

Cytotoxicita kompozitů železitých nanočástic

Kateřina Skopalová

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Skopalová**

Osobní číslo: **T12356**

Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Cytotoxicita kompozitů železitých nanočástic**

Zásady pro vypracování:

Studentka se v rámci teoretické práce seznámí s doposud publikovanými informacemi o možnostech přípravy magnetických nanočástic a jejich kompozitů. Také se zaměří na testování jejich materiálových a biologických vlastností. V rámci praktické části bakalářské práce se studentka obeznámí s prací v laboratoři buněčných kultur, kde si osvojí základní techniky práce v laboratořích. Zaměří se na stanovení a vyhodnocení testů cytotoxicity kompozitů železitých 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. Zdenka Kuceková**
Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **16. ledna 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **25. května 2015**

Ve Zlíně dne 2. března 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Skopalová Kateřina

Obor: Polymerní materiály a technologie

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 20. 5. 2015



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 nevdělečně 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 vzdělávacího 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

Magnetické nanočástice díky svým jedinečným vlastnostem nacházejí uplatnění v biomedicínských aplikacích. Avšak samostatné magnetické nanočástice mohou vykazovat cytotoxický efekt, což je ve zmíněných aplikacích nežádoucí jev. Použitím kompozitů se může cytotoxicita snížit a navíc mají vhodnější vlastnosti pro aplikaci. Proto, je daná práce zaměřena na *in vitro* testování cytotoxicity kompozitů železitých nanočástic, konkrétně kompozity maghemitu na bázi silikonu. Pomocí MTT testu byl vyhodnocen vliv extraktu kompozitů železitých nanočástic na buněčnou linii myších fibroblastů. Také byl posuzován přímý vliv kompozitů železitých nanočástic na buněčnou linii.

Klíčová slova: Nanomateriály, nanokompozity železitých nanočástic, cytotoxicita, buněčná lini NIH/3T3

ABSTRACT

Thanks to the unique properties, magnetic nanoparticles take place in biomedical applications. However, pure magnetic nanoparticles exhibit different levels of cytotoxicity, which is undesirable in these applications. The cytotoxic effect could be reduced by using of composites of the nanoparticles. Therefore, this bachelor thesis is focused on the *in vitro* testing of the cytotoxic effect of iron oxides composites, concretely maghemite based silicone composites were used. The influence of cytotoxicity of composite extracts was determined by MTT assay using mouse fibroblast cell line. Moreover, the direct contact of composites to the cell line was observed.

Keywords: Nanomaterials, iron oxide composites, cytotoxicity, NIH/3T3 cell line

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Zdence Kucekové, Ph.D, za poskytnutí cenných rad, ochotu a trpělivost při vedení této práce a také za pomoc při práci v laboratořích 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 A NANOTECHNOLOGIE	12
1.1 VYUŽITÍ NANOMATERIÁLŮ	12
1.2 RIZIKA NANOMATERIÁLŮ	13
2 KOVOVÉ NANOMATERIÁLY.....	14
2.1 OXIDY ŽELEZA	14
2.1.1 Struktura a magnetické vlastnosti	14
2.1.2 Hematit (α -Fe ₂ O ₃)	15
2.1.3 Maghemit (γ -Fe ₂ O ₃)	16
2.1.4 Magnetit (Fe ₃ O ₄)	16
2.2 PŘÍPRAVA.....	17
2.3 APLIKACE V BIOMEDICÍNĚ.....	18
2.3.1 Magnetická resonance (MRI).....	18
2.3.2 Hypertermie.....	19
2.3.3 Cílené uvolnění léčiv.....	19
3 NANOKOMPOZITY	21
3.1 NANOKOMPOZITY V BIOMEDICÍNĚ.....	21
3.2 NANOKOMPOZIT MAGHEMITU NA BÁZI SILIKONU	21
3.2.1 Syntéza kompozitu maghemitu na bázi silikonu.....	21
4 BIODOPATIBILITA NANOMATERIÁLŮ	23
4.1 BIODOPATIBILITA	23
4.1.1 Principy biodopatibility.....	23
4.2 NANOTOXIKOLOGIE.....	24
4.2.1 <i>In vitro, in vivo</i>	24
4.2.2 Buněčné kultury	25
4.2.2.1 Typy buněčných kultur.....	25
4.2.2.2 Kultivační médium	26
4.2.3 Stanovení cytotoxicity materiálu <i>in vitro</i>	26
4.2.3.1 Zkouška extraktem	26
4.2.3.2 Zkouška přímým kontaktem.....	26
4.2.3.3 Zkouška nepřímým kontaktem.....	27
4.2.4 Metody k stanovení viability a proliferace buněk	27
4.2.4.1 MTT test	27
4.2.4.2 Průtoková cytometrie.....	28
4.2.5 Metody studia genotoxicity	29
4.2.5.1 Amesův test	29
4.2.5.2 Kometový test.....	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
5 CÍL PRÁCE	32
6 MATERIÁL A METODIKA	33

6.1	TESTOVANÉ NANOČÁSTICE.....	33
6.2	BUNĚČNÉ KULTURY A MÉDIUM	33
6.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	33
6.4	EXPERIMENT	33
6.4.1	Kultivace a trypsinizace	34
6.4.2	Přidání vzorku	34
6.4.3	MTT test.....	35
7	VÝSLEDKY	36
7.1	STANOVENÍ CYTOTOXICITY EXTRAKTU KOMPOZITŮ ŽELEZITÝCH NANOČÁSTIC NA LINII NIH/3T3.....	36
7.2	STANOVENÍ CYTOTOXICITY KOMPOZITŮ ŽELEZITÝCH NANOČÁSTIC NA BUNĚČNOU LINII NIH/3T3 V PŘÍMÉM KONTAKTU.....	38
8	DISKUZE	41
	ZÁVĚR	43
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	44
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	50
	SEZNAM OBRÁZKŮ	51
	SEZNAM TABULEK.....	52
	SEZNAM GRAFŮ	53

ÚVOD

Nanočástice oxidů železa a jejich kompozitů mají díky svým magnetickým vlastnostem a velikosti vhodné vlastnosti pro využití v biomedicínských aplikacích. V teoretické části práce jsou popsány jednotlivé příklady aplikací, konkrétně magnetická resonance, hypertermie a cílené uvolnění léčiv. Práce však není zaměřena pouze na využití nanočástic, ale můžeme se v ní seznámit i s jejich fyzikálními vlastnostmi nebo přípravou.

Vzhledem k využití v biomedicíně, je u používaných nanomateriálů důležitá jejich biokompatibilita. Jednou z podmínek biokompatibility je, aby materiál nevyvolal cytotoxický účinek. Cílem praktické části bylo tedy stanovit cytotoxicitu kompozitů železitých nanočástic a to konkrétně kompozitů maghemitu na bázi silikonu. Z tohoto důvodu se praktická část předložené bakalářské práce zabývá testováním vlivu extraktu kompozitů na buněčné linie myších fibroblastů. Vyhodnocení cytotoxicity bylo provedeno pomocí MTT testu, který je popsán i v teoretické části práce. Pro posouzení morfologie buněk byly pořízeny i snímky pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Dále byla cytotoxicita kompozitů posuzována v přímém kontaktu s buněčnou linií. Po dobu jednoho týdne byly buňky inkubovány v přítomnosti kompozitů železitých nanočástic, sledovány a průběžně byly pořizovány mikrofotografie opět pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem.

Nízké koncentrace nanočástic oxidů železa jsou považovány za necytotoxické, ve vyšších dávkách a při delších dobách expozice ale dochází ke snížení viability buněk. Použitím jejich vhodných kompozitů se cytotoxicita může výrazně ovlivnit, což potvrzují i výsledky praktické části práce. Zkoumaný nanokompozit maghemitu na bázi silikonu nevykazoval cytotoxicitu ani při vysokých koncentracích či při delší době expozice. Proto je tedy vhodným materiálem pro využití v biomedicínských aplikacích.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NANOMATERIÁLY A NANOTECHNOLOGIE

Nanomateriály (NM) jsou definovány jako látky, u nichž je alespoň jeden rozměr menší než 100 nanometrů. Pro představu je jeden nanometr 100 000krát menší než průměr lidského vlasu (Alagarasi, 2011).

Obor nanotechnologie se zabývá výzkumem a také technologickým vývojem na atomové, molekulární nebo makromolekulární úrovni. V nanotechnologii se zkoumá i vytváření a používání struktur, zařízení a systémů, které mají vzhledem ke svým malým nebo intermediárním rozměrům nové vlastnosti a funkce (Prnka a Šperlink, 2004).

Nanotechnologie se v posledních letech rozvíjí v řadě oblastí, např. v oblasti nanomateriálů, kde jsou zkoumány a vyvíjeny nové druhy materiálových systémů, dále v nanoelektronice, která se zaměřuje na elektronické vlastnosti nanostruktur pro využití v budoucích informačních technologiích, nebo nanobiotechnologie, kde se nanotechnologie využívá při zkoumání biologických systémů, což bude mít využití v lékařských technikách a při molekulární diagnostice (Prnka a Šperlink, 2004).

1.1 Využití nanomateriálů

Jak již bylo zmíněno, NM mají velice široké spektrum využití. Každá z aplikací si vyžaduje odlišné vlastnosti použitého NM (Tartaj et al., 2003). Např. v kosmetickém průmyslu si našli uplatnění nanočástice oxidu titaničitého TiO_2 a oxidu zirkoničitého ZrO_2 , které se přidávají do opalovacích krémů a pleťových vod. Oxid titaničitý se nepoužívá pouze v kosmetice ale také například na optimální zatmavení skel. Povrch skla se dá také pokrýt nanočásticemi oxidu křemičitého SiO_2 , čímž dojde k zabránění srážení vody na skle a využívá se především pro skla automobilů nebo koupelňových zrcadel. Nanostrukturní povlaky se mohou nanášet také na řezné nástroje a části strojů, které se tak stanou odolnější vůči oděru a opotřebení. V nanoelektronice se využívají fullereny pro výrobu tranzistorů, displejů a pamětí s lepšími vlastnostmi než mají doposud. Lze vyrobit i fullereny válcového tvaru, čímž vznikají čistě uhlíkaté nanotrubky. Nanotrubky jsou vzhledem ke svojí lehkosti velice pevné a mohou vést teplo a elektrický proud. Vyrobita se z nich pevná folie, která se používá při výrobě skel. Taková skla se pak díky použité folii stávají pevnější a díky již zmíněným vlastnostem je lze vyhřívat (Kubínek a Stránská,).

V oděvním průmyslu nanočástice umožňují výrobu bavlněných tkanin, které se nemačkají a nešpiní. Z textilních nanovláken se vyrábí pevné textilie. Textilie obsahují póry

a mají velice dobrou filtrační schopnost, ale nejsou propustné pro bakterie či viry, proto našli své využití v medicíně pro krytí ran nebo při rekonstrukci kůže, kostí, svalů či nervové tkáně. Tyto textilie dokáží také dobře absorbovat zvuk, dají se tedy využít k odhlučnění např. automobilových interiérů (Kubínek a Stránská,).

Široké využití mají NM také v biomedicíně jako kontrastní látky při magnetické resonanci, k léčení rakoviny pomocí hypertermie nebo jako nosiče léčiv (Gupta a Gupta, 2005). Této problematice bude věnována samostatná kapitola.

1.2 Rizika nanomateriálů

S NM přichází spousta možností využití jejich unikátních vlastností, ale také ekologické a morální problémy s jejich případným využitím pro změnu charakteru existence. Kvůli přehledu dopadu používání nanotechnologií na společnost a životní prostředí byla vypracována řada studií. Avšak momentálně není možné předpovědět veškeré důsledky nových aplikací, navíc některé z nich se mohou projevit až za velmi dlouhou dobu (Hošek, 2010). To, zda je nanočástice v daném prostředí aktivní a riziková, závisí na jejích vlastnostech, např. na velikosti a tvaru. Vezmeme-li pro ukázkou vlákna azbestu, která jsou nebezpečná až v mikrorozměrech, budou i NM hrozcím nebezpečím až při určité velikosti. Nanočástice se do prostředí dostávají lidskou činností, jako jsou spalovací procesy, svařování, opotřebování pneumatik, ale i zcela přirozenými přírodními pochody, jako je například vulkanická erupce nebo mořský příboj. Z prostředí potom díky svojí velikosti mohou pronikat absorpcí přes kůži, požitím nebo vdechnutím do živých organismů a ovlivňovat fyziologické procesy v buňkách (Hošek, 2010). Nejčastěji dojde k poškození biomembrán a buněčných proteinů, poškození DNA, narušení respirace - transportu elektronů v buňce a vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) (Sovová a Kočí, 2011).

Zatím byly NM nejvíce testovány na bakteriích, sladkovodních korýších, řasách a rybách. Jak je známo již řadu let, na bakterie má největší toxický účinek stříbro Ag, u sladkovodních organismů byla pozorována toxicita u oxidu titaničitého TiO_2 , oxidu zinečnatého ZnO a měďnatého CuO nebo u fullerenu. Stále je velmi málo informací o účincích NM na mořské organismy. NM se v mořské vodě chovají jinak než ve sladkovodní a vzhledem k tomu že většina průmyslového odpadu obsahující nanočástice končí v mořích, neměl by se tento výzkum zanedbávat. Nedostatečné údaje máme také pro suchozemské organismy nebo pro vyšší rostliny (Sovová a Kočí, 2011).

2 KOVOVÉ NANOMATERIÁLY

Největší uplatnění z různých druhů NM mají ty, které se skládají z přechodných kovů, jako je stříbro, železo a jeho oxidy. Dále se hodně využívají oxidy titanu, zinku nebo ceru (Sovová a Kočí, 2011). Pro biomedicínské aplikace jsou díky svým vlastnostem využívány oxidy železa, proto se na ně v následujících kapitolách zaměříme.

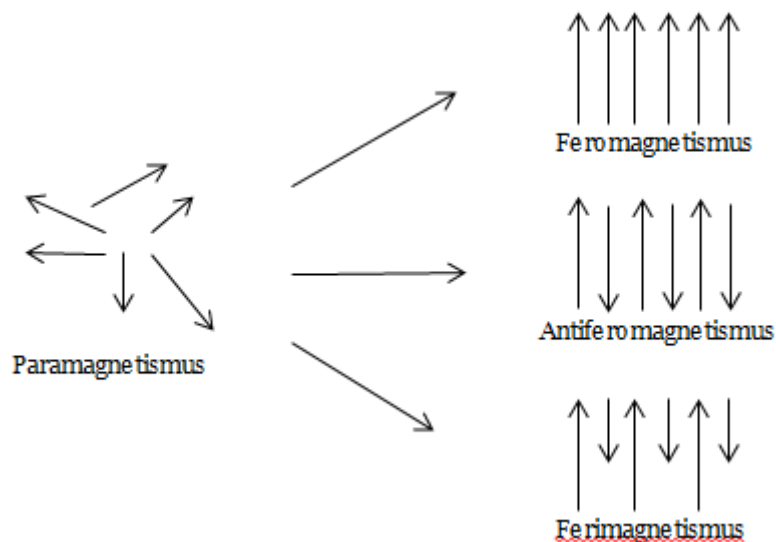
2.1 Oxidy železa

Oxidy železa se v přírodě vyskytují v mnoha formách. Nejčastěji ve formě hematitu (α - Fe_2O_3), magnetitu (Fe_3O_4) a maghemitu (γ - Fe_2O_3). Hematit patří mezi nejstarší známé oxidy železa a je rozšířen v horninách a půdách (Teja a Koh, 2009) a řadí se mezi látky se slabým magnetickým polem. Magnetit a maghemit, které se také vyskytují v horninách, jsou oxidy se silným magnetickým polem a díky své biokompatibilitě mají větší uplatnění. Již zmíněné oxidy se dají mnoha způsoby synteticky vyrobit a mít požadované vlastnosti a velikost (Tuček, 2012). Mezi oxidy železa také patří velmi vzácné formy β - Fe_2O_3 a ϵ - Fe_2O_3 , které se v přírodě téměř nevyskytují (Upol.cz) a jejich čisté formy je velice obtížné v laboratořích připravit (Tuček, 2012).

2.1.1 Struktura a magnetické vlastnosti

Téměř všechny oxidy železa jsou krystalické. Struktura a velikost krystalů závisí na podmínkách, ve kterých se krystaly tvoří (Cornell a Schwertmann, 2003). Nanočástice oxidů železa můžeme rozdělit podle jejich reakce na vnější magnetické pole (Gupta a Gupta, 2005). Mohou být paramagnetické, feromagnetické, antiferomagnetické nebo ferimagnetické. Atom železa obsahuje čtyři nepárové elektrony v 3d orbitalech a díky tomu má velice silný magnetický moment. Pokud je krystal v paramagnetickém stavu, jsou jeho atomové magnetické momenty náhodně uspořádány vůči sobě navzájem a jeho výsledný magnetický moment je nulový. Vloží-li se takový krystal do vnějšího magnetického pole, dojde k seřazení některých atomových momentů v jednom směru a bude tak vykazovat malý magnetický moment. Krystal ve feromagnetickém stavu má všechny jednotlivé momenty vyrovnány stejným směrem i bez vnějšího magnetického pole (Teja a Koh, 2009). Po odstranění z magnetického pole takovým látkám nezůstávají žádné magnetické vlastnosti (Gupta a Gupta, 2005). V případě feromagnetismu se jedná o kooperativní jev, jelikož se u jednotlivých atomů neprojeví, projeví se až v případě, kdy je určitý počet atomů svázan v pevné formě. Po odstranění feromagnetické částice z magnetického pole zůstane perma-

neně zmagnetizovaná (Gupta a Gupta, 2005). Ferimagnetické krystaly obsahují dva typy atomů s různými magnetickými momenty, které jsou uspořádány antiparalelně proti sobě. V případě antiferomagnetických krystalů jsou magnetické momenty také uspořádány antiparalelně, ale mají stejnou velikost, tudíž je výsledný moment nulový.



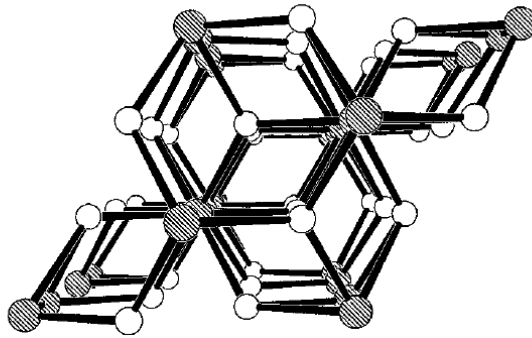
Obrázek č. 1 Znárodnění atomových momentů v jednotlivých typech materiálů.

Upraveno dle Teja a Koh, 2009.

Nanočástice malých rozměrů (1-30 nm) mají superparamagnetické vlastnosti. Takové látky vykazují velmi silnou odpověď na vnější magnetické pole, mají nízkou nebo nulovou zbytkovou magnetizaci, tím pádem se po vypnutí vnějšího pole nepřitahují mezi sebou a jsou tak snadněji dispergovatelné (Babič, 2012).

2.1.2 Hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

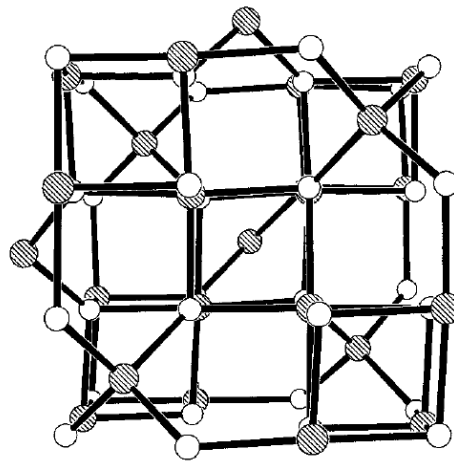
Hematit se vyskytuje v přírodě ve formě hnědočervených minerálů v horninách (Dudek, 2006). Má rhombodendrálně centrovanou hexagonální krystalovou strukturu korundového typu. Obsahuje hexagonálně těsně vázané ionty kyslíků, které jsou navrstvené podél krystalografického směru. $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ je schopný dvou magnetických přechodů: první je přechod ze stavu paramagnetického do slabě feromagnetického při teplotě 677 °C, druhý je přechod ze slabě feromagnetického do antiferomagnetického stavu a to při teplotě -8°C (Tuček, 2012).



Obrázek č. 2 Krystalická struktura hematitu, šedé kola jsou Fe, bílé O (Zboril, Mashlan a Peridis, 2002)

2.1.3 Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

Maghemit se vyskytuje v přírodě také jako minerál v horninách. Obsahuje pouze trojmocné železo a má kubickou krystalovou strukturu (Cornell a Schwertmann, 2003). Podle magnetismu se řadí mezi ferimagnetické materiály. Pokud je však průměr nanočástic menší než 30 nm získá superparamagnetické vlastnosti (Tuček, 2006)



Obrázek č. 3 Krystalická struktura magnetitu, šedé kola Fe, bílé O (Zboril, Mashlan a Peridis, 2002)

2.1.4 Magnetit (Fe_3O_4)

Magnetit, známý také jako magnetovec, má černou barvu a jedná se o nejrozšířenější a nejdůležitější železnou rudu vůbec (Dudek, 2006). Svoji strukturou i magnetickými vlastnostmi by se dal srovnat s maghemitem ale na rozdíl od ostatních oxidů železa obsa-

huje dvojmocné i trojmocné železo. Má plošně centrovanou kubickou strukturu a stejně jako maghemit má ferimagnetické vlastnosti (Cornell a Schwertmann, 2003).

2.2 Příprava

Nanočástice oxidů železa se dají připravit různými metodami, ať už je to vysrážení v roztoku, syntéza nanočástic z plynné fáze, metoda sol-gel, redukce organických sloučenin, hydrotermální reakce a mnoho dalších. Srážení v roztoku je metoda, která umožňuje přípravu magnetických nanočástic přesně daných tvarů a velikostí. Částice se připravují pomocí homogenních srážecích reakcí, kdy je nukleace a růst jader oddělena (Tartaj et al., 2003). Taková metoda je poměrně levná, ke srážení dochází především ve vodných roztocích, ale mohou být použita i jiná kapalná rozpouštědla. Fáze a velikost částic je závislá na koncentraci kationtů a pH (Teja a Koh, 2009).

Díky použití metody sol-gel je možné dosáhnout monodisperzní přípravy nanočástic. V reakčním roztoku jsou prekursorů ale i další látky jako jsou např. stabilizátory, pomocí kterých se upravují probíhající chemické reakce (Hošek, 2010), kterými jsou hydrolyza a kondenzace. V tomto případě je roztokem také většinou voda, ale může být přítomna i kyselina nebo báze. Použitím báze se vytváří koloidní gely, v případě použití kyseliny se získá polymerní forma gelu. Velikost vznikajících nanočástic je ovlivněna rychlostí hydrolyzy a kondenzace, čím je hydrolyza pomalejší, tím jsou i částice menší (Teja a Koh, 2009).

Syntéza z plynné fáze také umožňuje připravit nanočástice o poměrně stejných tvarech a i velikostech. V této metodě probíhají reakce jako je pyrolýza (tepelný rozklad), redukce, hydrolyza, oxidace a další reakce vedoucí k vysrážení pevných produktů z plynné fáze. CVD (chemical vapor deposition) proces probíhá tak, že se dodává kontinuálně plyn s prekursorů do reakční komory se sníženým tlakem a teplotou vyšší než 900°C, v níž dochází ke vzniku nanočástic. Výsledná velikost a morfologie částic se upravuje následným tepelným zpracováním v prouděch vysoce čistých plynů (Teja a Koh, 2009).

Hydrotermální reakce za vysokých tlaků využívají schopnosti vody, která za zvýšených tlaků a teplot dokáže hydrolyzovat a dehydratovat kovové soli, díky čemuž vznikají téměř nerozpustné oxidy kovů. Pomocí tlaku, teploty a reakční doby se reguluje nukleace a růst nanočástic. Výhodou této přípravy nanočástic je ekologicky nezávadný proces, vzhledem

k tomu, že se nepoužívají žádná organická rozpouštědla nebo post-procedury jako je žihání (Teja a Koh, 2009).

2.3 Aplikace v biomedicině

V posledním desetiletí se obor nanotechnologie vyvinul tak, že lze vyrobit nanočástice se speciálními funkčními vlastnostmi, díky kterým jsou pak vhodné pro využití v biomedicině (Gupta a Gupta, 2005).

Jedním z hlavních problémů využívání nanočástic pro léčbu je, jak dostat danou částici na určité místo v těle. Výhodné je použít magnetické nanočástice, které se pomocí magnetického pole mohou koncentrovat na požadovaném místě. Oxidy železa tento požadavek splňují. Díky jejich vlastnostem můžeme využít nové možnosti pro aplikace v biomedicině, konkrétně zlepšení kvality magnetické resonance (MRI), léčbu nádorových onemocnění pomocí hypertermie nebo umožnění lokálního / cíleného uvolnění léčiv pouze do specifického místa. Pro *in vivo* aplikace jsou nejpoužívanější částice magnetitu (Fe_3O_4) a částice maghemitu (Fe_2O_3), jelikož jsou fyziologicky velice dobře snášeny (Berry a Curtis, 2003).

2.3.1 Magnetická resonance (MRI)

Magnetická resonance je neinvazivní technika, která poskytuje průřezové obrazy zevnitř pevných materiálů a živých organismů (Richardson et al., 2005). Při daném vyšetření jsou sledovány změny rotačních pohybů jader atomů (spinů). Nejvíce se využívají atomy vodíku v molekulách vody. Při vystavení magnetickému poli začnou atomy srovnávat osy svých magnetických dipólů do směru tohoto pole. Po odstranění vnějšího magnetického pole nastane relaxace atomů do původního stavu a dojde k vyzaření energie. Díky tomu můžeme vytvořit obraz, pomocí kterého rozlišíme zdravé tkáně od patologických (Mazánek et al., 2014). Obrazy mohou být zlepšeny přidáním kontrastní látky, běžně se používají gadoliniové cheláty. Tyto látky ale mají rychlou tendenci se kumulovat v játrech a díky tomu mají krátké působení (Berry a Curtis, 2003).

Nanočástice oxidů železa hrají jako kontrastní látky velice důležitou roli. Aby mohly být použity, musí splňovat daná kritéria: musí účinkovat při dostatečně nízkých koncentracích, aby se zabránilo potenciální toxicitě, musí mít vhodné vlastnosti pro doručení do konkrétní tkáně nebo orgánu, musí v cílovém místě zůstat po takovou dobu, aby mohlo dojít k vytvoření obrazu, a v neposlední řadě musí být v přiměřené době (několik hodin) vyloučeny z těla (Krishnan, 2010).

2.3.2 Hypertermie

Hypertermie je léčebný postup, při kterém dochází ke zvýšení teploty v částech těla, která jsou postižena nádorovým onemocněním. Praktikuje se společně s jinými léčbami rakoviny (Tartaj et al., 2003), jako je chemoterapie nebo radioterapie. Jedná se tedy o podpůrnou metodu. Při aplikaci hypertermie zároveň s radioterapií se dávka ozáření zmenší až o 30% (Krishnan, 2010). Při samotné hypertermii dochází k buněčnému zabíjení nádorových buněk při teplotách 41-43°C (Tartaj et al., 2003). Zdravé buňky jsou za normálního pH (okolo 7,4) a za standartní teploty růstu (37,5°C) dobře zásobené kyslíkem a živinami. V nádorech je živin a kyslíku nedostatek a také hodnota pH je jiná, což vede k tomu, že jsou takové buňky více citlivé na změny teplot. Změna teploty mění funkce v mnoha konstrukčních a enzymatických proteinech v buňkách, které se podílí na růstu a diferenciaci buněk a apoptóze (Krishnan, 2010). Zvýšení teploty může být dosaženo použitím magnetických nanočástic oxidů železa. Tyto částice jsou ohřívány působením vnějšího střídavého magnetického pole (Tartaj et al., 2003). Magnetický materiál uvnitř nádoru akumuluje energii magnetického pole. V současné době se využívají tři metody: přímá vstříkovací hypertermie (DIH - direct injection hyperthermia), hypertermie pomocí intersticiálního implantátu (IIH - interstitial implant hyperthermia) a hypertermie pomocí arteriální embolizace (AEH - arterial embolization hyperthermia) (Smolkova et al., 2015).

V případě DIH se přímo do nádoru vstříkují tekutina složená z magnetických nanočástic. Hlavním problémem této metody je nerovnoměrné rozložení a špatné zachování nanočástic v nádorové tkáni. Při IIH se feromagnetický materiál chirurgicky implantuje v podobě částic do nádoru. Velikost částic se pohybuje v rozmezí několik milimetrů. Nevýhodou je, že implantace částic je poměrně obtížná, může dojít k jejich korozi, alergiím způsobených materiálem a také ke zhoršení budoucích radiologických vyšetření. Při AEH se vstříkují nízkoviskozní magnetický materiál do tepny, která dodává krev do nádoru. Důležitou vlastností materiálu je aby byl schopen v daném místě tvořit gely, čímž dojde k zastavení dodávky krve do nádoru, tedy k embolizaci. Tato metoda je nejvhodnější pro léčbu jaterních nádorů, vzhledem k tomu že takové nádory bývají zásobovány krví hlavně pomocí arteriálního systému (Smolkova et al., 2015).

2.3.3 Cílené uvolnění léčiv

Nevýhodou léčení rakoviny pomocí chemoterapie je, že je relativně nespecifická. Léky se podávají intravenózně a dochází k jejich distribuci v celém systému, což vede k vedlej-

ším škodlivým účinkům jako je napadení i zdravých buněk (Pankhurts, 2003). Proto mezi další velice slibné aplikace magnetických nanočástic patří jejich využití jako nosičů léčiv pro místně specifické uvolnění léků. Velikost, náboje a povrch částic jsou v tomto případě velice důležité. Např. částice s průměrem větším než 200 nm se ukládají ve slezině a nakonec jsou odstraněny fagocytujícími buňkami a s průměrem menším než 10 nm jsou velice rychle odstraňovány pomocí extravazace. Optimální velikost částic se pohybuje v rozmezí 10 až 100 nm. Částice v této velikosti jsou dostatečně malé na to, aby se vyhnuly retikuloendotelovému systému, a také mohou pronikat do velmi malých kapilár v tělesných tkáních (Gupta a Gupta, 2005). Magnetické nanočástice mají tendenci se shlukovat a adsorbovat na plazmatické proteiny. Tomuto se zabrání povrchovým pokrytím částic pomocí amfifilních polymerních látek, jako je polyethylenglykol (Gupta a Gupta, 2004) nebo dextran (Pankhurts, 2003). Nosič se tedy skládá z magnetického jádra (magnetit, maghemit) a vnějšího obalu. Nosiče léků se injekčně vpraví do krevního řečiště a pomocí vnějšího magnetického pole se dosáhne jejich koncentrace na určitém cílovém místě v těle. Lék se potom uvolní pomocí enzymatické aktivity nebo změny fyziologických podmínek jako je pH, osmolalita nebo teplota (Pankhurts, 2003).

3 NANOKOMPOZITY

Jako nanokompozit se označuje materiál, který je složen ze dvou nebo více heterogenních složek, přičemž alespoň jedna z nich nepřesahuje svými rozměry hodnotu 100nm. Nanokompozity se stejně jako ostatní nanomateriály mohou vyskytovat v přírodě a to např. v kostech nebo ve schránkách korýšů. Uměle připravované nanokompozity se používají od 70. let 20. století (Hošek, 2010).

3.1 Nanokompozity v biomedicíně

Jak již bylo zmíněno, železité nanočástice jsou využívány pro biomedicínské aplikace jako je např. hypertermie nebo MRI. Ve většině případů je vhodné použít povrchové pokrytí, které ovlivňuje koloidní stabilitu v krvi, agregační chování a cytotoxicitu. (Schweiger et al., 2011). Po správné povrchové úpravě mohou být takové nanočástice rozptýleny do rozpouštědel za vzniku homogenní suspenze, pokud se jedná o suspenzi železitých nanočástic pak ji označujeme jako ferrofluid. Povrch může být upraven např. pomocí organických polymerů, kovů (např. zlato), nebo pak oxidu křemičitého či hlinitého (Andrade et al., 2013).

3.2 Nanokompozit maghemitu na bázi silikonu

Nanokompozit maghemitu na bázi silikonu se využívá pro léčbu jaterních nádorů pomocí AEH. Tento materiál má díky silikonové části embolizační schopnost a díky maghemitu vysokou účinnost při vytápění nádoru pomocí střídavého magnetického pole. Počáteční složky kompozitu jsou voleny tak, aby materiál zůstal kapalný po dobu 20 minut, což je doba postačující k zaplnění takovým materiálem cévní systém nádoru. Po uplynutí této doby se začne rychle zvyšovat jeho viskozita, dojde k vytvoření embolie a k uzavření cévy zásobující nádor krví (Smolkova et al., 2015).

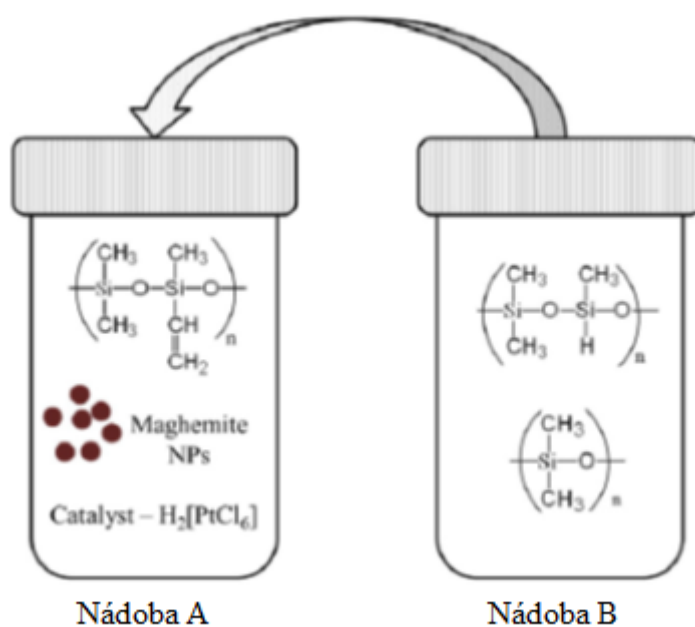
Silikonové kaučuky jsou biokompatibilní, nevykazují přilnavost na živé tkáně a vzhledem k tomu, že jsou měkké, nepoškozují cévy. Jsou schopny těsně přiléhat na stěnách cév, čímž se snižuje pravděpodobnost obnovy průtoku krve (Smolkova et al., 2015).

3.2.1 Syntéza kompozitu maghemitu na bázi silikonu

Nanočástice maghemitu se připravují srážením chloridu železnatého a železitého ve vodném amoniaku. Reakce se provádí v atmosféře argonu při teplotě 70°C a za stálého míchání při 700 otáčkách za minutu. Vznikající černý prášek se magneticky oddělí, promy-

je destilovanou vodou do neutrálního pH a vysuší se na vzduchu. Dále se prášek žihá po dobu 6 hodin při teplotě 300°C. Žihání vede k oxidaci všech železnatých iontů a přechodu magnetitu na maghemit. Silikonový elastomer se připravuje podle popisu v patentech (Smolkova et al., 2015).

Pro přípravu kompozitu se v jedné nádobě (A) smíchá poly (dimethylsiloxane-ko-methylvinylsiloxan), nanočástice maghemitu a katalyzátor s obsahem kyseliny hexachlorplatičité. V druhé nádobě (B) se připraví směs poly (dimethylsiloxan-ko-methylhydrosiloxane) a poly (dimethylsiloxanu). Následně obsah nádoby B přidá k obsahu nádoby A (Smolkova et al., 2015).



Obrázek č. 4 Schéma přípravy magnetického nanokompozitu. Upraveno dle Smolkova et al., 2015.

4 BIODOPATIBILITA NANOMATERIÁLŮ

Biomateriál se používá k výrobě zařízení, které slouží k nahrazení části nebo nějaké funkce živého organismu. Často se takové materiály používají při léčbě nemocí nebo po úrazech. Jedná se tedy o materiál, který je v těsném kontaktu s živou tkání (Biomaterials).

Způsob jakým je umožněno soužití biomateriálů a tkání je už po několik let vyvíjeno a středem pozornosti ve vědě biomateriálů. Ve většině případů je hlavním požadavkem na materiál, který bude v kontaktu s tkáněmi, chemická a biologická inertnost, tedy že neudělá žádnou škodu na tkáních. Existuje mnoho způsobů, kterými mezi sebou materiály a tkáně komunikují, hledání toho nejlepšího materiálu je proto založeno na znalostech a pochopení všech interakcí mezi nimi (Williams, 2008).

4.1 Biokompatibilita

Biokompatibilita je velmi důležitá vlastnost pro jakýkoliv materiál, který přichází do kontaktu s živou tkání (Williams, 2001). Jedná se o snášenlivost látek v biologickém prostředí. Taková látka se posuzuje podle interakce s prostředím a to hlavně podle cytotoxického působení, alergických, karcinogenních, toxikologických či mutagenních reakcí, podle toho jak je látka biodegradabilní a v neposlední řadě také podle vlivu na infekční procesy (Velký lékařský slovník, 2008).

4.1.1 Principy biokompatibility

Jak již bylo zmíněno, biokompatibilita není řízena jen jedním procesem, ale je to souhrn mnoha různých procesů, ke kterým dochází po umístění materiálu do živé tkáně. Dochází k interakcím mezi hostitelskou tkání a materiálem (Williams, 2001).

Důležitá je stabilita použitého materiálu, řeší se jeho korodování a degradování v organismu. Degradace může mít za následek ztrátu strukturální integrity a může dojít k jeho rozpuštění nebo odstranění, což může být žádoucí v případě, že má být materiál z těla odstráněn, ale i nežádoucí v případě stálých implantátů. Produkty degradace mohou mít také vliv na tkáně a to lokálně nebo systémově. Tento jev je příznivý, pokud mají produkty danou biologickou funkci, ale také nežádoucí pokud dojde k rozpadu neúmyslně (Williams, 2001).

Další sledovanou záležitostí je, jak bude hostitelská tkáň na materiál reagovat a k jakým dojde změnám. Ve většině případů se materiál nebo daná látka používá již na poškozenou

nebo nemocnou tkáň. Za ideálních podmínek by mělo docházet k rychlému a jednotvárnému léčení. To že tkáň reaguje na cizí předmět a často se jej snaží odbourat je přirozený obranný mechanismus, který se vyvinul kvůli boji proti mikroorganismům. Je to základ imunitního systému, který je velice důležitý v boji proti nemocem (Williams, 2001).

Na karcinogenitu, mutagenitu a cytotoxicitu materiálu je kladen také velký důraz. Použitý materiál může způsobit mutace v buňkách. Při vypuštění složek z povrchu materiálů může dojít k chemické karcinogenitě, která vyvolává mutace pouze na základě své chemické reaktivity. Další možností vzniku nádoru je reakce živé tkáně, jakou je fibróza a chronický zánět. V takovémto prostředí jsou mutagenní změny pravděpodobnější než ve zdravé tkáni. Tento proces je nazýván jako pevná fáze karcinogenity (Williams, 2001).

Nelze předpokládat, že pokud bude jeden materiál vyhovovat určitému pacientovi, bude ten samý materiál vyhovovat i ostatním i když mají stejné problémy, vzhledem k tomu že se s věkem mění stavba organismu. Vliv může mít také životní styl hostitele, rozhoduje např. to, jestli kouří nebo jakou má fyzickou zdatnost (Williams, 2001).

4.2 Nanotoxikologie

Toxikologie je vědní obor, který se zabývá bezprostředním vlivem látek na organismus ale také vlivem dlouhodobým, pomocí něhož se zjistí, zda je látka karcinogenní, mutagenní nebo zda vyvolává alergické reakce. Pokud je látka toxická může u organismu, který s ní přišel do styku vyvolat otravu (Bezpečnost potravin, 2012). Pro zjištění přesného nebezpečí takovýchto látek na člověka mohou být použity biologické modely, pomocí kterých se stanoví jejich potenciální toxicita. Používají se *in vitro* a *in vivo* metody (Krug a Wick 2011).

4.2.1 *In vitro, in vivo*

In vitro, latinsky ve skle, je metoda testování, která se provádí v kontrolovaném prostředí mimo živý organismus (Marshall protocol). Slouží pro rychlé a účinné posouzení toxikologických účinků nanočástic. Poskytují informace o možných interakcích s lidskými buňkami a také se pomocí nich stanovují škodlivé koncentrace nanočástic. Používání nových NM stále roste a testy *in vitro* odstraňují v mnoha případech potřebu *in vivo* testování (Arora et al., 2012). *In vivo*, neboli v živém, je metoda, při níž se pracuje se živým organismem (Marshall protocol).

Testování pomocí buněčných linií (*in vitro*) má výrazné výhody:

- Odhalení primárních účinků na cílové buňky bez přítomnosti vedlejších účinků
- Identifikace základních mechanismů toxicity v nepřítomnosti fyziologických faktorů
- Velká rychlost a účinnost, nižší náklady (Arora et al., 2012)

Najdou se ovšem i nevýhody:

- S buňkami se pracuje mimo jejich přirozené prostředí (bez okolních tkání, bez krevního zásobování, bez normálního napájení živin...)
- Velmi složité napodobení *in vivo* podmínek (In vitro studies, 2014)

4.2.2 Buněčné kultury

Buněčná kultura se získává odstraněním buněk z živočicha nebo rostliny a jejich následným růstem v příznivém umělém prostředí. Buňky mohou být z tkáně odstraněny přímo a rozčleněny před kultivací, a to buď enzymaticky nebo mechanickými prostředky, nebo mohou být odvozeny od již zavedeného buněčného kmenu (Cell culture basics). Buněčné kultury se využívají v základním a aplikovaném výzkumu i ve výrobě, kde mají celou řadu použití. Ve výzkumu našly uplatnění především pro pokusy a to jako zdroj materiálu, tedy buněk (Vejražka, 2008).

4.2.2.1 Typy buněčných kultur

Zdrojem buněk pro založení kultury může být laboratorní zvíře nebo člověk, méně se pak používají kultury buněk hmyzu nebo rostlinné buněčné kultury. První kultura izolovaných buněk se označuje jako primární neboli primokultura. Pasážováním primokultury vzniká sekundární kultura tedy subkultura (Vejražka, 2008). Při pasážování (subkultivaci) dochází k odstranění média a přenosu buněk z předchozí kultury do čerstvého růstového media (Cell culture basics). Buňky v sekundární kultuře se pěstují tak dlouho, až se získá dostatečně množství materiálu pro pokus. U primárních kultur můžeme rozlišit buňky pocházející z normální nebo nádorové tkáně. Oba typy se buněk se od sebe liší svými vlastnostmi. Nádorové buňky se lépe množí a snáze se kultivují. Normální buňky mají na rozdíl od nádorových omezenou životnost, po několika pasážích začnou stárnout, mění svoje vlastnosti a přestávají se dělit (Vejražka, 2008). Použitím nesmrtelných buněk získáme tedy kontinuální buněčnou linii, v případě normálních buněk konečnou buněčnou linii (Cell culture basics).

4.2.2.2 *Kultivační médium*

Kultivační médium je nejdůležitější součástí kultivačního prostředí, protože poskytuje potřebné živiny, růstové faktory a hormony pro růst buněk, stejně jako regulaci pH a osmotický tlak kultury. Kultivační média můžeme rozlišit na bazální média, média s nízkým obsahem séra a média bez séra.

V bazálním médiu roste dobře většina buněčných linií. Obsahují aminokyseliny, vitaminy, anorganické soli, glukózu a sérum. Sérum je důležitým zdrojem růstových a adhezivních faktorů, hormonů, lipidů a minerálů. Použití séra v médiu má ale řadu nevýhod jako jsou vysoké náklady, problémy s nežádoucími účinky (stimulace, inhibice růstu), riziko kontaminace pokud sérum nebylo získáno z důvěryhodného zdroje. Používáním média s nižším obsahem séra se nežádoucí účinky séra snižují. Takové médium musí být pak obohaceno živinami a faktory živočišného původu. Používání medií bez séra má výhody ve snadnějším čištění a zpracování, v přesnějším vyhodnocování buněčných funkcí a umožňuje více konzistentní výkon. Nevýhodou je pak požadavek konkrétních formulací medií na každý buněčný typ a pomalejší růst (Cell culture basics).

4.2.3 Stanovení cytotoxicity materiálu *in vitro*

Stanovení toxicity materiálu se provádí podle pravidel stanovených normou ISO 10993-5. Norma uvádí tři kategorie zkoušek a to zkoušku extraktu, zkoušku přímým kontaktem a zkoušku nepřímým kontaktem. Volba jedné nebo více z těchto kategorií závisí na charakteru zkoumaného vzorku (ČSN EN ISO 10993-5).

4.2.3.1 *Zkouška extraktem*

Zkouškou extraktem se cytotoxicita posuzuje kvalitativně i kvantitativně. Do každé kultivační nádoby se odpipetuje podíl buněčné suspenze. Kultura se inkubuje při (37 ± 2) °C na vzduchu za přítomnosti 5% oxidu uhličitého. Před každým započítáním zkoušky se pod mikroskopem ověřuje stav buněk. Do každé kultivační nádoby se po odstranění živné půdy přidá připravený extrakt potenciálně toxické látky. Po inkubační době nejméně 24 hodin se stanovují cytotoxické účinky látky (ČSN EN ISO 10993-5).

4.2.3.2 *Zkouška přímým kontaktem*

U zkoušky přímým kontaktem dostaneme také kvalitativní i kvantitativní výsledky. Do každé kultivační nádoby se stejně jako u zkoušky extraktem odpipetuje buněčná suspenze

a nechá se inkubovat za stejných podmínek jako u zkoušky extraktem. Následně se z nádoby odstraní živná půda a přidá se nová. Jednotlivé exempláře zkoušeného vzorku se položí na buněčnou vrstvu, měly by pokrývat jednu desetinu povrchu buněčné vrstvy. Vzorky by se neměly pohybovat, aby buňky nepoškodily. Opět se po 24 hodinové inkubaci stanoví cytotoxické účinky látky (ČSN EN ISO 10993-5).

4.2.3.3 Zkouška nepřímým kontaktem

Provádí se zkouška difuzí agarem a difuzí filtrem. Obě zkoušky umožňují pouze kvalitativní posouzení cytotoxicity. Při zkoušce difuzí agarem se po odstranění živné půdy z kultivačních nádob přidá čerstvá živná půda s agarem. Vzorky zkoušeného materiálu se položí na ztuhlou agarovou vrstvu a nechají se inkubovat. Následně se před a po sejmutí vzorků z agaru stanoví cytotoxické účinky látky. U zkoušky difuze filtrem se do kultivační nádoby vloží filtr před přidáním buněčné suspenze. Po inkubaci se odstraní živná půda a filtr se přenese na vrstvu ztuhlého agaru, strana s buňkami je otočená na agar. Na filtr se pak položí zkoumaná látka. Následně se nádoby inkubují, ale jen po dobu 2 h \pm 10 min. Po uplynutí doby se vzorky odstraní a stanoví se cytotoxicita (ČSN EN ISO 10993-5).

4.2.4 Metody k stanovení viability a proliferace buněk

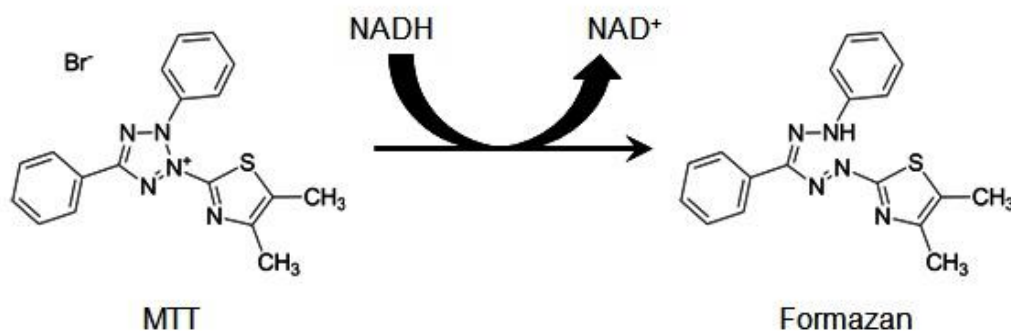
Neexistuje metoda, která by byla dostatečná pro získání veškerých informací o toxicitě zkoumané látky. Nanočástice vyvolávají různé biologické reakce, proto je pro posuzování jejich toxicity nutnost kombinování více testů (Arora et al., 2012).

4.2.4.1 MTT test

Jedná se o kolorimetrický kvantitativní test, který slouží ke zkoumání životaschopnosti buněk. Poprvé byl navržen v roce 1983 Mosmannem (Chapdelaine). Je hodně populární a široce využívaný o čemž svědčí i tisíce publikovaných článků (Riss et al., 2013). Test je založen na redukci žlutého barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid] na fialové krystaly formazanu (Freimoser et al., 1999).

MTT se v podobě roztoku přidává k buňkám a to obvykle v koncentraci 0,2 - 0,5 mg/ml, následně se buňky s MTT nechají minimálně 4 hodiny kultivovat. Životaschopné buňky s aktivním metabolismem jsou schopny pomocí mitochondriálních enzymů přeměnit MTT na fialový formazan. Množství formazanu je přímo úměrné počtu životaschopných buněk a měří se pomocí změny absorbance při 570 nm za použití spektrofotometru. Formazan se uvnitř buněk hromadí ve formě krystalů, před měřením absorbance je

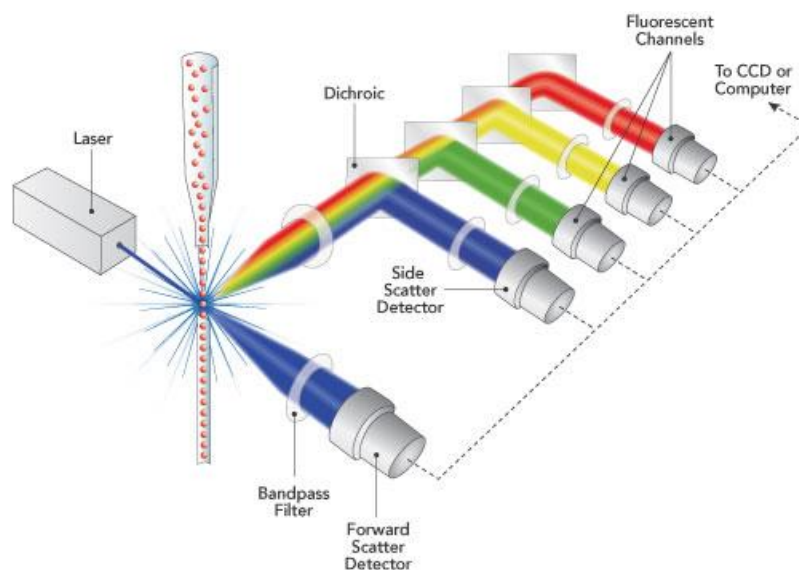
ho potřeba rozpustit a to pomocí např. DMSO (dimethylsulfoxid), dimethylformamidu nebo isopropanolu (Riss et al., 2013).



Obrázek č. 5 Redukce ve vodě rozpustného MTT na nerozpustný formazan (Riss et al., 2013)

4.2.4.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je považována za standardní metodu analýzy částic v suspenzi (Šinkorová, Zárbynická, 2008). Slouží na simultánní měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buněk. Částice (nejčastěji buňky) protékají přístrojem v proudu kapaliny. Využívá se zde principu rozptylu světla, excitace a emise fluorochromních molekul k získání dat z mikroskopických částic a buněk. Velikou výhodou při cytometrii je, že může být měřeno až několik parametrů současně. Buňky protékají kapilárou vysokou rychlostí a jsou ozařovány monochromatickým koherentním zářením, které je produkováno laserem. Na rozdíl od spektrofotometrie, u které se měří sumární absorpce či transmise, se u průtokové cytometrie měří fluorescence každé částice zvlášť. Intenzita fluorescence jednotlivých částic (buněk) odpovídá množství struktur, na které je vázáno fluorescenční barvivo (Slaninová et al., 2008). Mezi hlavní přednosti cytometrie se řadí vysoká rychlost analýzy jednotlivých buněk, moderní analyzátory dokáží zpracovat až desetitisíce buněk za vteřinu (Šinkorová, Zárbynická, 2008). V praxi se cytometrie využívá především pro diagnostiky v hematologii, onkologii, imunologii a také v biologickém výzkumu (Slaninová et al., 2008).



Obrázek č. 6 Schéma uspořádání laseru a detektorů v průtokovém cytometru (Filters for Flow Cytometry, 2015)

4.2.5 Metody studia genotoxicity

Látka způsobující genotoxicitu má škodlivé účinky na genetický materiál buňky (Kohoutek, 2015). Následující podkapitoly popisují testy vhodné na posouzení potenciální genotoxicity látek.

4.2.5.1 Amesův test

Amesův test je metoda, která slouží pro posuzování genotoxicity NM. Využívá se kmen bakterie *Salmonella typhimurium* (Arora et al., 2012), ten má mutovaný gen, pomocí něhož jsou schopny syntetizovat aminokyselinu histidin. Bakterie se pěstuje na živné půdě, která histidin neobsahuje, takže zde nemůže přežít. Během testu je tento kmen vystaven zkoumané látce a následně se sleduje, zda rostou a vytváří kolonie. Počet kolonií, které přežijí, dokazují mutagenní potenciál zkoumané látky, jelikož u nich dojde k mutaci a jsou schopné syntetizovat daný histidin pro přežití samy (Šípek)

4.2.5.2 Kometový test

Kometový test se využívá pro výzkum poškození DNA a při testování genotoxicity nových chemikálií a léčiv (Arora et al., 2012). Dochází k elektroforéze buněk, poškozené fragmenty DNA v průběhu vycestovávají z jádra, což výsledně dává obraz komety (Šípek). Využívá se i pro hodnocení toxicity nanočástic. Z dosud provedených testů bylo zjištěno,

že většina nanočástic má negativní vliv na DNA, např. způsobují oxidační poruchy DNA (Arora et al., 2012).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

- Stanovení toxicity extraktu kompozitů železitých nanočástic na buněčných modelech
- Stanovení vlivu kompozitů železitých nanočástic na buněčné modely v přímém kontaktu

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Testované nanočástice

Kompozity železitých nanočástic, konkrétně kompozity maghemitu na bázi silikonu, byly připraveny Ing. Ilonou Smolkovou, Ph.D. z Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Princip výroby kompozitů železitých nanočástic je uveden v teoretické části práce. Před použitím částic pro testování byly sterilizovány suchým teplem při 120°C po dobu 40 minut.

6.2 Buněčné kultury a médium

Pro daný experiment byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658, USA). Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAA Laboratories GmbH, Austria) s obsahem telecího séra (BioSera, France) v koncentraci 10%. Médium obsahovalo také antibiotika Penicillin/Streptomycin a to v koncentraci 100 µg/ml (GE Healthcare HyClone, United Kingdom). Buněčné linie byly kultivovány při teplotě 37°C za přítomnosti oxidu uhličitého v koncentraci 5% a ve vlhčeném vzduchu.

6.3 Použité přístroje a pomůcky

Při experimentu byl využíván biologický inkubátor Heracell 150i (Thermo Scientific, USA), dále laminární box s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe KSP (Thermo Scientific, USA), fluorescenční mikroskop s fázovým kontrastem Olympus IX 81 (Olympus, Japonsko), spektrofotometr Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko), centrifuga Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Německo), laboratorní třepačka IKA KS 130 basic (IKA, GermanyNěmecko), autokláv Steam Sterilizer, 3870ELPV-D (Tuttnauer), horkovzdušná pec Binder ED 53 (Binder, Německo), tkáňový plastik (TPP, Švýcarsko), automatické pipety a mikropipety (Eppendorf, Německo).

6.4 Experiment

V následujících podkapitolách budou uvedeny jednotlivé kroky experimentu, které byly potřebné pro posouzení toxického vlivu kompozitů železitých nanočástic částic na buněčnou linii myších fibroblastů.

6.4.1 Kultivace a trypsinizace

Adherované buňky v kultivační nádobě (T75) byly po dosažení 80%-ní konfluency zkontrolovány pomocí mikroskopu. Následně byly asepticky přeneseny do laminárního boxu, kde se s nimi nadále pracovalo. Z kultivační nádoby bylo opatrně odsáto medium, aniž by došlo k poškození buněk. Buňky byly opláchnuty 15 ml fosfátového pufru (PBS), což odpovídá koncentraci 0,2 ml/cm². Díky tomu byly odstraněny zbytky média a séra, poté byl pufr odsát. Dále bylo do kultivační nádoby přidáno 7,5 ml trypsinu, koncentrace 0,1 ml/cm², který způsobil přerušení vazeb mezi jednotlivými buňkami i mezi buňkami a kultivačním povrchem. Kultivační nádoba s trypsinem byla umístěna do inkubátoru po dobu 15-20 minut. Buňky byly průběžně kontrolovány pod mikroskopem. Po uvolnění buněk bylo do nádoby přidáno 7,5 ml média, vzniklý roztok s buňkami byl odpipetován z nádoby do centrifugační zkumavky. Zkumavka byla vložena do centrifugy, která byla předem vytemperována na 37°C. Centrifugace probíhala po dobu 3 minut při otáčkách 1100 rpm. Po centrifugaci byly buňky usazeny na dně zkumavky, díky čemuž bylo umožněno odsátí supernatantu (médium a trypsin). Získaný počet buněk odpovídal přibližně hodnotě 2.10⁷. Pomocí kultivačního média byly buňky naředěny na koncentraci 1.10⁵ buněk/ml média. Za použití mikropipety byla získaná buněčná suspenze nadávkována do 96-ti jamkových plat, v každé jamce bylo 100μl suspenze. Buněčná suspenze byla dávkována také do Petriho misek o průměru 3,5 cm a to v množství 2 ml. Plata i Petriho misky byly umístěny do inkubátoru na 24 hodin k předkultivaci.



Obrázek č. 7 Dávkování buněčné suspenze na 96-jamkové plata pomocí multikanálové mikropipety.

6.4.2 Přidání vzorku

Podle normy ISO 10993-12 byl připraven extrakt kompozitních nanočástic o koncentraci 0,2 g částic/1 ml média. Testovaný materiál byl za stálého míchání inkubován po dobu 24 hodin při teplotě 37°C. Po uplynutí doby potřebné ke kultivaci buněk (24 hodin) bylo

z 96-ti jamkových plat odsáto médium. V případě reference bylo do jamek přidáno 100 μ l nového média. Testovaný mateřský extrakt (100%) byl zředěn médiem tak, aby byla získána série koncentrací 75%, 50%, 25%, 10% a 1%. Následně byly extrakty o různé koncentraci přidány k buňkám v jamkách v množství 100 μ l a plata byla vložena do inkubátoru. Všechny koncentrace byly provedeny ve čtyřech opakováních.

Buňky byly testovány také v přímém kontaktu s částicemi. Buňky v Petriho miskách o průměru 3,5 cm byly předkultivovány po dobu 24 hodin. Následně byly k buňkám s médiem přidány testované vzorky, misky se nechaly dále inkubovat, průběžně byly zaznamenávány změny v proliferaci pomocí miskroskopu s kamerou. Do každé misky byla vložena 3 kolečka vzorku o průměru 0,5 cm. Referenční Petriho misky byly ponechány bez vzorků. Pokus byl proveden ve třech opakováních.

6.4.3 MTT test

Po uplynutí doby kultivace buněk s extrakty (24 hodin) byly z jamek v platech odsáty extrakty s různými koncentracemi, v případě reference bylo odsáto médium. Následně bylo do každé jamky přidáno nové médium a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid - MTT (Duchefa Biochemie, Nizozemsko) v koncentraci 0,5 mg MTT/1 ml média. Plata s MTT se nechaly inkubovat po dobu 4 hodin. Po uplynutí této doby bylo z jamek odsáto 40 μ l roztoku, odebrané množství bylo ponecháno v pipetě. Zbylý roztok v jamkách byl odsán a ponechané množství 40 μ l bylo vráceno k buňkám. Do jamek bylo přidáno 80 μ l DMSO (dimethylsulfoxid), který se nechal působit 15 minut. Následovalo samotné měření absorbance pomocí spektrofotometru. Absorbance byla měřena při vlnové délce 570 nm, referenční vlnová délka byla nastavena na 690 nm. Výsledná absorbance odpovídala počtu přeživších buněk, čím větší počet živých buněk byl, tím vyšší byla absorbance. Obecný princip MTT testu byl popsán v teoretické části práce.

7 VÝSLEDKY

Tato kapitola bude věnována výsledkům testování potenciálně toxické látky a to kompozitů železitých nanočástic. Pro stanovení cytotoxicity byl využit extrakt nanočástic a také přímý kontakt nanočástic s buňkami. V případě vyhodnocení cytotoxicity extraktu byl použit MTT test a mikrofotografie byly pořízené na mikroskopu s fázovým kontrastem. Pro vyhodnocení cytotoxicity částic v přímém kontaktu byly provedeny mikrofotografie pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem.

Výsledky práce jsou prezentovány ve formě tabulek a obrázků. Měření bylo provedeno čtyřikrát pro každou koncentraci extraktu, v tabulkách tedy můžeme vidět průměrné hodnoty absorbance vzorků. Dále je v tabulkách vyhodnocena viabilita buněk v porovnání s referencí dle normy ISO 10 993-5. V případě reference je hodnota rovna 100, což značí 100% viabilitu buněk, > 80 necytotoxický efekt, 60-80 slabá cytotoxicita, 40-60 střední cytotoxicita, < 40 silná toxicita (ČSN EN ISO 10993-5).

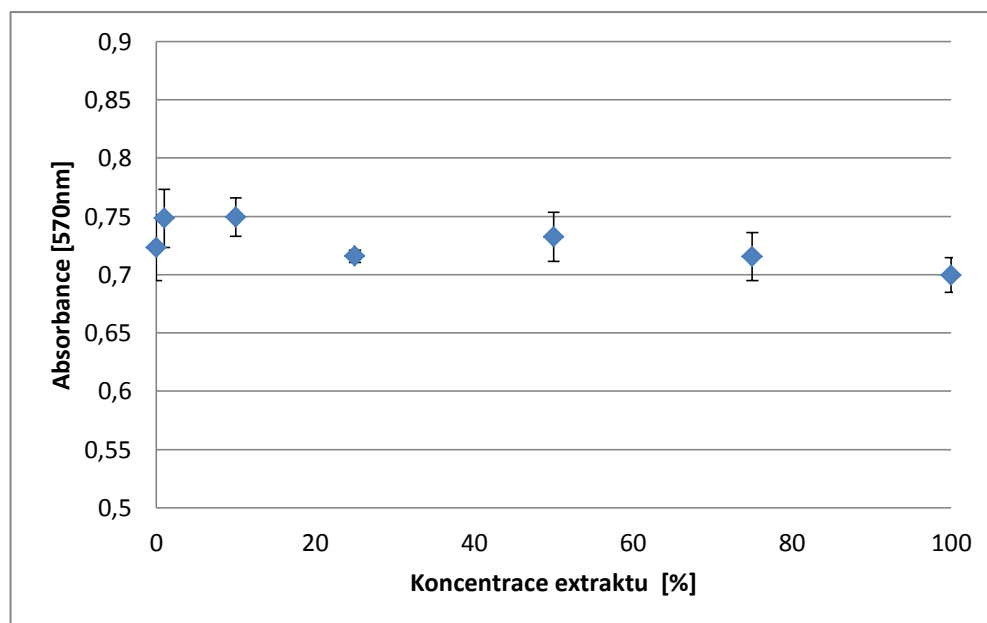
7.1 Stanovení cytotoxicity extraktu kompozitů železitých nanočástic na linii NIH/3T3

V grafu č. 1 jsou uvedeny výsledky cytotoxicity jednotlivých koncentrací extraktu kompozitů železitých nanočástic vyjádřeny pomocí absorbance, což odpovídá koncentraci buněk, v rámci MTT testu. Z grafu lze vyčíst relativně konstantní hodnoty naměřené absorbance. Absorbance u všech koncentrací se svými hodnotami přibližují k hodnotě absorbance u reference. Výsledky absorbance jsou shrnuty i v tabulce č. 1, kde je uvedena navíc hodnota viability buněk v procentuálním vyjádření podle normy EN ISO 10993-5. Ve všech koncentracích dosahovala viabilita buněk přibližně 100%, konkrétně se pohybovala v rozmezí 96,76% až 103,62%. Nejnižší viabilita byla naměřena v přítomnosti 100% extraktu, naopak nejvyšší při 10% extraktu, rozdíl těchto hodnot ale dosahuje pouze hodnoty 6,86%. Podle uvedené normy se viabilita buněk nad 80% považuje za necytotoxickou. Z grafu a tabulky tedy vyplývá skutečnost, že ani koncentrovanější extrakty kompozitů železitých nanočástic nezpůsobují snížení viability buněk a že žádná z koncentrací tedy nevykazuje cytotoxický efekt.

Koncentrace extraktu kompozitů železitých nanočástic [%]	Průměrná hodnota absorbance \pm SD	Viabilita [%]
Reference	0,7232 \pm 0,0281	100,00
100	0,6997 \pm 0,0148	96,76
75	0,7156 \pm 0,0206	98,95
50	0,7325 \pm 0,0209	101,29
25	0,7158 \pm 0,0052	98,98
10	0,7493 \pm 0,0164	103,62
1	0,7483 \pm 0,0250	103,47

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

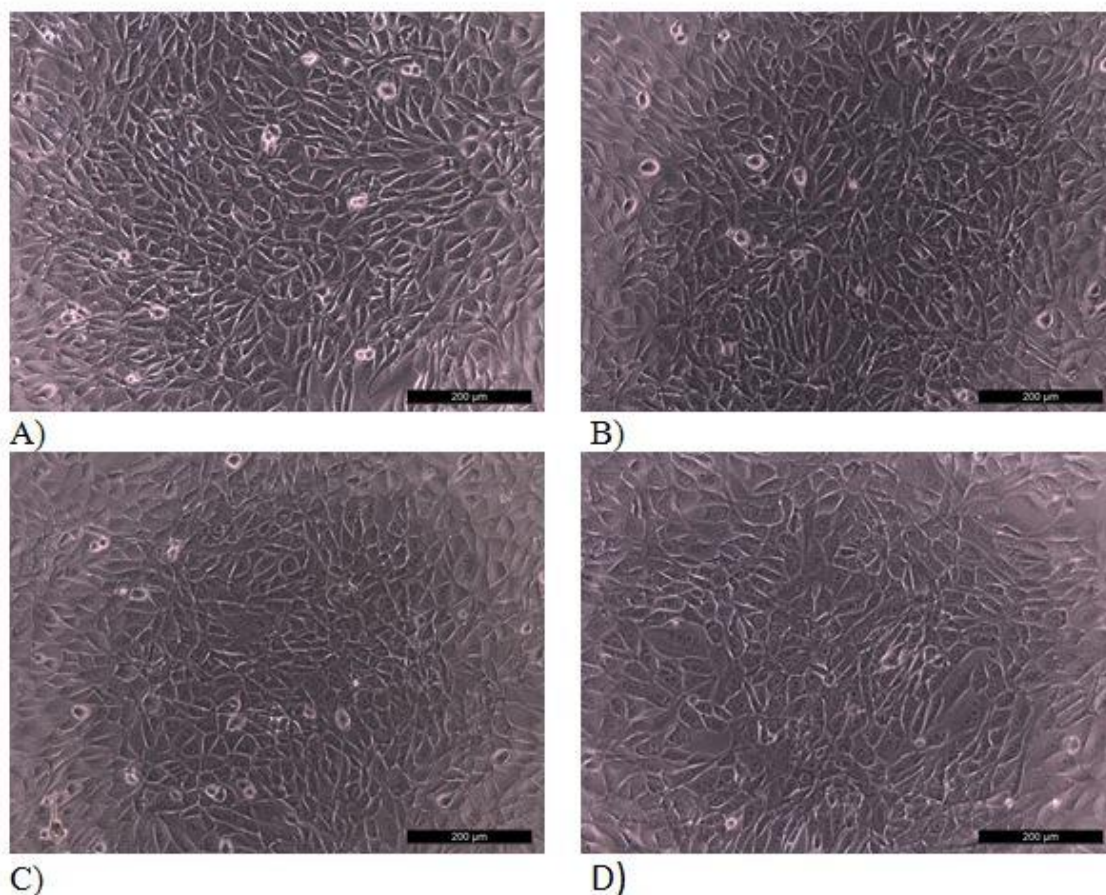
Tabulka č. 1 Stanovení vlivu extraktu kompozitů železitých nanočástic na buněčnou viabilitu



Graf č. 1 Závislost absorbance na koncentraci extraktu kompozitů železitých nanočástic

MTT-test nám není schopen zhodnotit morfologii a výskyt apoptických buněk. Pro zjištění stavu buněk bylo použito focení mikroskopem s fázovým kontrastem. Pořízené mikrofotografie jsou zobrazeny na obrázku č. 8. Snímky zobrazují referenci a koncentrace 1%, 50%, a 100% po 24 hodinovém působení. Ze snímků je patrné, že extrakt kompozitů železitých nanočástic nemá vliv na morfologii buněk. Mikrofotografie nám potvrzují výsledky

naměřené pomocí MTT testu. Mikrofotografie B), C) i D) je srovnatelná s mikrofotografií reference (A), můžeme vidět, že počet buněk i jejich vzhled je v podstatě stejný. Pokud by se jednalo o cytotoxickou látku, došlo by k úbytku buněk s rostoucí koncentrací a mohlo by dojít k výskytu morfologicky odlišných buněk nebo apoptických tělísek.

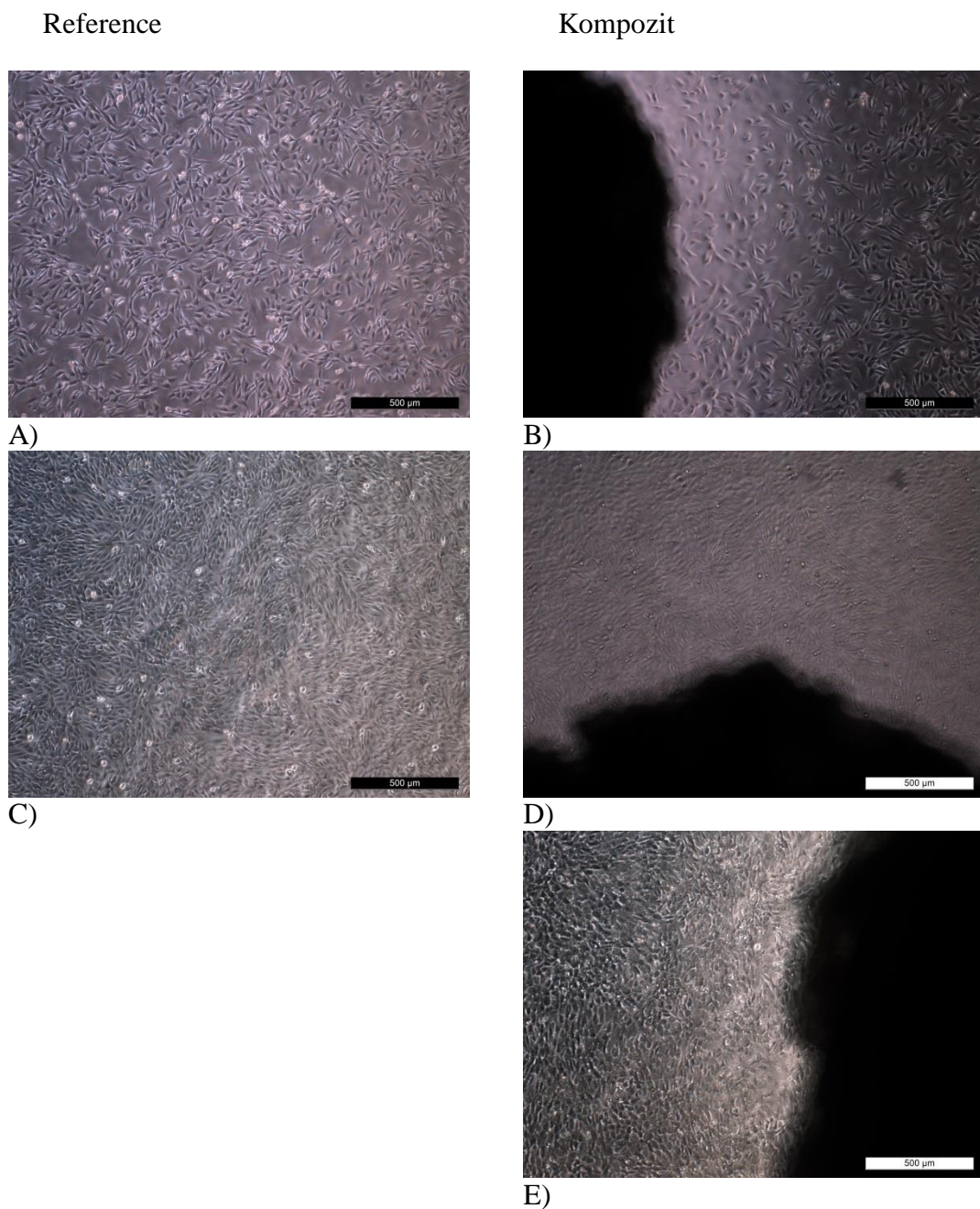


Obrázek č. 8 Mikrofotografie buněčné linie NIH/3T3 při vyhodnocení cytotoxicity extraktu: A) reference; B) 1%; C) 50%; D) 100%. Zvětšení mikrofotografií je 100x.

7.2 Stanovení cytotoxicity kompozitů železitých nanočástic na buněčnou linii NIH/3T3 v přímém kontaktu

Cytotoxicita kompozitů železitých nanočástic byla posouzena i v přítomnosti kompozitů, tedy v přímém kontaktu s buněčnou linií NIH/3T3. Pro vyhodnocení byly zhotovené mikrofotografie pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Proliferace buněk v přítomnosti kompozitů železitých nanočástic byla zaznamenávána průběžně až po dobu 1 týdne pro posouzení dlouhodobého efektu.

Pořízené snímky můžeme vidět na obrázku č. 10. Snímek A) a B) byl pořízen po 24 hodinách a při porovnání reference a snímku s kompozitem vidíme, že nedošlo ke snížení viability buněk či změně jejich morfologie a to ani v přímé blízkosti u vzorku. Ani po 48 hodinách nedošlo ke snížení viability což nám ukazují snímky C) a D). Mikrofotografie E zachycuje výsledek přímého kontaktu po 192 hodinách, opět nevidíme změnu morfologie, naopak si můžeme povšimnout, že došlo ke zvýšení počtu buněk. Výsledky přímého kontaktu se tedy shodují s výsledky při testování extraktu.



Obrázek č. 9 Mikrofotografie přímého kontaktu kompozitů železitých nanočástic s buněčnou linií NIH/3T3 vyhotovené v čase: A) a B) 24 hodin; C) A D) 48 hodin; E) 192 hodin. Zvětšení mikrofotografií je 40x.

8 DISKUZE

Nanočástice oxidů železa i jejich kompozity jsou vhodnými kandidáty pro stále větší využití v biomedicínských aplikacích. Nacházejí uplatnění především při magnetické resonanci, jako nosiče léčiv a při hypertermii. Právě pro zmíněné aplikace je velice důležité znát cytotoxicitu využívaných látek.

Řada studií poukazuje na to, že nanočástice oxidů železa jsou v nižších koncentracích neškodné. Jejich cytotoxicita závisí tedy na koncentraci a také na době jejich expozice s buňkami. Kombinace magnetitu a maghemitu byla již schválena pro klinické použití jako MRI kontrastní látky (Valdiglesias et al., 2015). Pro příklad Sabale et al. zkoumal cytotoxicitu magnetických nanočástic na buněčných liniích pocházejících z karcinomu plic. Testoval látku v množství 0,2 až 3,0 mg/ml po dobu 24 a 48 hodin. Magnetické nanočástice vykazovaly biokompatibilitu do 1 mg/ml při expozici 24 hodin. S rostoucí dobou expozice a zvyšující se koncentrací docházelo ke snižování viability. To že je cytotoxicita závislá na čase dokázal i Sadeghi et al. Testoval magnetické nanočástice na lidských jaterních nádorových buňkách. Při dávce 100 mg/ml po dobu 24 hodin došlo ke snížení viability na 5,1% a při té samé koncentraci po dobu 12 hodin došlo ke snížení viability na 10%.

Jedním z problému nanočástic je jejich vnitřní nestabilita, mají tendenci tvořit aglomeráty, aby došlo ke snížení energie, která je spojená s vysokým poměrem plochy povrchu k objemu. Holé nanočástice mohou být také snadno zachyceny imunitním systémem a potom nemohou dosáhnout svého cíle. Tyto nežádoucí účinky mohou být minimalizovány potažením povrchu nanočástic různými materiály jako je želatina, polyethylenglykol, polyakrylová kyselina, polyvinylalkohol atd. Povrchovou úpravou získáváme různé formy kompozitů železitých nanočástic. Toxicita potom závisí na složení daného kompozitu. Studie *in vitro* na lidských T-lymfocytech prováděna dvojicí Ying a Hwang ukázala, že magnetické nanočástice potažené karboxylovou skupinou mají vyšší cytotoxicitu než ty, které jsou potaženy aminovými skupinami (Valdiglesias et al., 2015). Ge et al. testoval cytotoxicitu nanočástic oxidů železa opatřených povlakem kyseliny dimerkaproantarové (DMSA-Fe₂O₃) na buňkách lidského aortálního endotelu. Při koncentracích pod 0,05 mg/ml DMSA-Fe₂O₃ po 24 hodinové expozici nebyla zjištěna toxicita. Při vyšších dávkách už však došlo ke snížení viability buněk a to již po 4 hodinách. Koncentrace 0,2 mg/ml snížila viabilitu na 56,7%. Topel et al. provedl studii na buňkách z karcinomu plic a na buňkách pocházejících z endometriálního karcinomu. Zkoumaný kompozit byl složen

z magnetických nanočástic, potažený polyethyleniminem a označený fluorescenčním barvivem BODIPY-5. Viabilita buněk byla testována po 24 a 48 hodinách inkubace. Na buňky pocházející z endometriálního karcinomu neměl kompozit ani při vyšších koncentracích cytotoxický vliv a na buňky z karcinomu plic byla prokázána pouze malá toxicita. Dále Závášová et al. testovala cytotoxicitu různých kompozitů na křeččích plicních fibroblastech a na buněčných liniích myších fibroblastů. Testovány byly nanočástice potažené dextranem, polyethylenglykolem a polyvinylpropylenem. U všech testovaných vzorků docházelo ke snižování viability buněk se zvyšující se koncentrací maghemitu v kompozitu.

Použitím vhodného kompozitu tedy můžeme dosáhnout snížení cytotoxicity. Porovnáme-li výsledky z bakalářské práce Lucie Musilové z roku 2014, která testovala čisté nanočástice magnetických oxidů železa s výsledky předložené práce, zjistíme, že námi testovaný kompozit železitých nanočástic má lepší vlastnosti v oblasti cytotoxicity a je tedy vhodnějším kandidátem pro aplikaci v biomedicíně. Kompozity magnetických oxidů jsou navíc stabilnější, jak již bylo uvedeno výše. Cytotoxicita nanočástic magnetických oxidů byla vyhodnocena také MTT testem a při 75% extraktu vykazovaly nanočástice slabou cytotoxicitu, viabilita buněk byla snížena na 78,79%. V mém případě byl zkoumaný kompozit maghemitu na bázi silikonu. Bylo zjištěno, že ani při použití vyšších koncentrací nedochází ke snížení viability buněk. Při 100% byla viabilita snížena pouze na 96,76%. Kompozit nevykazoval cytotoxicitu ani při přímém kontaktu, kdy ani po době expozice 1 týdne nebyl pozorován úbytek buněk.

ZÁVĚR

Cílem praktické části bakalářské práce bylo stanovení cytotoxického účinku kompozitů železitých nanočástic na buněčnou linii myších embryonálních fibroblastů. Vzhledem k využití při biomedicínských aplikacích jako je např. již několikrát zmíněná hypertermie či MRI, je stanovení cytotoxicity velmi důležité, jelikož daná látka přichází do kontaktu s lidským organismem.

Byla vyhodnocována cytotoxicita extraktu kompozitů železitých nanočástic pomocí MTT testu. Byly použity koncentrace 100%, 50%, 25%, 10% a 1% a všechny hodnoty byly porovnávány s referencí, kde se žádný obsah extraktu nenacházel. Získané výsledky od všech koncentrací byly srovnatelné s výsledkem u reference. Viabilita buněk se pohybovala okolo 100%. Nejmenší hodnoty dosáhla viabilita v případě 100% extraktu, ale vzhledem k tomu že byla 96,76% nemůžeme považovat danou koncentraci za cytotoxickou. Výsledky byly potvrzeny i pořízením mikrofotografií, na kterých je vidět že opravdu nedochází ke snížení počtu buněk ani ke změně jejich morfologie.

Cytotoxicita byla posuzována také testem přímého kontaktu kompozitů železitých nanočástic s buňkami. Expozice trvala po dobu 1 týdne, přičemž v průběhu byly pořizovány mikrofotografie pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Ze snímků bylo zřejmé, že se cytotoxicita neprojevila ani v tomto případě. Buňky ani po 192 hodinách nezměnili morfologii a nebylo zaznamenáno snížení jejich počtu. Testované kompozity železitých nanočástic tedy nevykazují cytotoxicitu ani při použití vyšších koncentrací, či při delší době expozice.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALAGARASI, A., Introduction to nanomaterials[online]. 2011 [cit. 2013-07-22]. Dostupné z: <http://www.nccr.iitm.ac.in/2011.pdf>
2. A-Z slovník pro spotřebitele. MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. Bezpečnostpotravin [online]. 2012. vyd. [cit. 2015-01-27]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76482.aspx>
3. ANDRADE, Angela L. et al Preparation of composite with silica-coated nanoparticles of iron oxide spinels for applications based on magnetically induced hyperthermia. *Hyperfine Interactions* [online]. 2013, vol. 218, issue 1-3, s. 71-82 [cit. 2015-04-08]. DOI: 10.1007/s10751-012-0681-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10751-012-0681-9>
4. ARORA, Sumit et al. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2012, vol. 258, issue 2, s. 151-165 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1016/j.taap.2011.11.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X11004467>
5. BABIČ, Michal. Superparamagnetické nano- a mikročástice s hydrofilními povrchy. Praha, 2012. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Ing. Daniel Horák, CSc.
6. BERRY, Catherine et al. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2003, vol. 36, issue 13, s. 129-150 [cit. 2014-11-06]. DOI: 10.1201/b11760-9. Dostupné z: stacks.iop.org/JPhysD/36/R198
7. Biokompatibilita. Velký lékařský slovník. [online]. 2008 [cit. 2015-01-27]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/biokompatibilita>
8. Biomaterials. Uotechnology. [online]. [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <http://www.uotechnology.edu.iq/appsciences/filesPDF/material/lectures/4c/8-Biochemical1.pdf>
9. *CELL CULTURE BASICS* [online]. [cit. 2015-05-20]. Dostupné z: <http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>

10. CORNELL, R a Udo SCHWERTMANN. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses. 2. vydání, Weinheim: Wiley-VCH, 2003, 664 s. ISBN 35-273-0274-3.
11. ČSN EN ISO 10993-5. Česká technická norma: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro. 2005. Český normalizační institut.
12. DUDEK, Martin. Mineralogie. [online]. 2006 [cit. 2014-11-20]. Dostupné z: <http://www.minerally.net/>
13. Filters for Flow Cytometry. Semrock [online]. 2015 [cit. 2015-05-22]. Dostupné z: <http://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx>
14. FREIMOSER, Florian M. et al. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. 1999, vol. 65, issue 8, s. 3727–3729, Switzerland
15. KOHOUTEK, Rudolf. Genotoxicita. Slovník cizích slov. [online]. ©2005-2015 [cit. 2015-02-20]. Dostupné z: <http://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/genotoxicita>
16. GE et al. The cytotoxicity evaluation of magnetic iron oxide nanoparticles on human aortic endothelial cells: Cytotoxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Stem Cells. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, vol. 8, issue 1 [cit. 2015-05-20]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-215. ISSN 1556-276x. Dostupné z: <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/215>
17. GUPTA, Ajay Kumar a Mona GUPTA. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. 2005, vol. 26, issue 18, s. 3995-4021 [cit. 2014-11-17]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012.
18. HOŠEK, Jan. Úvod do nanotechnologie: propedeutika. Vyd. 1. V Praze: České vysoké učení technické, 2011, 170 s. ISBN 978-80-01-04555-8.
19. CHAPDELAINÉ, Joan M. MTT reduction - a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation. [online]. [cit. 2015-04-16]. Dostupné z: http://mdc.custhelp.com/euf/assets/content/Maxline_App_Note_5_MTT.pdf

20. In vitro studies (on cells). Belgian BioElectroMagnetics Group. [online]. 2014. [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <http://www.bbemg.be/en/elf-emf-and-health/study-methods/info-invitro-studies.html>
21. KRISHNAN, Kannan M. Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy. IEEE Transactions on Magnetics [online]. 2010, vol. 46, issue 7, s. 2523-2558 [cit. 2014-11-06]. DOI: 10.1109/TMAG.2010.2046907. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=5439840>
22. KRUG, Harald F. a Peter WICK. Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. [online]. 2011-02-07, vol. 50, s. 1260-1278 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1002/anie.201001037. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201001037>
23. KUBÍNEK, R. a V. STRÁNSKÁ. Úvod do problematiky nanotechnologií. In: Upol.cz [online]. [cit. 2014-11-10]. Dostupné z: <http://exfyz.upol.cz/didaktika/oprlz/nanotechnologie.pdf>
24. MAZÁNEK, Jiří. Zubní lékařství: propedeutika. 1. vyd. Praha: Grada, 2014, 569 s. obr. příl. ISBN 978-802-4735-344.
25. MUSILOVÁ, Lucie. *Cytotoxicita nanočástic*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2014. Bakalářská práce. Fakulta technologická. Vedoucí práce Doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.
26. PANKHURST, Q A et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. Journal of Physics D: Applied Physics [online]. 2003, vol. 36, issue 13, s. 167-181 [cit. 2014-11-17]. DOI: 10.1088/0022-3727/36/13/201. Dostupné z: stacks.iop.org/JPhysD/36/R167
27. PRNKA, Tasilo a Karel ŠPERLINK. Šestý rámcový program evropského výzkumu a technického rozvoje. Vyd. 1. Ostrava: Repronis, 2004, 67 s. ISBN 80-732-9070-7.
28. Příprava, charakterizace a porovnání nanočástic připravených tepelným rozkladem v pevné fázi a nanočástic vzniklých biomineralizací (bakteriální magnetické nanočástice). Upol.cz. [online]. [cit. 2014-11-17]. Dostupné z: http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/Praktikum_magnetozomy.pdf

29. RICHARDSON, J Craig et al. Pharmaceutical applications of magnetic resonance imaging (MRI). *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2005-06-15, vol. 57, issue 8, s. 1191-1209 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1016/j.addr.2005.01.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X05000608>
30. RISS, Terry L. et al. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*. [online]. 2013. [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
31. SABALE et al. Superparamagnetic MFe₂O₄ (M = Ni, Co, Zn, Mn) nanoparticles: synthesis, characterization, induction heating and cell viability studies for cancer hyperthermia applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2015, vol. 26, issue 13, [cit. 2015-05-20]. DOI: 10.1007/s10856-015-5466-7. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-015-5466-7>
32. SADEGHI, Leila et al. In vitro toxicity of iron oxide nanoparticle: Oxidative damages on Hep G2 cells. *Experimental and Toxicologic Pathology* [online]. 2015, vol. 67, issue 2, s. 197-203 [cit. 2015-05-26]. DOI: 10.1016/j.etp.2014.11.010.
33. SCHWEIGER, Christoph et al. Novel magnetic iron oxide nanoparticles coated with poly(ethylene imine)-g-poly(ethylene glycol) for potential biomedical application: Synthesis, stability, cytotoxicity and MR imaging. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, vol. 408, 1-2, s. 130-137 [cit. 2015-02-19]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.046. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517311001177>
34. SLANINOVÁ, Iva et al., 2008. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. *Chemické listy* [online]. Č. 102, s. 427-433 [cit. 2015-05-06]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_06_427-433.pdf
35. SMOLKOVA, Ilona S. et al. Maghemite based silicone composite for arterial embolization hyperthermia. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2015, vol. 48, s. 632-641 [cit. 2015-04-08]. DOI: 10.1016/j.msec.2014.12.046.

36. SOVOVÁ, T. a V. KOČÍ, 2012. Ekotoxikologie nanomateriálů. Chemické listy [online]. Č. 106, s. 82-87 [cit. 2014-11-06]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_02_82-87.pdf
37. ŠINKOROVÁ, Zuzana a Lenka ZÁRYBNICKÁ. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. Vojenské zdravotnické listy. Hradec Králové. 2008. Univerzita obrany. Katedra radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví.
38. ŠÍPEK, Antonín. Mutageny. Genetika - biologie. [online]. ©2010-2014 [cit. 2015-02-20]. Dostupné z: <http://genetika-biologie.cz/mutageny>
39. TARTAJ, Pedro et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. Journal of Physics D: Applied Physics [online]. 2003, vol. 36, issue 13, R182-R197 [cit. 2014-11-17]. DOI: 10.1088/0022-3727/36/13/202. Dostupné z: stacks.iop.org/JPhysD/36/R182
40. TEJA, Aryn S. et al. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials [online]. 2009, vol. 55, 1-2, s. 22-45 [cit. 2014-11-17]. DOI: 10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960897408000168>
41. The Marshall Protocol Knowledge Base. [online]. [cit. 2015-02-20]. Dostupné z: http://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies
42. TUČEK, Jiří. Nanometrické polymorfy oxidu železitého, jejich magnetické vlastnosti a aplikační potenciál. Olomouc, 2012. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
43. ZAVISOVA, Vlasta et al. The cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different modifications evaluated in vitro. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 2015, vol. 380, s. 85-89 [cit. 2015-05-26]. DOI: 10.1016/j.jmmm.2014.10.041. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.10.041>
44. ZBORIL, Radek, Miroslav MASHLAN a Dimitris PETRIDIS. Iron(III) Oxides from Thermal Processes Synthesis, Structural and Magnetic Properties, Mössbauer Spectroscopy Characterization, and Applications †. Chemistry of Mate-

- rials [online]. 2002, vol. 14, issue 3, s. 969-982 [cit. 2014-11-20]. DOI: 10.1021/cm0111074.
45. VALDIGLESIAS, Vanessa et al. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2015, s. 125-148 [cit. 2015-05-24]. DOI: 10.1002/em.21909. ISSN 08936692. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/em.21909>
46. VEJRAŽKA, Martin. 2008. Buněčné kultury. *Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*. 1. vyd. Praha: Galén pro 1. LF UK v Praze, s. 81-100. ISBN 978-807262-535-2.
47. WILLIAMS, David F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* [online]. 2008, vol. 29, issue 20, s. 2941-2953 [cit. 2015-01-17]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208002676>
48. WILLIAMS, David F. *Biocompatibility Principles*. *Encyclopedia of materials: science and technology*. Amsterdam: Elsevier, 2001. ISBN 0-08-043152-6.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

NM	Nanomateriál
CVD	Syntéza z plynné fáze (chemical vapor deposition)
MRI	Magnetická resonance
DIH	Přímá vstříkovací hypertermie (direct injection hyperthermia)
IIH	Hypertermie pomocí intersticiálního implantátu (Interstitial implant hyperthermia)
AEH	Hypertermie pomocí arteriální embolizace (Arterial embolization hyperthermia)
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid]
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
NIH/3T3	Buněčná linie myších embryonálních fibroblastů

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Znáznornění atomových momentů v jednotlivých typech materiálů. Upraveno dle Teja a Koh, 2009.....	15
Obrázek č. 2 Krystalická struktura hematitu, šedé kola jsou Fe, bílé O (Zboril, Mashlan a Peridis, 2002).....	16
Obrázek č. 3 Krystalická struktura magnetitu, šedé kola Fe, bílé O (Zboril, Maschlan a Peridis, 2002).....	16
Obrázek č. 4 Schéma přípravy magnetického nanokompozitu. Upraveno dle Smolkova et al., 2015.....	22
Obrázek č. 5 Redukce ve vodě rozpustného MTT na nerozpustný formazan (Riss et al., 2013).....	28
Obrázek č. 6 Schéma uspořádání laseru a detektorů v průtokovém cytometru (Filters for Flow Cytometry, 2015).....	29
Obrázek č. 7 Dávkování buněčné suspenze na 96-jamkové plata pomocí multikanálové mikropipety.....	34
Obrázek č. 8 Mikrofotografie buněčné linie NIH/3T3 při vyhodnocení cytotoxicity extraktu: A) reference; B) 1%; C) 50%; D) 100%. Zvětšení mikrofotografií je 100x.....	38
Obrázek č. 9 Mikrofotografie přímého kontaktu kompozitů železitých nanočástic s buněčnou linií NIH/3T3 vyhotovené v čase: A) a B) 24 hodin; C) A D) 48 hodin; E) 192 hodin. Zvětšení mikrofotografií je 40x.....	40

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Stanovení vlivu extraktu kompozitů železitých nanočástic na buněčnou viabilitu.....	37
--	----

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1 Závislost absorbance na koncentraci extraktu částic	37
---	----