.....	32
Obrázek č. 4 Strukturní vzorec 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (Molecular Probes, 2002).....	44
Obrázek č. 5 Graf závislosti absorpance na koncentraci buněk (Molecular Probes, 2002).....	45
Obrázek č. 6 Strukturní vzorec fluorescenčního barviva Hoechst 33258 (Molecular Probes, 2005).....	46
Obrázek č. 7 Graf závislosti absorpance na koncentraci extraktu nanočástic	48
Obrázek č. 8 Mikrofotografie buněčné linie NIH/3T3 při vyhodnocení cytotoxicity extraktu: A) refernce B) 5 %; C) 25 %; D) 50 %; E) 75 %; F) 100 %. Zvětšení mikrofotografií je 100	50
Obrázek č. 9 Mikrofotografie přímého kontaktu nanočástic s buněčnou linií NIH/3T3. Snímky A) – D) pořízeny mikroskopem s fázovým kontrastem a snímky E), F) pořízeny fluorescenčním mikroskopem. Koncentrace částic v 1 ml média: A) 0 mg- reference, B) 2 mg, C) 4 mg, D) 6 mg, E) 0 mg- reference, F) 6 mg	52
Obrázek č. 10 Mikrofotografie migrace buněčné linie NIH/3T3 při přímém kontaktu s nanočásticemi. Koncentrace nanočástic v 1 ml média: A) 1 mg (před vložením do inkubátoru) B) 0 mg - reference, C) 1 mg, D) 2 mg, E) 4 mg, F) fotografie plata, G) 1 mg, H) 4 mg.....	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Stanovení vlivu extraktu nanočástic železa na buněčnou viabilitu.....	48
--	----