

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

## **Stanovení cytotoxicity nanočástic**

Bc. Nikola Vondráčková

Diplomová práce

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola Vondráčková**  
Osobní číslo: **C15639**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Název tématu: **Stanovení cytotoxicity nanočástic**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

#### 1) Teoretická část:

Seznamte se s literárními údaji na téma testování toxicity nanomateriálů in vitro. Zaměřte se na metody stanovení cytotoxicity nanočástic a jejich detekci uvnitř buněk. Seznamte se s recentními literárními údaji o výrobě, struktuře, vlastnostech a využití nanomateriálů pro biomedicínské aplikace.

#### 2) Praktická část:

1. Seznamte se sterilním provozem a technickým zabezpečením laboratoře buněčných linií.
2. Osvojte si kultivační protokoly suspenzních a adherentních buněčných linií. Seznamte se s postupy počítání, rozmrazování, zamrazování buněk a jejich pasážování.
3. Samostatně pracujte s vhodnými nádorovými nebo primárními buněčnými liniemi.
4. Stanovte cytotoxicitu vybraných nanočástic na nádorových nebo primárních buněčných liniích.
5. Ke stanovení cytotoxicity použijte test aktivity mitochondriálních dehydrogenáz (XTT), test cytotoxicity v reálném čase pomocí systému xCELLigence a test vylučování trypanové modři ECE (electric current exclusion). U vybraných koncentrací nanočástic se pokuste stanovit jejich vliv na buněčný cyklus a apoptózu.
6. Zhodnoťte všechny získané výsledky vzhledem k výsledkům publikovaným v dostupné recentní literatuře.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Lenka Brůčková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2018

Bc. Nikola Vondráčková

## **Poděkování**

Tímto bych velmi ráda poděkovala prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za cenné rady, podporu a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Lence Brůčkové, Ph.D. za pomoc při zrealizování a vyhodnocení experimentálních výsledků. Věřím, že kvalitní odborné zkušenosti získané pod jejím vedením najdou uplatnění v mém dalším profesním životě. V neposlední řadě si vážím času a trpělivosti paní laborantky Bc. Ivany Fousové, kterou mi věnovala při práci v buněčné laboratoři. Velké poděkování patří také mému partnerovi a rodině za podporu při mé cestě za vzděláním.

## **ANOTACE**

V předložené diplomové práci je systematicky popsán proces testování a ověřování cytotoxicity nových materiálů, konkrétně superparamagnetických nanočástic a mikročástic. Text práce zmiňuje nejen pozitiva využití takových materiálů, ale také se podrobně soustředí na jejich možné toxické účinky. A právě poznatky chování nanočástic v biologických systémech a životním prostředí, jsou pro současnou vědu i lidskou populaci tolik důležité. Předložená práce shrnuje metody vhodné pro stanovení cytotoxicity (nano)materiálů popsanych a aktuálně dostupných v odborné literatuře. Naše *in vitro* studie se zaměřila na cytotoxicitu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH od firmy Bang Laboratories, Inc (Fishers, IN, USA) a jejich modifikovanou formu s navázanou protilátkou IgG. Pro naše experimenty jsme použily buněčné linie A549 a MRC-5. Mezi hlavní cíle patřilo zoptimalizování postupu práce s nano/mikročásticemi pro stanovení cytotoxicity. Buněčnou viabilitu jsme kvantifikovaly metodou redukce tetrazoliové soli XTT, testem vylučování trypanové modře a analýzou proliferace buněk v reálném čase systémem xCELLigence. Koncentrace částic působících na buňky byly v rozmezí koncentrací částic 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml. U obou buněčných linií byl zjevný cytotoxický efekt se středním účinkem až od koncentrace látky v kultivačním médiu 100 µg částic/ml. Při koncentraci testovaných částic 500 µg/ml byly téměř všechny buňky poškozeny a jejich viabilita se blížila k nulovým hodnotám.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

magnetické mikro a nanočástice, cytotoxicita, *in vitro* stanovení, viabilita, A549, MRC-5

## **ANNOTATION**

The presented thesis systematically describes the process of testing and verifying the methods for testing of cytotoxicity of new materials, namely superparamagnetic nanoparticles and microparticles. Text of the thesis does not mention the benefits of such materials application, but also describes in a detail their possible toxic effects to human organism. The knowledge of the behaviour of nano/microparticles in biological systems and in the environment is particularly important to today's science and human population. Therefore, this work provides a summary of methods suitable for the determination

of cytotoxicity as well as studies available and described in recent scientific literature. Our *in vitro* study specifically monitors the cytotoxicity of microparticles ProMag™ 1 Series COOH from Bang Laboratories, Inc (Fishers, IN, USA) and their biofunctionalized form with covalently linked IgG molecules. We applied A549 and MRC-5 cell lines for our cytotoxicity tests. The main objectives were to optimize the procedure for preparation of nano/microparticles suspension, working solution to determine cytotoxicity reproducibly. Cell viability was quantitated by XTT tetrazolium salt reduction, trypan blue exclusion test, and real-time cell proliferation analysis by xCELLigence system. Concentrations of the particles acting on the cells were in the range of particle concentrations of 0,1 µg/ml - 1000 µg/ml. For both cell lines, an apparent cytotoxic effect with a medium impact was apparent from the concentration of the substance in the culture medium of 100 µg particles/ml. At the concentration of test particles of 500 µg/ml, almost all cells were damaged and their viability was approaching zero.

## **KEYWORDS**

magnetic micro and nanoparticles, cytotoxicity, *in vitro* determination, viability, A549, MRC-5

## Obsah

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>11</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>13</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>14</b>
1.1 MAGNETICKÉ MIKROČÁSTICE A NANOČÁSTICE .....	14
1.1.1 Charakteristika.....	14
1.1.2 Nano/mikročástice oxidů železa.....	21
1.1.3 Syntéza nano/mikročástic obsahující oxidy železa .....	23
1.1.4 Modifikace, funkcionalizace magnetických nano/mikročástic .....	25
1.1.5 Využití magnetických částic nano/mikročástic v biomedicíně .....	26
1.2 TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY MAGNETICKÝCH NANO/MIKROČÁSTIC.....	30
1.2.1 Norma testovacích metod, zkoušek <i>in vitro</i> .....	30
1.2.2 Testy cytotoxických metod <i>in vitro</i> .....	31
1.2.3 Průkaz magnetických nano/mikročástic uvnitř buněk.....	32
1.2.4 <i>In vivo</i> testování magnetických nano/mikročástic.....	33
1.3 VLIV NANO/MIKROČÁSTIC NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ.....	35
1.3.1 Potenciální negativní dopad nano/mikročástic na životní prostředí.....	35
1.3.2 Možnosti využití cytotoxického účinku nano/mikročástic v životním prostředí .....	36
1.3.3 Vychytávání těžkých kovů ze znečištěných vod .....	39
1.4 CHOVÁNÍ NANO/MIKROČÁSTIC V BIOLOGICKÝCH SYSTÉMECH.....	40
1.4.1 Možnosti vstupu nano/mikročástic do organismu .....	40
1.4.2 Vstup nanočástic do buňky.....	42
1.4.3 Mechanismus toxicity magnetických nano/mikročástic.....	43
1.4.4 Chování a interakce nano/mikročástic při <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> podmínkách .....	45
1.4.5 Vliv modifikovaných nano/mikročástic na toxicitu buňky .....	47
<b>2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>52</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>53</b>
3.1 POUŽITÉ POMŮCKY, PŘÍSTROJE A ROZTOKY .....	53
3.2 PŘÍPRAVA MÉDIÍ A PUFRU .....	55
3.3 POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE A PRÁCE S NIMI .....	55



3.3.1	Testování cytotoxicity s buněčnou linií A549 a MRC-5 .....	55
3.3.2	Pasážování, trypsinizace buněk a kultivační podmínky .....	55
3.3.3	Počítání buněk tzv. metodou „Electric Current Exclusion“, přístroj CASY TT Cell Counter.....	56
3.4	PŘÍPRAVA DESTIČKY A OVLIVNĚNÍ MIKROČÁSTICEMI .....	57
3.4.1	Testované mikročástice .....	57
3.4.2	Postup .....	57
3.5	STANOVENÍ VIABILITY TESTEM XTT.....	60
3.5.1	Použité roztoky a chemikálie.....	60
3.5.2	Postup .....	60
3.6	MANUÁLNÍ STANOVENÍ VIABILITY TRYPANOVOU MODŘÍ.....	62
3.6.1	Postup .....	62
3.7	ANALÝZA PROLIFERACE BUNĚK V REÁLNÉM ČASE SYSTÉMEM XCELLIGENCE .....	64
3.7.1	Postup .....	65
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>67</b>
4.1	STANOVENÍ CYTOTOXICITY TESTEM XTT .....	67
4.1.1	Optimalizace práce s ProMag™ 1 Series · COOH při studiu jejich vlivu na buněčnou linii A549 .....	67
4.1.2	Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH s vázaným IgG na buněčnou linii A549 .....	70
4.1.3	Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH na buněčnou linii MRC-5 .....	71
4.1.4	Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH s vázaným IgG na buněčnou linii MRC-5 .....	72
4.2	STANOVENÍ VIABILITY BUNĚK V BÜRKEROVĚ KOMŮRCE S TRYPANOVOU MODŘÍ .....	73
4.2.1	Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH na buněčnou linii A549 .....	73
4.3	STANOVENÍ VIABILITY BUNĚK TZV. METODOU „ELECTRIC CURRENT EXCLUSION“ .....	74
4.3.1	Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH na buněčnou linii A549 .....	74
4.4	MIKROSKOPICKÉ POZOROVÁNÍ EFEKTU MAGNETICKÝCH NANO/MIKROČÁSTIC NA VYBRANOU BUNĚČNOU LINII .....	75

4.4.1 Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH na buněčnou linii A549 .....	75
4.5 ANALÝZA BUNĚČNÉ CYTOTOXICITY MAGNETICKÝCH NANO/MIKROČÁSTIC V REÁLNÉM ČASE SYSTÉMEM xCELLIGENCE .....	77
4.5.1 Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH a ProMag™ 1 Series · COOH s navázaným IgG na buněčnou linii MRC-5 .....	77
<b>5 ZÁVĚR.....</b>	<b>82</b>
<b>SEZNAM ZDROJŮ .....</b>	<b>84</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>103</b>
Příloha 1. Vybraná experimentálně zjištěná data pomocí spektrofotometru PowerWave 340	
Příloha 2. Vybraná experimentálně naměřená data systémem xCELLIGENCE Real-Time Cell Analyzer Single Plate	

## SEZNAM ZKRATEK

A549	buňky lidského alveolárního adenokarcinomu plic
bb.	buňky
CI	buněčný index (angl. cell index))
DMSO	dimetylsulfoxid
DPBS	fosfátový pufr (angl. Dulbecco's phosphate buffered saline)
ECR	elektron vázající reagent (angl. electron coupling reagent)
ELISA	imunoenzymatická reakce na pevné (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
FBS	fetální bovinní sérum
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1]-ethansulfonová kyselina
IL	interleukin
LDH	laktátdehydrogenáza
MMPs, MNPs	magnetické mikro/nanočástice (angl. magnetic micro/nanoparticles)
MEM	minimální esenciální médium (angl. minimum essential medium)
MRC-5	nenádorová linie zdravých plicních fibroblastů
MRI	magnetická rezonance (angl. magnetic resonance imaging)
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid
MWCNTs	vícenásobné uhlíkové nanotrubičky (angl. multi-wall carbon nanotubes)
NK	negativní kontrola; neovlivněné
NPs	nanočástice (angl. nanoparticles)
PBS	fosfátový pufr (angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction)
ROS	reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species)
RTCA	analýza buněk v reálném čase (angl. real-time cell analysis)

SPIONs	superparamagnetické nanočástice oxidů železa (angl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles)
XTT	hydrát 3'-[1-(fenylaminokarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro)benzensulfonátu sodného

## ÚVOD

Díky svým unikátním vlastnostem se staly nanomateriály hlavním objektem zájmu napříč mnoha technologickými i biomedicínskými obory. Vznikají rozsáhlé studie o metodách syntézy a produkce nových materiálů využitelných v různých velice rozmanitých oborech lidské činnosti. Další výzkumné studie se snaží zodpovědět otázky týkající se bezpečnosti a možného nežádoucího účinku takových materiálů na lidský organismus, na životní prostředí. Velmi významným oborem, kde se nanotechnologie a nanomateriály v dnešní době uplatňují je biomedicína.

Magneticky aktivní materiály v kombinaci s magnetickým polem nacházejí velkou škálu uplatnění v *in vitro* a *in vivo* diagnostice, v zobrazovacích metodách, v terapii mnoha závažných chorob, včetně nádorových. Mnohé z nich jsou díky svému složení a struktuře považovány za netoxické, lze použít i termín biokompatibilní. To je jeden z hlavních důvodů jejich širokého využití nejen v klinické praxi ale i v rámci biomedicínského výzkumu. Jedná se například o magnetickou rezonanci, dopravu léčiv, radionuklidů, cytostatik, vyvolání hypertermického účinku pro efektivnější destrukci nádorových buněk (Pankhurst a kol., 2003), nebo cílenou opravu tkání či imunoanalýzu (Murugan a kol., 2017).

Charakter, možné modifikace či mechanismus působení nano/mikročásteček v biologických systémech hrají nepostradatelnou roli pro pochopení možného toxického působení. Z praktického i etického hlediska se v současnosti provádějí *in vitro* metody testování cytotoxicity. Avšak práce s nano/mikročástečkami není vždy snadná. Mnohdy se výzkumníci potýkají s problémy, jako například spontánní agregace částic, interakce povrchu částic s proteiny či adherence částic na povrch buněk. Určitými laboratorními postupy lze tyto nežádoucí faktory minimalizovat a získat tak validní informace.

V experimentální části této diplomové práce jsou testovány vybrané metody cytotoxicity a postup práce s magnetickými nano/mikročástečkami byl optimalizován. Cytotoxicita magnetických mikročástic, s nimiž se pracovalo, nebyla doposud v literatuře detailně studována a popsána. Proto se testování jejich toxicity stalo hlavním tématem této diplomové práce.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Magnetické mikročástice a nanočástice

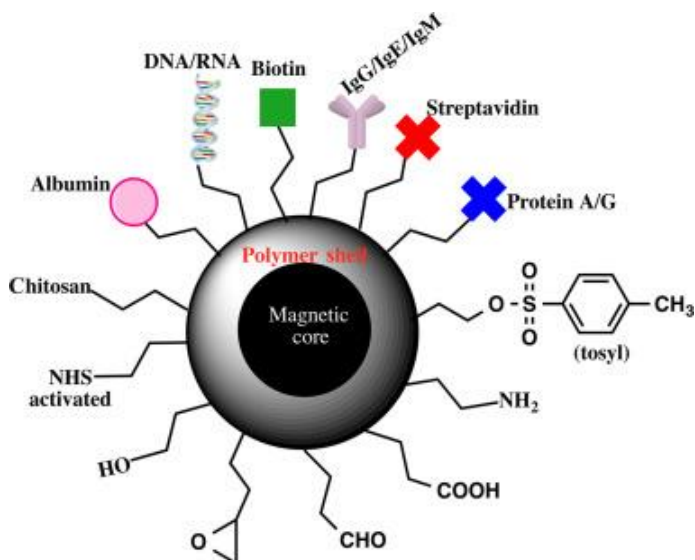
Magnetické mikročástice (MMPs, Magnetic Microparticles) a nanočástice (MNPs, Magnetic Nanoparticles) se dostaly do popředí zájmu zejména biologických výzkumů, biotechnologií, lékařství, farmacie, dále pak environmentální sféry, elektronického průmyslu a robotiky. Tyto materiály jsou zajímavé díky svým unikátním vlastnostem. Pomocí externího magnetického pole je lze velmi rychle a selektivně izolovat z komplexních vzorků. Využívá se vhodných magnetických separátorů, permanentních magnetů či elektromagnetů. Výhodou je, že při manipulaci s magnetickými částicemi, není potřeba centrifugace. Tato cílená manipulace externím magnetickým polem je hojně rozvinuta ve spojení magnetických nosičů s biologicky aktivní látkou. Mezi nejčastější biokompatibilní nosiče patří magnetické oxidy železa. Na velký povrch MMPs či MNPs se může vázat mnoho ligandů, což z nich dělá efektivní nosiče (Pečová a kol., 2011). Další výhodou je, že jsou takto funkcionalizované částice schopny akumulace do konkrétního místa. Vnější magnetické pole je tak využíváno nejen pro cílenou dopravu, kontrolu pohybu, ale i pro udržení magnetických částic v požadované oblasti (Khalil a kol., 2016). Při působení střídavého magnetického pole mohou generovat teplo a vyvolávat hypertemii neboli vysoko teplotní destrukci nádorových buněk. Dále slouží jako efektivní kontrastní látka při zobrazování magnetickou rezonancí (MRI, Magnetic Resonance Imaging), (Šafařík a Šafaříková, 2009, Pečová a kol., 2011)

### 1.1.1 Charakteristika

Pojem nanomedicína se spojuje s rokem 1991, kdy byl výraz poprvé použit. Do literárního podvědomí vešel v roce 1999 s publikací Roberta A Freitase Nanomedicína. Avšak k progresivnímu rozvoji dochází až na začátku 21. století (Krukemeyer MG a kol., 2015).

Z hlediska velikosti lze magnetické částice rozdělit na mikročástice o velikosti  $1\ \mu\text{m}$  -  $1000\ \mu\text{m}$ , jež jsou v některých publikacích nazývány magnetické mikrosféry. V ideálním případě by měly být menší než  $200\ \mu\text{m}$ . Mají sypký práškový charakter a jsou většinou složeny ze syntetických polymerů, uvnitř kterých jsou multijádrové

feromagnetické nanočástice, viz Obrázek 1 (Mukherjee a Bandyopadhyay, 2012). Pokud jsou hodnoty velikostí řádově  $10^{-9}$  m, jedná se o nanočástice. Obecně se magnetické nanočástice vyskytují v oblastech mezi 1 - 500 nm (Baumgarten a kol., 2007). U ještě menších rozměrů, s jádrovou velikostí 2 - 30 nm, jež dává nanočásticím tak unikátní charakter, je důležité si nejdříve vyjasnit pojem doména neboli spontánně zmagnetizovaná oblast (Gubin, 2009).

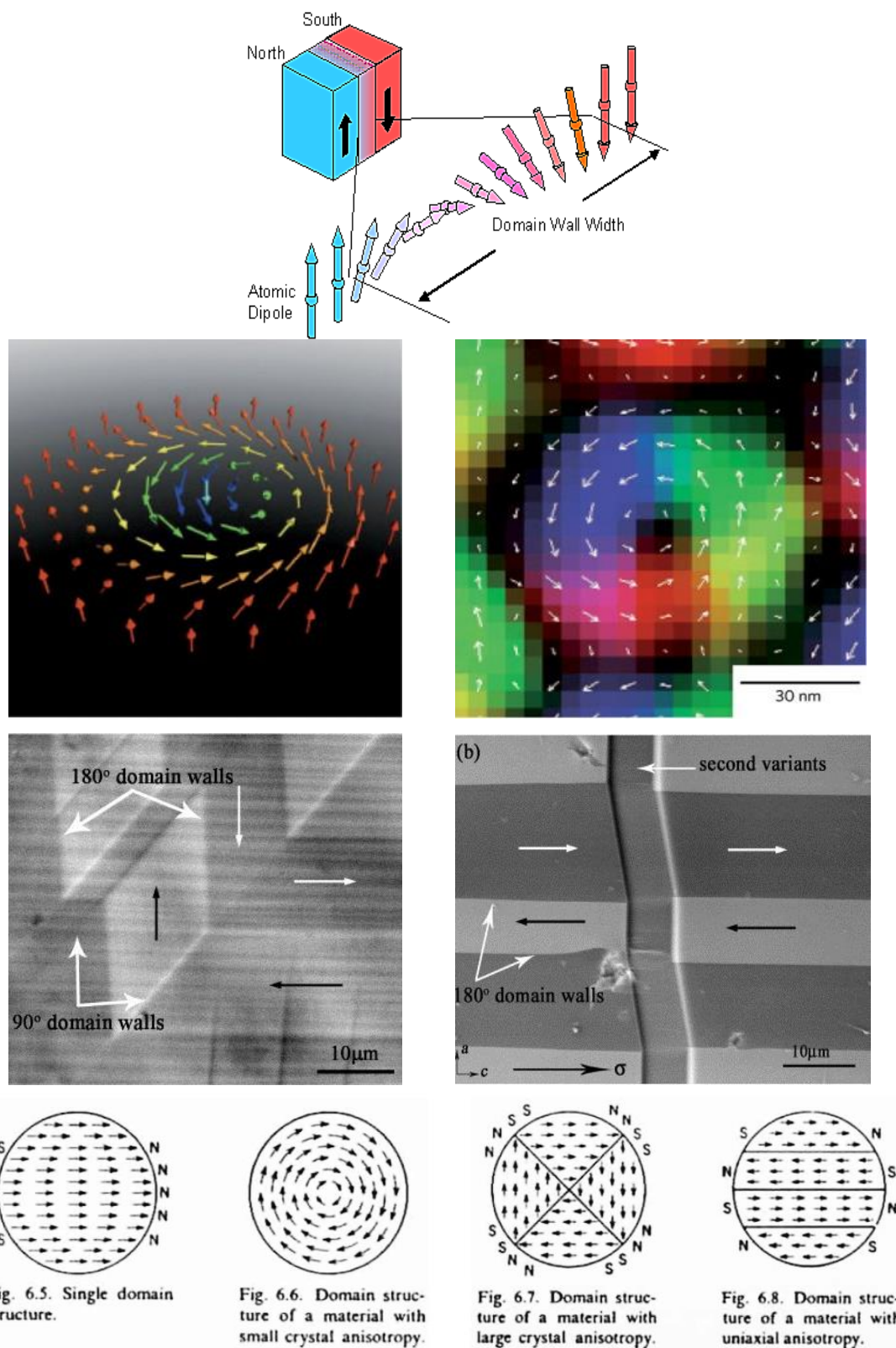


Obrázek 1: Příklad magnetického jádra s polymerním obalem, převzato dle (Otieno a kol., 2016)

## Jednodoménnost a superparamagnetismus

Skupiny magnetických momentů; domény jsou odděleny doménovými stěnami. Jedná se o rozdělení spontánně zmagnetizovaných oblastí, se vzájemně odlišnými směry vektorů. Tyto jevy jsou znázorněny na Obrázku 2. Pro vytvoření stěn je důležitá určitá šířka a energie, která snižuje celkovou magnetickou energii systému. S klesajícím rozměrem MNPs ubývá počet magnetických domén, kterými jsou MNPs tvořeny. Neboli klesá počet vznikajících doménových stěn. Pokud se velikost dostane pod kritickou hodnotu  $D_{SD}$  (angl. Single Domain), tvorba domén není již energeticky výhodná. Nezmenšila by se celková energie. Zmíněný kritický rozměr je silně závislý na magnetické anisotropii a tvaru MNPs (Gubin, 2009). Taková částice má tedy jedno-doménový charakter. Magnetické momenty všech atomů jsou v ní uspořádány paralelně, v jednom směru a navzájem spolu spolupracují skrz celou částici. Výsledný vektor magnetizace je pak mnohem větší než u více doménových systémů. Navenek vykazuje taková to částice obrovský superspin (magnetický moment) s hodnotami v tisících až desetitisících Bohrových magnetonů (elementární jednotka magnetického momentu, závislá

na modifikované Planckově konstantě, elementárním náboji a klidové hmotnosti elektronu),(Kolářová, 2013, Pečová a kol., 2011).



**Obrázek 2:** Domény a doménové stěny, interakce mezi magnetickými momenty v materiálu, převzato a upraveno dle (Tuček, 2010; Nagaosa a Tokura, 2013, Ge a kol., 2005)

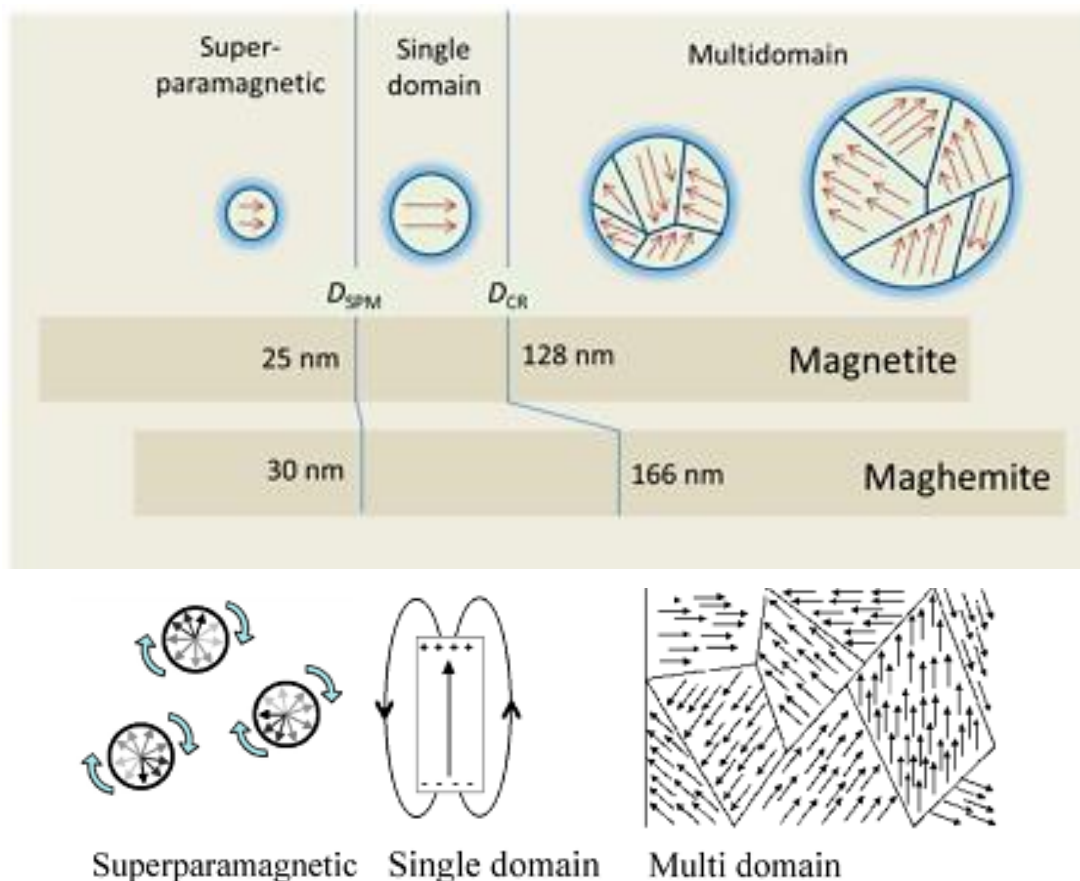


Charakterizace chování MNPs je spojována se superparamagnetismem a konečným rozměrem částic. Konečný rozměr je dán tvarem, objemem a materiálovou specifikou MNPs. Vzniká dalším zmenšováním jedno-doménového systému, viz Obrázek 3. V závislosti na teplotě a zmenšujícím se objemu částic, je magnetický moment schopný se spontánně otočit z jednoho směru do jiného a to i bez působení externího magnetického pole (Varadan a kol., 2008). Jinak řečeno přes anizotropní bariéru (viz  $\Delta E$ ). Původní orientaci magnetického momentu nejsou schopny udržet ani upevněné MNPs. Čím je teplota vyšší, tím snadněji změní magnetický moment směr. Na teplotě závisí saturační magnetizace. V průměru je magnetické pole přes čas pozorování nulové. Vlastnosti superparamagnetismu se odvíjejí zejména od relaxační doby  $\tau$ :

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad \Delta E = KV$$

$\tau$  – průměrná doba fluktuace; doba mezi překlopeními dvou snadných směrů magnetizace,  $\tau_0$  – konstanta materiálu (má velikost přibližně  $10^{-9} - 10^{-12}$  s),  $\Delta E$  – energetická bariéra (odděluje dva snadné směry magnetických momentů; význačné orientace namířené proti sobě, drží magnetizaci ve stabilním stavu),  $k_B$  – Boltzmanova konstanta,  $T$  – teplota,  $K$  – anizotropní konstanta,  $V$  – objem.

Superparamagnetismus je výsledkem soutěžení anizotropní energie a energie fluktuací mezi dvěma význačnými směry (Tuček, 2010). Při blokovací teplotě dojde k jejich srovnatelnosti. Tyto změny probíhají velmi rychle. Zejména při odezvě i na slabé vnější magnetické pole, kdy se v superparamagnetických částicích vykazuje intenzivní vnitřní magnetizace. MNPs tak reagují jako permanentní magnet. Jejich magnetická citlivost je však mnohem větší. Proto nosí v názvu předponu „super“. Rychlé přeorientování je velmi populární při využití v MRI jako kontrastní látka. Lze tak pořídit více magnetických skenů za jednotku času (Mahdavi a kol., 2013; Svatáková, 2012; Benz, 2012).

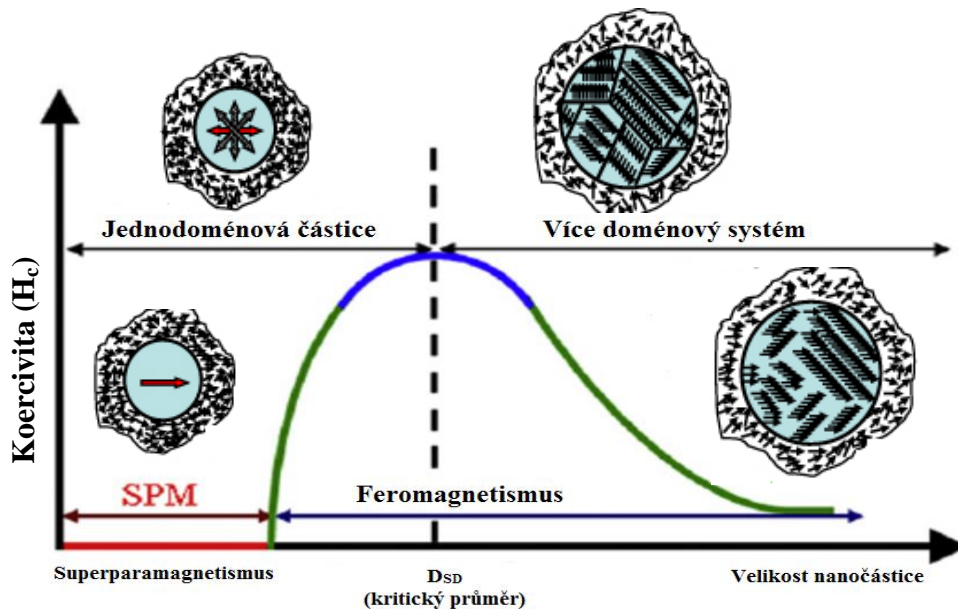


**Obrázek 3:** Magnetické chování a režimy magnetitu a maghemitu, jako exponenciální funkce jejich velikosti, magnetické anizotropie materiálu a teploty vzorku, převzato a upraveno dle (Estelrich a kol., 2015; Ruffert, 2016)

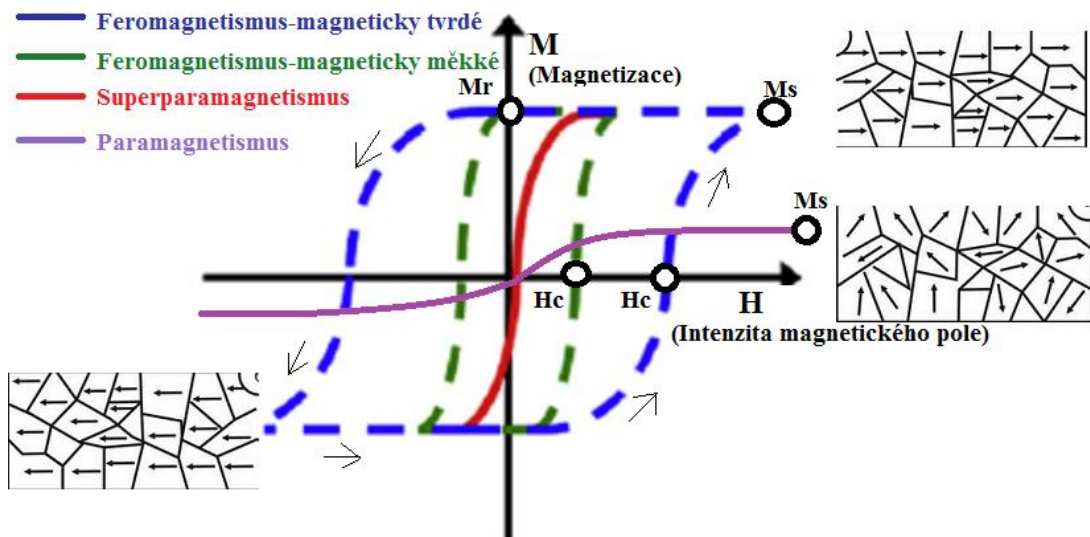
Paramagnetické materiály (Al, Gd, Mg, Li, Ta) mají díky svým nepárovým elektronům celkový magnetický moment nulový. Magnetická doména chybí. Při působení vnějšího magnetického pole dojde k natočení dipólů a vzniká slabý magnetický moment, který zesiluje vložené magnetické pole. Tyto látky však nejsou schopny moment udržet po odstranění vnějšího působení. Feromagnetické materiály si ho udržet dokáží (Fe, Ni, Co). Při spontánní magnetizaci, způsobené výměnnými silami mezi sousedními atomy, vznikají již zmíněné magnetické domény s nahodilou orientací. Směr je různý a magnetický moment je nulový. Působením vnějšího magnetického pole se objem domén zvětšuje. Orientace magnetického momentu se tak blíží směru vnějšího působení. Při dalším zesílení je už orientace shodná a dochází k trvalému zmagnetizování látky. K nasycení dochází při 90 % zmagnetizovaného práškového feromagnetického materiálu. Zbylá procenta jsou vysvětlena jako magneticky neaktivní atomová vrstva na povrchu částice s nezanedbatelným objemem (Hofmann-Amtenbrik a kol., 2009; Issa a kol., 2013).

Takovéto materiály, jež mají vysokou koercitivitu  $H_c > 1000 \text{ A / m}$ , co největší magnetickou indukci  $B$  a širokou plochu hysterezní smyčky, se nazývají permanentní magnety neboli magneticky tvrdé materiály. Magnetické pole jim zůstává zachováno po dlouhou dobu po vyjmutí z vnějšího magnetického pole. Modře znázorněno na Obrázku 4 B). Naproti tomu magneticky měkké látky ho snadno ztrácejí. Zbytkový magnetismus je velmi malý. Hysterezní smyčka je úzká s koercivitou  $H_c < 100 \text{ A/m}$ , znázorněno zeleně na Obrázku 4 B), (Jiles, 2003). Feromagnetické částice jsou zejména doporučovány pro separaci DNA či RNA (Kakar a kol., 2013).

A)



B)



**Obrázek 4:** A) Kvalitativní chování velikosti magnetické nanočástice závislé na koercivitě  $H_c$  (schopnost; síla působící proti spontánní či vnějším polem vyvolané demagnetizaci; odmagnetování), barevné propojení křivek s druhou částí obrázku 3, B) Hysterezní křivka – závislost magnetizace materiálu  $M$  na intenzitě magnetického pole  $H$  ( $M_r$  – remanentní; zbytková magnetizace, zůstává i poté co se sníží magnetické pole na nulu,  $M_s$  – maximální saturační magnetizace; nasycení,  $H_c$  – koercitivní síla potřebná k odmagnetování; potlačení remanentní indukce na nulu, čím je větší, tím je feromagnetická látka magneticky tvrdší), převzato a upraveno dle (Mehrmohammadi a kol., 2011; Paunović a kol., 2012)

### 1.1.2 Nano/mikročástice oxidů železa

Pro biomedicinální aplikace jsou unikátní vlastnosti, jako právě magnetismus, malé rozměry s naopak velkým povrchem ( $100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ), velmi vážené. MMPs a MNPs jsou ideálními kandidáty pro povrchové nano/mikro-inženýrství a produkci funkcionalizovaných struktur. Využívá se schopnosti vazby velkého množství ligandů, molekul, cílení na postižené buňky a zejména pak jejich účinnou, rychlou imobilizaci a separaci. Takováto manipulace s biologicky aktivními látkami patří k ústředním biochemickým metodám (Pečová, 2011; Mahmoudi a kol., 2011).

MMPs se ve většině případů skládají z polymerních mikrokuliček o průměru 0,1 - 5  $\mu\text{m}$  s vloženou multi-jádrovou MNPs (Keerthi a kol., 2013). Skleněné mikrokuličky mají omezenou možnost aplikace v biomedicinální sféře. První zmíněné polymerní mikrokuličky lze ještě rozdělit na polystyrenové. Ty usnadňují imunoprecipitaci, třídění buněk a umožňují snadnou proteinovou adsorpci na jejich povrch. Dále pak polyethylenové, jež jsou běžně využívané jako plnivo. Pro svou výbornou tvarovou dostupnost své uplatnění nachází také u vizualizace (barvení, fluorescentní mikrokuličky, průtoková analýza), (Mukherjee, 2013).

Magnetické jádro obsahuje nejčastěji magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nebo maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Jedná se o kovové oxidy s nejsilnější magnetickou odpovědí. Mají superparamagnetické či feromagnetické vlastnosti. V publikacích je lze nalézt jako Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) či Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide (USPIO), (Umashankar a kol., 2016). Tyto materiály jsou pro biomedicinální aplikace používány nejčastěji, proto jsou zde blíže vysvětleny. Splňují totiž požadavky jako je chemická stabilita za fyziologických podmínek, nízká toxicita a zejména velký magnetický moment. Mimo jiné mohou být jádra tvořena ferity  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  ( $\text{M} = \text{Mn}, \text{Zn}, \text{Co}, \text{Ni}$ ), (Estelrich, 2015; Kakar a kol., 2013).

#### **Magnetit $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{Td}}[\text{Fe}^{3+}+\text{Fe}^{2+}]_{\text{Oh}}\text{O}_4$**

Jedná se o feromagnetickou látku (je přitahována permanentním magnetem) mající kubickou inverzní spinelovou symetrii. Základní jednotka; buňka se nazývá face centered cubic (FCC) a obsahuje 32 aniontů  $\text{O}^-$ . Dále má krystalovou strukturu tvořenou 8 kationty  $\text{Fe}^{3+}$  z tetraedrů ( $\text{T}_d$ ), zatímco 8 kationtů  $\text{Fe}^{3+}$  a 8 kationtů  $\text{Fe}^{2+}$  jsou oktaedry ( $\text{O}_h$ ).

Dle názvosloví ho lze pojmenovat také jako oxid železnato-železitý. Prvkové zastoupení je Fe = 72,36 % a O = 27,64 % (Kakar a kol., 2013; Thanh, 2012). Vztaženo na jednotku FCC prostorového vizualizačního konstrukčního parametru Fd3m, který se rovná 0,839 nm. Hustota přírodního magnetitu je 5,2 g/cm<sup>3</sup> (Ghazanfari a kol., 2016). Nanočástice magnetitu vykazují při pokojové teplotě a podprahové velikosti 20 nm superparamagnetismus. Nad touto hranicí až do 80 nm, stabilní jedno-doménovost s vyšší magnetickou saturací a perzistentní zbytkovou magnetizací, kterou si drží (Altan a kol., 2016; Baumgartner a kol., 2013).



V přítomnosti kyslíku se Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> oxiduje na maghemit (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Dochází ke změně v krystalické struktuře na tetragonální. Železo se zde nachází výhradně jako trojmocné a jsou zde přítomné vakance. Nicméně má velmi podobné vlastnosti. Stejně jako magnetit, vykazuje již při pokojové teplotě feromagnetismus. Drobná odlišnost superparamagnetického chování je při 30 nm (Mahmoudi a kol., 2011, Estelrich, 2015).

### **ProMag™ 1 Series COOH**

V experimentální části této diplomové práce bylo pracováno s ProMag™ 1 Series – COOH. Jedná se o superparamagnetické monodisperzní částice ProMag™ 1 Series COOH od americké společnosti Bangs Laboratories, Inc. (Technology Dr. Fishers, IN, USA). Patří mezi sférické polymerní částice na bázi magnetitu. S rozměry 1 – 3 μm a nízkou nespécifickou proteinovou vazbou, jsou vhodné pro použití v celé řadě výzkumů. Hustota u menších částic je 1,8 g/cm<sup>3</sup> a větších 1,6 g/cm<sup>3</sup>. Jsou rozpustné ve vodě (hnědá kapalná suspenze). Dají se snadno promývat či separovat pomocí magnetu. Firma uvádí, že zmrazení částic může způsobit ireverzibilní agregaci a ztratit vázající aktivitu. Jsou klasifikovány jako nízkorizikové pro běžné použití. Avšak toxikologické vlastnosti ještě nejsou důkladně prozkoumány. Ve složení kapalného roztoku lze nalézt NaN<sub>3</sub>. Ten je ale vysoce toxický. Napadá srdce, nervy, mozek, může způsobovat rakovinu (Bangs Laboratories, 2017).

### 1.1.3 Syntéza nano/mikročástic obsahující oxidy železa

Existuje mnoho fyzikálních a chemickým metod jako jsou precipitace, koprecipitace, mikroemulze, sol gel syntéza, termální dekompozice, hydrotermální a sonochemické metody (Ghazanfari a kol., 2016; A. K. Gupta a M. Gupta, 2005). V Tabulce 1 je na první pohled zřetelné, že se jednotlivé metody liší svou náročností, kvalitou či kvantitou získaného produktu.

Koprecipitace jako jedna z konvenčních a levných metod je postavená na principu vysrážení vodných roztoků  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  v přítomnosti báze. Sole jsou redukovány roztoky jako NaOH a  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  za vzniku černého precipitátu magnetitu či maghemitu. Rovnice popisující reakci je následující:  $\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$ . Touto metodou vznikají různě velké částice. Řízení velikosti, tvaru, složení a magnetických vlastností nanočástic závisí na následujících: druhu použité soli, jako jsou například  $\text{Cl}^-$ ,  $(\text{SO}_4)^{2-}$ ,  $(\text{NO}_3)^-$ ,  $(\text{ClO}_4)^{-}$ . Probublávání  $\text{N}_2$ , jako ochrana nejen před oxidací, ale právě i pro redukci velikosti (A. K. Gupta a M. Gupta, 2005), teplota v rozmezí  $25\text{ }^\circ\text{C} - 80\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow$  vznik částic obvykle menších než 10 nm. Dále  $\text{pH} = 8,5 - 10$  pro rychlou tvorbu sraženiny a předejití tvorby nemagnetických sraženin. Zabránění nárůstu nechtěných povlaku na vznikajících jádrech pomocí kyseliny citrónové, palmitové, listové, stearové, laurové, olejové. Velmi důležitá je povrchová stabilizace pro potlačení mezičásticových interakcí, dosažení monodisperzity. Jedním z takových kroků je pokrytí přírodními nebo syntetickými polymery. Těmi jsou např. polysacharidy (dextran, chitosin, škrob), polyvinylalkohol, polyethylenimin, polyethylenglykol, poly-*l*-lysinu, kyselina polymethakrylová, substituované polyakrylamidy (Babič, 2012, Baumgartner a kol., 2013).

Strategie, zahrnující výše zmíněné a dále pak potažení například anorganickou vrstvou jako jsou nekovové částice ( $\text{SiO}_2$ , silika) či kov (Au), jsou v mnoha případech využity nejen jako ochranná vrstva magnetického jádra, ale zvyšuje se tím biokompatibilita. Toho se využívá pro další funkcionalizaci (biofunkcionalizaci), chemickou modifikaci (Ghazanfari a kol., 2016; Hofmann-Antenbrink a kol., 2009). Výsledná sraženina je z roztoku vyjmuta pomocí externího magnetického pole. Dále je v procesu peptizace opakovaně promývána deionizovanou vodou. To až do doby, kdy je zřetelný koloidní charakter. Separace je provedena pomocí centrifugace (Blaney, 2007).

Mezi alternativní metody patří již zmíněná mikroemulze. V literatuře uváděná také pod titulkem metoda reverzních micel. Zde může být kovový prekurzor precipitován

jako kovový oxid ve vodní fázi uvnitř micely. Micely se vytvoří díky kontinuální termodynamické disperzi dvou nemísitelných kapalin (vody v oleji). V organické fázi je totiž kovový prekurzor nereaktivní a oxid kovu tu neprecipituje. Velikost vzniklých MNPs může být upravována pomocí velikosti vodních kapiček ve vnitřním prostoru micely. Kromě typu prekurzoru, reakční teploty a času tedy záleží na poměru vodní/olejové fáze, případně surfaktantu. Nicméně vzniklé magnetitové částice jsou menší než 16 nm (Ghazanfari a kol., 2016; Mahmoudi a kol., 2011). Jinde v literatuře lze najít rozměry vzniklých částic i 1-2 nm (A. K. Gupta a M. Gupta, 2005)

Z hlediska kontroly velikosti, její úzké distribuce a vysoké krystalizační schopnosti patří termální dekompozice neboli tepelný rozklad mezi ty nejefektivnější metody. Proces začíná počátečním zráním zárodků reakce prekurzorů. K reakční směsi je přidán horký solvent, který řídí nukleaci. Následuje zvyšující se teplota, až do rozkladné teploty (nad 300 °C). Touto metodou lze připravit částice s průměrnou velikostí 12 nm (Ghazanfari, 2016).

Silikou potažený  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s průměrnou velikostí 150 nm lze připravit aerosolovou pyrolýzou methanolu obsahujícího kov amonium citrat a tetraethoxysilan (A. K. Gupta a M. Gupta, 2005). Pro získání maghemitu se také využívá sanikace s použitím NaClO.

**Tabulka 1:** Srovnání klíčových vlastností rozdílných syntetických metod, převzato a upraveno dle (Ghazanfari, 2016)

Syntetická metoda	Náročnost	Reakční teplota °C	Reakční čas	Solvent	Velikost	Kontrola tvaru	Výtěžek
<b>Koprecipitace</b>	Velmi jednoduchá	20–90	Minuty	Voda	Relativně úzká	Není dobrá	Velký
<b>Mikroemulze</b>	Komplikovaná	20–50	Hodiny	Organika	Relativně úzká	Dobrá	Nízký
<b>Termální dekompozice</b>	Komplikovaná	100-320	Hodiny až dny	Organika	Velmi úzká	Velmi dobrá	Velký
<b>Hydrotermální</b>	Jednoduchá	200-250	Hodiny až dny	Voda/ Etanol	Velmi úzká	Velmi dobrá	Střední

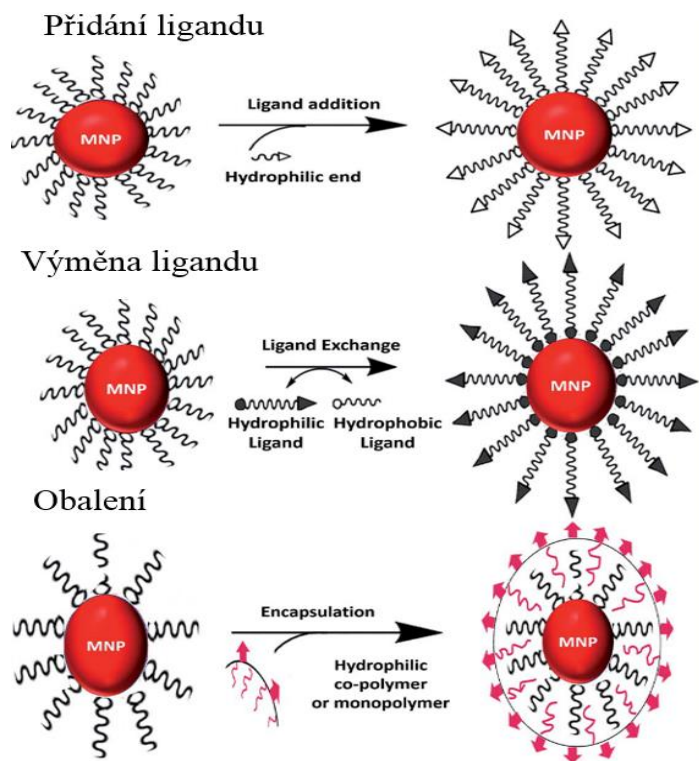
Mezi zajímavé možnosti získání magnetických nanomateriálů (velikosti 20 - 100 nm) je použití živých mikroorganismů jako jsou například magnetotaktické bakterie *Magnetospirillum magneticum*. V procesu biomineralizace totiž produkují unikátní prokaryotickou organelu zvanou magnetozom. Jedná se o magnetické monokrystaly magnetitu potažené fosfolipidovou membránou. Jejich velkou výhodou



je biokompatibilita a snadná vazba bioaktivních látek (Yamagishi a kol., 2016). Yamagishi a kol. (2016) u této bakterie popisují možnost řízení exprese genu *Mms7* pro regulaci výroby nanokrystalů požadované velikosti a tvaru. Mezi další bakterie patří *Leptothrix*, *Gallionella*, *Geotracer sulurreducens*, *Thiobacillus denitrificans* (Sharma a kol., 2015).

#### 1.1.4 Modifikace, funkcionalizaci magnetických nano/mikročástic

V biomedicině se jedná se o nezbytný proces. Biologicky významné látky se váží na modifikovaný povrch MNPs či MMPs. Mezi klíčové faktory biokompatibility patří velikost, hydrofobní či hydrofilní povrch a jeho náboj. Nelze opomenout ani nízkou cytotoxicitu a imunogenicitu. Pro zabránění reakce povrchu částic se skupinami, jež ho modifikují, je třeba povrch upravit například karboxylovou, aldehydovou, thiolovou nebo aminovou skupinou. Na tyto skupiny je možné vázat protilátky, enzymy, proteiny, cytotoxické látky či DNA (Boraha a kol., 2016). Zabrání se tak i reakcím oxidů železa s krevní plazmou. Na Obrázku 5 jsou znázorněny tři mechanismy povrchové funkcionalizace. Příklad polymerních modifikací na Obrázku 6.



**Obrázek 5:** Tři odlišné strategie mechanismu povrchové funkcionalizaci, převzato a upraveno dle (Boraha a kol., 2016)



**Tabulka 2:** Používané krycí vrstvy mikro/nanočástic a jejich aplikace, převzato a upraveno dle (Ali a kol., 2016; Mahmoudi a kol., 2011)

	Velikost [nm]	Použití	Výhody
<b>Amorfní SiO<sub>2</sub></b>	20–200	Izolace biomolekul, např. genomické a plazmidové DNA, extrakce nukleových kyselin z půdy, podávání léků, extrakce fenolické sloučeniny z oblasti životního prostředí vody	Nevyžaduje žádná organická rozpouštědla, odstraňující látky potřebné k opakovanému odštěďování, vakuové filtrace nebo pro separační kolonu
<b>Mesoporézní SiO<sub>2</sub></b>	10–300	Kontrolované dodávání léčiv, odstranění rtuti z průmyslových odpadních vod, podpora imobilizace enzymu pro bio-katalýzy, fluorescence, izolace genomové a plazmidové DNA	Jednotná velikost pórů, velká plocha a dobrá přístupnost objemu pórů
<b>Polyethylen-glykol</b>	10-50	<i>In vivo</i> NMR zobrazování a kontrastní zobrazování, vazba specifických Ab mířených na nádorové buňky	Zlepšení biokompatibility <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> , efektivnost MNPs, snadná funkcionalizace, stabilita
<b>Polyvinyl-alkohol</b>	10-50	Zobrazování <i>in vivo</i> a podávání léčiv	Zabránění koagulaci částic → monodisperzita
<b>Polyvinyl-pyrrolidin</b>	10-20	Kontrastní zobrazování a dodávání léčiv	Zvýšení doby cirkulace v krevním oběhu, stabilizace koloidního roztoku
<b>Polyakrylová kyselina</b>	cca 250	Cílená trombolýza rekombinantním tkáňovým aktivátorem plazminogenu	Zvýšení stability a biokompatibility částic, lepší bioadheze
<b>Polystyren</b>	10-20	Zobrazovací a DNA hybridizace	Stabilní a jednotná velikost částic v suspenzi
<b>Polymethyl methakrylát</b>	10-50	Separace DNA a amplifikace	Jednoduchost, může být aplikován v automatizačním systému, pro dosažení vysoké propustnosti detekce single nukleotid polymorphismů
<b>Polydipyrrol /Dicarbazol</b>	20-100	DNA hybridizace	Molekulární diverzita pro strojřerství
<b>Ethylcelulóza</b>	20-50	Těžba farmaceutických chemikálií	Lepší vstřebávání léku do okolních tkání
<b>Chitosin</b>	20-100	Tkáňové inženýrství, hypertermie	Přírodní kationtový lineární polymer, který je široce používán jako neviróv systém pro dodávání genů, biokompatibilní, hydrofilní, používá se v zemědělství, potravinářství, zdravotnictví, biotechnologie, textil, polymery a úprava vody
<b>Dextran (Sephadex)</b>	10-200	Izolace <i>E. coli</i> , podávání léků, zobrazovací	Zvýšení doby cirkulace v krevním oběhu, stabilizace koloidního roztoku
<b>Škrob</b>	10-20	Kontrastní a zobrazovací	Přírodní polymery, biokompatibilita
<b>Liposom</b>	50-200	Zobrazovací, kontrastní, cílená doprava léčiv, hypertermie	Dlouhá doba cirkulace
<b>Albumin</b>	100-200	Separace buněk	Magnetické značení a oddělování, nemá vliv na životaschopnost a proliferaci buňky
<b>Erytrocyty</b>	10-100	MRI zobrazování, dodávání léčiv	Zamezení rychlému odklizení retikuloendoteliálním systémem, dlouhý poločas v krevním oběhu

<b>Želatina</b>	500-100	Izolace genomové DNA, dodávání léčiva	Hydrofilní, biokompatibilní, přírodní polymer, zlepšuje účinnost obsahu účinné látky, rychlé, jednoduché, vhodný způsob pro extrakci DNA
-----------------	---------	--	--

Existuje mnoho dalších možností využití NPs. Například metody pro diagnostiku lidských patogenů jako jsou viry, bakterie, vyžadují nákladné a časově náročné postupy. Biospecifické ligandy (peptidy, nukleové kyseliny, proteiny – protilátky, enzymy) vázané na mikro či nanočásticích otevírají nový prostor medicíně diagnostice.

Pomocí přenosných mikročipů lab-on-a-chip se nové trendy začaly spojovat s termíny jako je rychlost analýzy (včasná detekce chorob), přesnost, automatizace, nízká cena, velmi malé množství vzorku a reagensů (Krukemeyer MG a kol., 2015). Výhodou je také kontinuální separace pro mnoho vzorků najednou, data v reálném čase, minimalizace ztrát či vzniku agregátů, jako tomu je u konvenčních technik (selektivní precipitace či chromatografie). Velmi hezky zpracované je review Salafi a kol., 2017 o pokrocích separace pomocí mikrofluidního systému.

Na základě specifické vazby ligandu a jeho biokompatibilního protějšku lze kromě detekce dopravovat *in vivo* léčiva, cytostatika pro cílenou terapii. Díky povrchové úpravě jsou částice schopny uniknout imunitnímu systému a opsonizaci (proces označení vedoucí k fagocytóze). Nejsou identifikována jako cizí tělesa (viz Tabulka 2). Takovéto MNPs s cytostatiky jsou pomocí magnetického pole zavedeny do nádorové tkáně, kde dojde k jejich zahuštění. Velká plocha povrchu nanočástic má významný potenciál k většímu počtu vazebných míst s nádorovými buňkami. Poté se může použít další varianta nanomagnetické léčby a to zahřívání postiženého místa (hypertermií) pomocí střídavého magnetického pole, kdy dojde k oslabení či zničení nádorových buněk a zvýšení toxicity chemoterapeutik. U mozkových nádorů lze k slibným výsledkům dojít v kombinaci s radioterapií (Giner-Caserea a kol., 2016; Krukemeyer MG a kol., 2015)

Velmi užitečná je například vazba antigenu Ag (angl. Antigen) a protilátky Ab (angl. Antibody). Ab mohou být značeny radioaktivními izotopy, enzym či fluorofory pro dosažení nízké meze detekce (Giner-Caserea a kol., 2016). Ab třídy IgG se mohou na magnetické částice vázat přes Fc část nebo přes thioly získané redukcí disulfidů v pantové oblasti těžkých řetězců (Conde a kol., 2014). Protein vázající imunoglobulin, jako je například Protein A (produkt grampozitivních koků), se může vysokoafinitně vázat

až se 4 molekulami IgG přes Fc část. Mezi nejsilnější nekovalentní imobilizace patří afinitní interakce avidin (stacionární fáze)-biotin (ligand). Na avidin se mohou vázat až 4 molekuly biotinylovaného IgG. Kromě této vazby se využívá interakce biotin – streptavidin, deglykosylovaný NeutrAvidin (CaptAvidin), (Kim a Herr, 2013), případně nitro – avidin a nitro-streptavidin (Morag a kol., 1996). Jedna z možností využití je vazba Ag bakterie s Ab navázanou na MNPs. Při působení magnetického pole se generuje teplo v okolí MNPs což způsobí bakteriální smrt. Stejně tomu může být u světelné absorpce MNPs pomocí laseru (Klaine a kol., 2008).

## 1.2 Testování cytotoxicity magnetických nano/mikročástic

Na SPIONs se nelze dívat jen z pohledu potenciálních benefitů, ale také jsou tu otázky ohledně bezpečnosti. V poslední době se studie o magnetických nanočásticích dostávají do průkopnických pozic. Proto je nezbytné klást důraz na křížovou mezioborovou komunikaci z hlediska bezpečnosti, prověřovat možné interakce, provádět studie toxických účinků, optimalizovat procesy. Hlavním cílem je minimalizace rizik pro životní prostředí i člověka.

Předběžné údaje lze shromažďovat pomocí relativně rychlých a jednoduchých testů *in vitro*. Dnes se jedná o alternativní predikci toxikologického chování, která snižuje četnost pokusů na zvířatech. Díky buněčným liniím ovlivněných MMPs a MNPs lze sledovat potenciální patologické chování buněk. Trh nabízí velké množství MNPs, které lze zkoumat na široké paletě buněk, jako jsou plicní, jaterní, ledvinové, kmenové, nervové, endotelové, rakovinné buňky. Dále na kožních fibroblastech a makrofázích. Je známo, že stupeň toxicity je různý v závislosti na typu buňky, použití holé částice či specificky potažené. Biologické experimenty, probíhající za přesně definovaných podmínek, obvykle trvají 24, 48 až 72 hodin. Pokud výsledky odhadují malou či žádnou toxicitu, je nezbytné aplikovat testy *in vivo* (Markides a kol., 2012).

Při testech akutní toxicity se zjišťují hodnoty, které způsobí 50 % úmrtí či 50 % inhibici exponované populace. Obvykle jsou normalizovány na hmotnost zkoumaného organismu nebo do prostředí, ve kterém je daný objekt zkoumán (Sterner, 2010):

**LD<sub>50</sub>** → letální dávka

**LC<sub>50</sub>** → letální koncentrace

**TD<sub>50</sub>** → toxická dávka

**TC<sub>50</sub>** → toxická koncentrace

**ID<sub>50</sub>** → inhibiční dávka

**IC<sub>50</sub>** → inhibiční koncentrace

### 1.2.1 Norma testovacích metod, zkoušek *in vitro*

Cytotoxicita je jednou z nejdůležitějších metod biologického hodnocení. Řídí se dle pravidel, která jsou v souladu s mezinárodním standardním provozním postupem. Aktuální platná norma ISO 10993-5:2009 popisuje testovací metody pro hodnocení *in vitro* cytotoxicity zdravotnických prostředků. Účelem je definování schéma, které vede k výběru nejvhodnějšího testování dle charakteru vzorku,

spíše než specifikace určité zkoušky. V normě jsou uvedeny tři kategorie zkoušek. **Zkouška extraktu** (schopnost živých buněk redukovat tetrazoliové soli), **zkouška přímým stykem** (nejcitlivější; buňky v jamce v kontaktu s MNPs, vizuální pozorování inkorporace barviva v živých buňkách, morfologie buněčné vrstvy) a **nepřímým stykem** (semikvantitativní; difúzí s agarem, obsahujícím živé obarvené buňky → cytotoxicky pozitivní → probělení). Hodnocení lze rozčlenit dle: posouzení poškození buněk morfologickými prostředky; měření poškozených buněk, měření růstu buněk; měření specifických aspektů buněčného metabolismu (ČSN EN ISO 10993-5:2009, 2010; Li a kol., 2015).

### 1.2.2 Testy cytotoxických metod *in vitro*

V závislosti na povaze zkoumané látky a charakteru celkové studie lze vybírat z většího množství testů. Pro rozsáhlost celého tématu následuje pouze jejich jednotlivý výčet. Důvodem je také fakt, že existuje mnoho publikací, které podrobně popisují principy, postupy a použití. Testy, jimiž v této práci byla hodnocena cytotoxicita studovaných magnetických mikročástic, jsou důkladně zpracovány v experimentální části.

Testy viability jsou založeny především na **integritě buněčné membrány**. Využívají se metody s trypanovou modří, enzymem LDH (laktátdehydrogenáza), PI (propidium iodid). Alternativou je stanovení **mitochondriální aktivity** např. pomocí testů XTT, MTT, MTS, WST-1, WST-8 redukující tetrazoliové soli na barevný formazan (kolorimetrie). Dále detekce **membránového potenciálu** pomocí fluorescence či bioluminiscenční detekce ATP. **Funkci lyzozomů** lze zjistit pomocí levné a rychlé metody s použitím lipofilního barviva neutrální červeně (Minaeva a kol., 2017). Proliferační testy měřením celkových proteinů pomocí metody Bradfordové (Coomassie Brilliant blue) či fluorescenčního proteinového barviva sulforhodaminu B. Expresí specifických proteinů. Obsahem a syntézou nukleových kyselin díky začlenění nukleosidového analogu thymidinu BrdU (5-brom-2-deoxyuridin), EdU (5-etynyl-2-deoxyuridin) či inkorporace <sup>3</sup>H thymidinu do DNA buněk (fluorescence) (Johnson a Spence, 2010).

Mezi analytické metody a techniky patří velmi často používána průtoková cytometrie. Na základě třídění (diferenciace) poskytuje kvalitativní i kvantitativní citlivé,

specifické a reprodukovatelné informace. Při cytotoxických testech kovových SPIONs se uplatňují AAS (angl. Atomic Absorption Spectroscopy), FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy), MPS (angl. Magnetic particle spectroscopy), UVS (angl. Ultraviolet Spectrophotometry) (Friedrich a kol., 2015), MP-AES (angl. Microwave Plasma - Atomic Emission Spectrometry) (Poller a kol., 2017), ICP-MS (angl. Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry), X-ray difrakční analýza (Klaine a kol., 2008).

V současné době se výzkumy a experimenty monitorují pomocí přelomového systému xCELLigence, který analyzuje dynamické procesy buněčných linií v reálném čase. Principem je detekce dynamické impedance s pomocí mikroelektronických čidel, které jsou integrované do dna detekční desky s buňkami. Měří se odpor adherentních buněk přilnutých k povrchu elektrod (na dno jamek). Elektrická impedance se zvyšuje s počtem přisedlých buněk. Pokud buňky nejsou přítomny či volně plavou, je hodnota nulová. Relativní změny elektrické impedance jsou zaznamenávány jako cell index (CI). Vyhodnocení CI poskytne aktuální informace o stavu cytotoxicity, proliferace, morfologii, diferenciaci buněk (Li a kol., 2015)

Je třeba poznamenat, že se občas vyskytují komplikace spojené s interakcí MNPs a samotných buněk. Problémem může být i sedimentace MNPs, která vede ke zvýšení koncentrace na povrchu buňky. Vliv na výsledky má také samotné dávkování či časové prodlevy odečtů. Interpretace *in vitro* testů nám bohužel řekne jen velmi málo o mechanismu toxicity či důvodu buněčné smrti. Je třeba zjistit více informací o imunologické, neurologické, kardiovaskulární, reprodukční a vývojové reakci. Navíc lze v odborné literatuře nalézt jen málo souhrnných zpráv (Markides a kol., 2012).

### 1.2.3 Průkaz magnetických nano/mikročástic uvnitř buněk

Částice lze detekovat a kvantifikovat pomocí světelné mikroskopie s použitím pruské modře  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)]_3$ , která se váže na částice železa. Další možností je fluorescenční mikroskopie s modifikací SPIONs kontrastním fluoroforem (Cordova a kol., 2014), např. rhodaminem (Umashankar a kol., 2016) či CdTe. Konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM) s velmi vysokým rozlišením umožňuje pozorování fluorescenčně zviditelněných částic ve 2D a 3D rovině. Transmisní



elektronová mikroskopie (TEM) pracuje s urychlenými elektrony procházejícími vzorkem s MNPs. Nevyužívá se viditelného světla. Pracuje s trajektorií elektronového paprsku v magnetickém poli. Principem jsou elektromagnetické či elektrostatické čočky (Zhou a kol., 2017). U skenovací; rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) se detekuje sekundární signál odražených sekundárních elektronů či charakteristické rentgenové záření (Cabrera a kol., 2017).

#### 1.2.4 *In vivo* testování magnetických nano/mikročásteček

Pro studium biologických účinků jsou rozhodující výsledky testů na příslušných zvířecích modelech. To sebou bohužel přináší etické problémy, časově náročnější experimenty a vyšší výdaje. Malá zvířata jsou průběžně monitorována. Výhodou je sledování dlouhodobých účinků, šíření MNPs organismem, jejich adsorpce, akumulace a vylučování z organismu.

Mezi jednu z důležitých podmínek patří kompatibilita MNPs s tělními tekutinami. Mohlo by dojít k hemolýze, koagulaci se vznikem krevních sraženin v důsledku adsorpce nebo aktivace biomolekul (Markides a kol., 2012). Před klinickým použitím se dělá hemolyzační test (zda nejsou MNPs toxické pro erytrocyty), měří se protrombinový čas, aktivovaný čas srážení, aktivovaný parciální tromboplastinový čas, dále chemokiny a prozánětlivé cytokiny (např. IL-8; ukazatel potenciálního oxidačního stresu). Dále transkripční faktory analýzou genové exprese. Validační testy zahrnují histologii z místa vpichu, metabolicky aktivních míst jako jsou ledviny, játra, slinivka, mozek. Pro průkaz přítomnosti  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  lze řezy obarvit pruskou modří (Perlsova reakce). Výsledkem jsou modré sraženiny v makrofágových buňkách zvaných siderofágy. Zde se železo uložilo ve formě hemosiderinu (Markides a kol., 2012).

Kaspáza-3 se řadí mezi klíčové apoptické faktory (Švandová, 2014). Funguje jako likvidační enzym při programované buněčné smrti u poškozených či napadených buněk. Proto se měří její aktivita (Mokrý, 2010). U klinických zkoušek na lidech je otázkou, zda organismus negativně ovlivňuje samotná částice nebo v kombinaci s účinnou terapeutickou látkou. Pelclová a kol. (2016) se zabývali expozicí aerosolu NPs  $Fe_2O_3$  u 14 pracovníků, kteří mu byli přímo vystaveni po dobu  $10 \pm 4$  let. Hodnotili biomarkery oxidačního stresu. Ty byly opravdu přítomny ve vydechovaném kondenzačním dechu.

Jednalo se o markery oxidace lipidů, nukleových kyselin, proteinů. Nicméně usoudili, že k systémovým účinkům na lidské tělo, působením NPs Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, nedocházelo. Vycházeli z výsledků analýzy vzorků moči. Ty nenasvědčovaly žádné abnormality oproti kontrolní skupině (14 osob). Nebyly zaznamenány žádné rozdíly (Pelclová a kol., 2016). Proto si medicína a výzkumní pracovníci dožadují rozsáhlého, komplexního vyhodnocení. To je však mnohdy obtížné kauzálně vyhodnotit (souvislost jevů; analýza problémů příčiny a důsledku).

## 1.3 Vliv nano/mikročástic na životní prostředí

### 1.3.1 Potenciální negativní dopad nano/mikročástic na životní prostředí

Zvyšující se rozsah aplikací MMPs a MNPs sebou přináší obavy ohledně možných negativních účinků na lidské zdraví a environmentální sféru. Progresivní využití těchto látek vyvolává čím dál větší otázku ohledně nevyhnutelného vlivu na ekosystém a uvolňování do vodního prostředí během jejich životního cyklu. Velmi přehledně je zpracovaný článek Bystrzejewska-Piotrowska a kol. (2009), který se zabývá tématem nanoodpadu, problémy s jeho nekontrolovatelným uvolňováním do životního prostředí, případným ošetřením nebo deaktivací nanočástic.

Potenciální nebezpečí se spojuje s pronikáním do půdy, sedimentů, mikrobiálních kultur, bioakumulace v živých organismech. Zmíněné mikrobiální komunity hrají důležitou roli při rozpadu organické hmoty, degradaci uhlíku v půdě, recyklaci, zpracování dusíku, regulaci, mineralizaci živin, vyčištění prostředí od kontaminujících látek pomocí produkujících enzymů (bioremeditace) nebo v symbiotickém spojení s několika suchozemskými rostlinami. Harmonie ekosystému může být tak narušena. Je třeba zdůraznit, že doposud velmi zaostává tempo studií rizik oproti růstu nanotechnologického průmyslu. Ať už se jedná o nedostupnost standardních testů, problémy s vyhodnocením nanotoxicity, interpretací dat či konfrontace s předpisy životního prostředí (Hedge a kol., 2016). Opakující se pozorování v různých publikacích naznačuje, že rozhodující toxikologické determinanty pro buněčnou odezvu jsou zejména koncentrace NPs, dále přispívá velikost, povrchové funkční skupiny, případně oxidační stav Fe (Markides a kol., 2012; Singh a kol., 2010).

V životním prostředí jsou odpadní MNPs ovlivňovány různými faktory, při kterých dochází k jejich dynamické transformaci. Mohou sorbovat s organickou hmotou, biomasou, agregovat do velikostí  $>1 \mu\text{m}$ , kdy je jejich transport ovlivněn sedimentací. U některých NPs byla pozorována disoluce. Cílená biologická dostupnost MNPs se může změnit díky vytvoření sloučenin s jinými látkami. Vzájemná interakce s biostrukturami může ovlivnit povrchové charakteristiky částic. Prostřednictvím pasivních či aktivních mechanismů mohou buňky MNPs vstřebávat (Joo a Zhao, 2017). Hedge a kol. (2017) uvádí, že po modelové expozici MNPs, byla koncentrace MNPs vyšší v půdě

než ve vzduchu či vodě. Ve vodním prostředí hrají roli hydrofobní interakce (Hedge a kol., 2016). Mobilita u MNPs v heterogenních systémech je seřazena následovně:  $\text{TiO}_2 > \text{CuO} > \text{ZnO} > \text{Fe}_3\text{O}_4$ . Ovlivňujícími mechanismy jsou: intercepce (zadržování), rozdílná difúze, gravitační depozice (spad; zachytávání na zemském povrchu), (Joo a Zhao, 2017).

Sharma a kol. (2015) popisují přirozeně se vyskytující NPs v přírodě, za jakých podmínek jsou stabilní a studují ekotoxicitu vzhledem k potravinovému řetězci. Zkoumanými objekty jsou bakterie, rostliny, vodní a suchozemské organismy. Zaměřují se zejména na AgNPs. Diskutují o tom, zda jsou NPs potažené přírodními organickými látkami méně toxické než synteticky vyrobené (Sharma a kol., 2015). Lei a kol. (2016) uvádí, že inhibice růstu zelené řasy (*Chlorella pyrenoidosa*) se výrazně zvyšovala s klesající velikostí MNPs magnetitu a maghemitu. Podobně tomu je i u NPs CuO,  $\text{TiO}_2$  a ZnO (Lei a kol., 2016). V kapitole 1.4.5. jsou blíže uvedeny vlivy modifikovaných MNPs na vybrané buněčné linie a organismy.

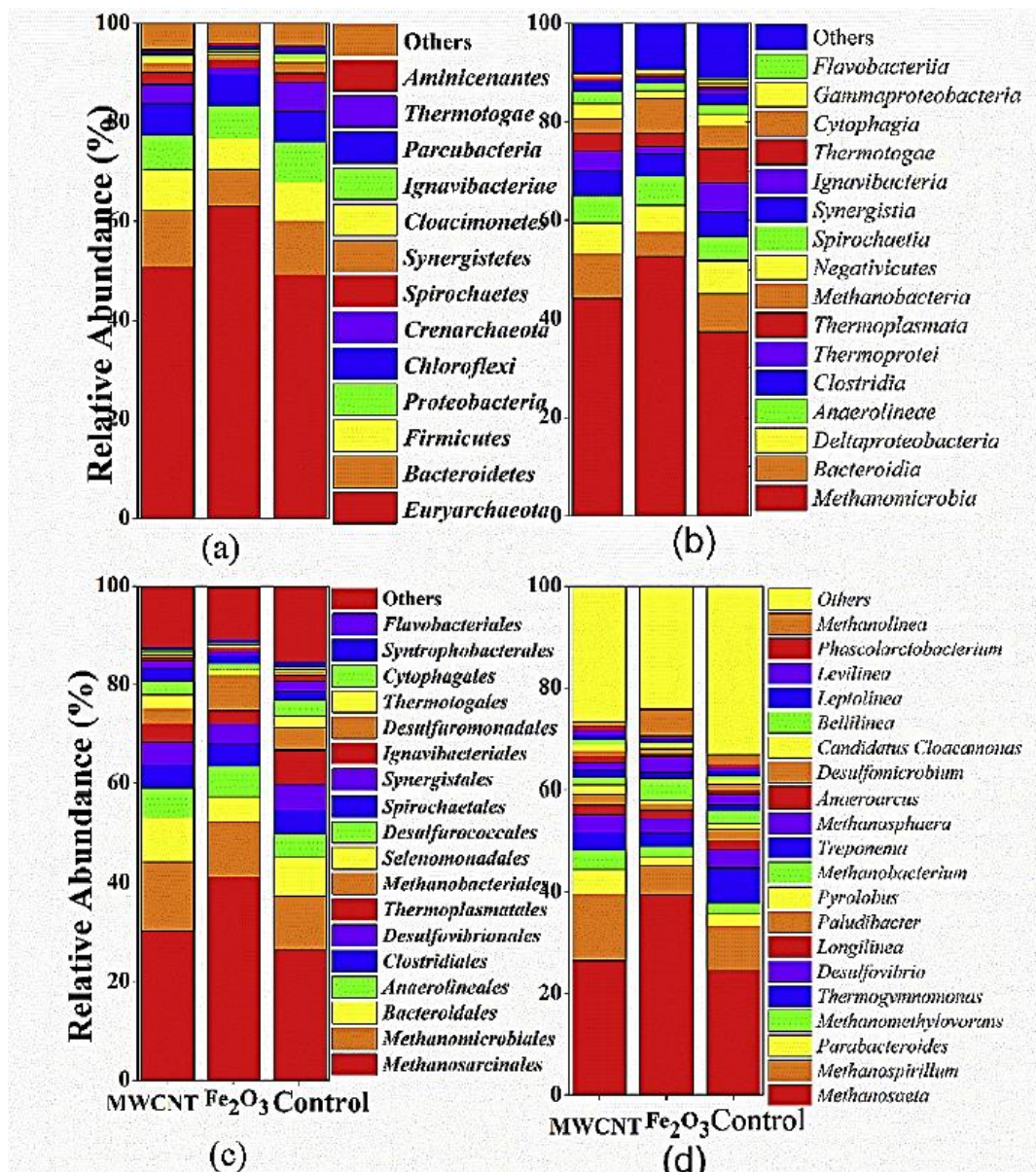
### 1.3.2 Možnosti využití cytotoxického účinku nano/mikročástic v životním prostředí

Využití toxicity MNPs a MNPs v životním prostředí může být v určitém pohledu člověku prospěšné. Mnoho vydaných studií obecně poukazuje na nízký či dokonce žádný cytotoxický účinek SPIONs. Což by mohl potvrdovat fakt, že se železné SPIONs aplikují i v biomedicině (Valdiglesias a kol., 2016). Velmi perspektivní výzvou je tedy studium jejich potenciálu napříč obory. Jedním takovým příkladem jsou komáři, jež patří mezi vektory, přenášející závažná onemocnění. Ovlivňují zdraví stovek milionů lidí v různých regionech světa. Od malárie, horečky dengue, žluté zimnice, lymfatické filariázy, japonské encefalitidy, viru Zika a dalších. Jedná se tedy o globální hrozbu (Vadivalagan a kol., 2017). V boji proti zmíněným vektorům by právě SPIONs FeO a  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  mohly předčít insekticidy (neustále se zvyšující odolnost) a výrobky nešetřné k životnímu prostředí. Výhodou jsou menší náklady a eliminace použití vysoce toxických chemikálií. Nedávná studie zjistila vysoký cidní efekt SPIONs na larvy a kukly komára *Culex quinquefasciatus* (vektor). Pozitivní bylo, že vliv SPIONs u larev malé sladkovodní ryby *Poecilia reticulata* byl pouze malý a necílený. Během jednoho týdne expozice, nebyla detekována toxicita (Murugan a kol., 2017). V jiné studii kdy předmětem byl také

druh malé ryby *Danio rerio* zjistili, že nenasycený magnetit indukoval vývojovou toxicitu v raných stádiích života a embryonální malformace ( $LC_{50} = 53,35$  mg/l). Naopak obalené MNPs magnetitu (oxidem křemičitým) po 15 denní expozici nevyvolávaly žádnou toxicitu u larev a dospělých jedinců *Danio rerio*. Ani nedocházelo k poškození buněk či tkání. Detoxikační procesy se neaktivovaly. Studie ukazují, že organismy v časných stádiích embryonálního vývoje jsou senzitivnější na toxikologické účinky (Zhu a kol., 2012; Valdiglesias a kol., 2016).

Mikrobiální organismy hrají zásadní trávící roli při čištění průmyslové odpadní vody jako např. vody, vzniklé při zpracování cukrové řepy. Dochází k degradaci organické látky v anaerobním prostředí na  $CH_4$  a  $CO_2$ . Uplatňuje se přímý elektronový přenos mezi systémem donorů  $e^-$  a bakteriálními akceptory  $e^-$ . Ukázalo se, že tento proces by mohly podpořit vodivé materiály jako např. NPs oxidů železa. Hypotéza byla testována s  $c = 750$  mg/l NPs. Mimo to se testovaly vícenásobné uhlíkové nanotrubičky (MWCNTs) o  $c = 1500$  mg/l. Žádné nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu nebyly shledány. K cytotoxicitě buněk nedocházelo. Vzhledem k anaerobnímu prostředí, nedocházelo k oxidačnímu stresu, a tím nemohly vzniknout reaktivní formy kyslíku. Čistota použitých NPs a MWCNTs byla  $> 97\%$ , takže ani případné zbytkové kovové nečistoty, katalyzující toxicitu, neměly vliv na účinek. Reaktory se zkoumaným materiálem hustě obalovala polymerní substance. Jednalo se o ochrannou funkci. Membrána buněk tak nebyla NPs a MWCNTs proděravěna a též nedocházelo k přímé agregaci membrán. K zobrazení byla použita SEM a CLSM. Výsledky ukazují, že díky přítomnosti  $Fe_2O_3$  NPs; MWCNTs se zefektivnil fermentační proces. Zvýšila se produkce bioplynu a  $CH_4$ . Experimentální doba pozorování byla 74 dní.

Na Obrázku 7 lze vidět složení anaerobního kalu vystaveného  $Fe_2O_3$  NPs a MWCNTs (Ambuchi a kol., 2017).



**Obrázek 7:** Složení anaerobního kalu vystaveného Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> MNPs a MWCNTs. Procentuální vyjádření počtu jedinců v relaci k ostatním. První sloupec → vliv MWCNTs, druhý sloupec → vliv MNPs Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, třetí sloupec → kontrola bez částic, čtvrtý sloupec → fylogenetická reprezentace s hojností výskytu nejméně 1 %, seskupení sloupců a) kmen, b) třída, c) řád, d) rod, převzato dle (Ambuchi a kol., 2017).

MWCNTs se totiž také široce využívají v oblasti podpory katalýzy při degradaci kontaminantů ve vodě. Díky rychlejší kinetice vedou ke zlepšení účinnosti procesu (Wang a kol., 2017). Ukazuje se, že takovéto uhlíkaté nanomembrány mohou mít antimikrobiálně-adhezivní vlastnosti. Snížená adheze bakterií má pozitivní vliv na počet viabilních buněk. Byla shledána vyšší odolnost vůči tvorbě biofilmů oproti jiným membránám, jako např. polysulfonové ultrafiltrační membrány. Zkoumáno na *Pseudomonas aeruginosa*, jež je primárně odpovědná za membránové znečištění v odpadních vodách (Lee a kol., 2015). Rahman a kol. (2017) zkoumali dvě myší linie,

kteře byly po dobu 90 dnů chronicky exponovány MWCNTs. Avšak znepokojující výsledky poukázaly na silné a chronické záněty plic a fibrotizující léze se zvýšenou expresí p53 v této oblasti. Sice se neprokázalo, že dochází k poškození DNA či zvýšení mutantní frekvence lacZ oproti kontrole, ale analýza genové exprese odhalila řadu poruch. Jednalo se o změny exprese stovek genů, které mohou indukovat prekarcinogenní dráhy. Šlo zejména o procesy udržování buněčné homeostázy, vylučování volných radikálů, buněčná proliferace, karcinogenní transformace (Rahman a kol., 2017).

### 1.3.3 Vychytávání těžkých kovů ze znečištěných vod

Díky unikátní magnetické vlastnosti a adsorpční kapacitě mohou být  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs využity k vychytávání těžkých kovů při čištění podzemních či odpadních vod. Oxidy železa mohou být přitom použity z kovových odpadů. K omezení případných škodlivých účinků dochází potažením oxidem křemičitým či chitosanem. Jedná se o nenákladnou technologii odstraňující kontaminaci  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (Gill a kol., 2017).

Při použití amino - chitosanového povlaku a dávce NPs 500 mg/l je při pH 3 účinnost odstranění Cr téměř 100 % (při  $c_{\text{Cr}} = 20$  mg/l). Se zvyšujícím se pH klesá účinnost odstraňování. Dále se ovlivňuje povrchový náboj NPs, ale také oxidační stav těžkých kovů (Shukla a kol., 2017). Efektivní odstranění  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ . Výhodou je velké rozmezí koncentrace polutantů a hodnot pH prostředí (pH 6-10). Např. 200 mg/l granulí oxidu železa zachytí 0,15 mg/l  $\text{Na}_3\text{AsO}_4$  ( $\text{As}^{5+}$ ) (Parida a kol., 2017). Rajput a kol. (2017) uvádí, že při optimálních dávce 200 mg/l adsorbují NPs maghemitu téměř 74 %  $\text{Pb}^{2+}$  (pH 5, 25 °C). Adsorpce  $\text{Cu}^{2+}$  byla sice stejně rychlá, ale adsorpční kapacita při 100 mg/l NPs byla 28 %. Zvýšením dávky adsorbentu již nevzrostlo procento odstranění (Rajput a kol., 2017).

Jiná studie se zabývala korelační závislostí stupně aminace potažených SPIONs vzhledem k adsorpční kapacitě iontů  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ . Se zvyšujícím se stupněm aminace se zvyšovala adsorpce těžkých kovů. Pro úspěšnost použití je důležité znát kinetiku, termodynamiku ve spojení s variacemi povrchu (Lin a kol., 2017). Dalším, nejen pro lidské zdraví nebezpečným prvkem, je rtuť. Díky bioakumulaci může i v těch nejnižších koncentracích způsobit závažné zdravotní potíže. K efektivnímu odstranění  $\text{Hg}^{2+}$  z kontaminovaných vod dochází pomocí NPs oxidů železa během 4 minut s adsorpcí

43,47 %. Pro stejnou koncentraci  $\text{Hg}^{2+}$  lze použít stejné NPs, ale modifikované 2-merkaptobenzothiazolem. V tomto případě je účinnost 98,6 % (Parham a kol., 2012).

## 1.4 Chování nano/mikročástic v biologických systémech

### 1.4.1 Možnosti vstupu nano/mikročástic do organismu

MNPs překonávají biologickou, fyziologickou a buněčnou bariéru. Jejich chování v živém organismu *in vivo* závisí na velikosti použité NPs, viz obrázek 8 B). Dále na tvaru, povrchových a magnetických vlastnostech (Mohammed a kol., 2016). U toxicity NPs je jedním z nejdůležitějších parametrů rozsah působení na buňky zvířat a lidí nad určitou úroveň (dávku). Dále též distribuce, perzistence a clearance (očistění od této látky). V současnosti v celém světě probíhají výzkumy, jež se snaží prohloubit dosavadní znalosti o způsobu difúze do lidského těla, vychytávání buňkami a tkáněmi, následná distribuce, perzistence a clearance v rámci organismu (Sajid a kol., 2014). Příklad časové závislosti působení MNPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  na distribuci v orgánech je znázorněn na obrázku 8 A).

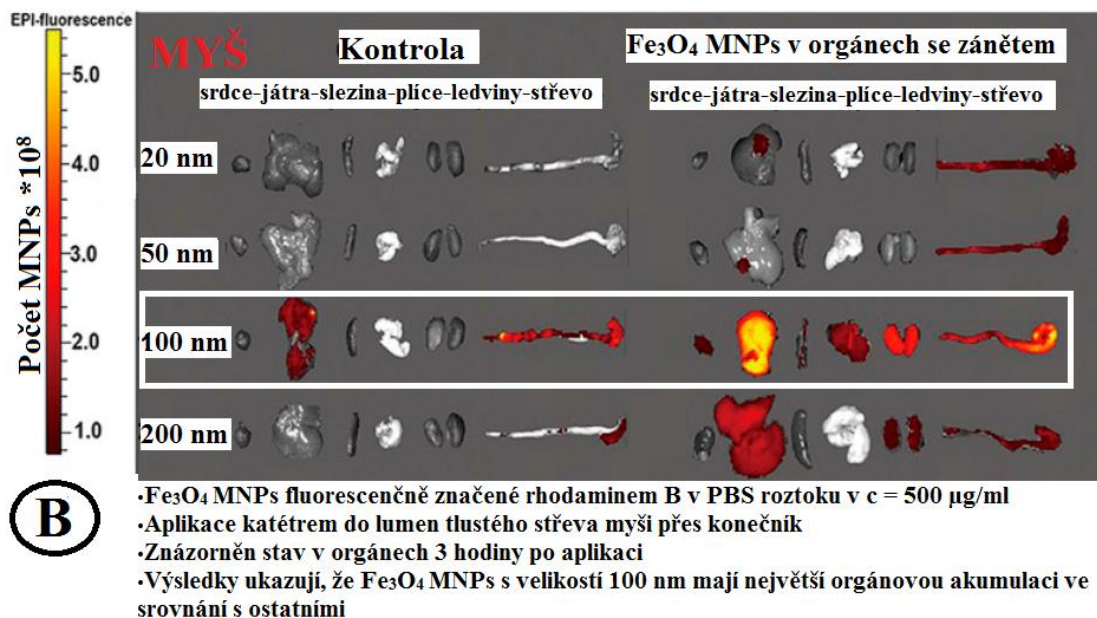
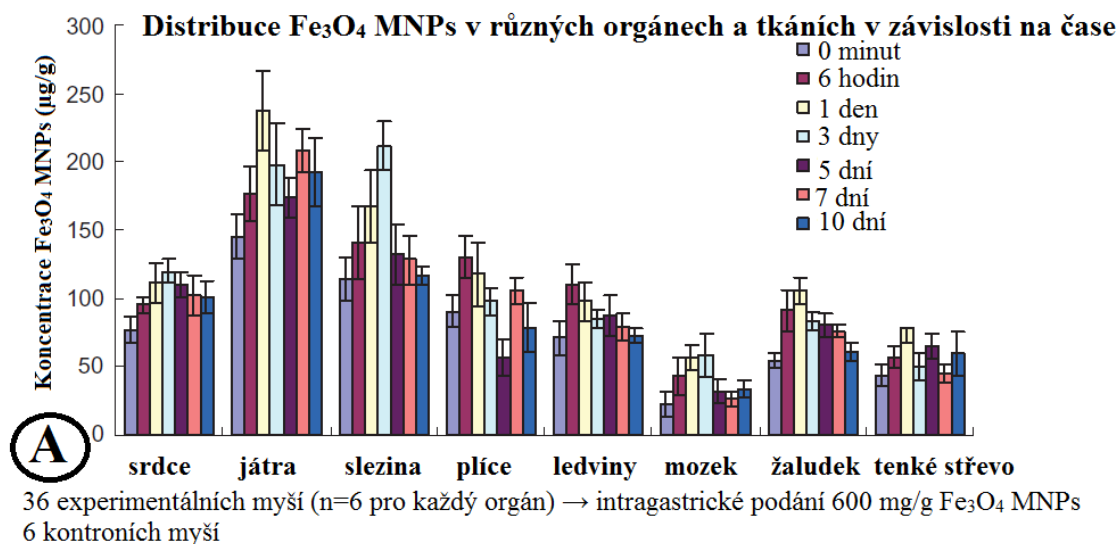
Mezi cesty vstupu patří vdechnutí respiračním systémem (inhalace). Nejčastěji k tomu dochází na pracovištích ve formě aerosolu. Pomocí elektrostatických sil a gravitace jsou nesené z horních částí dýchacích cest do dolních. Sedimentace ovlivňuje NPs  $> 500$  nm a difúze  $< 500$  nm. Účinnost eliminace částic směrem z alveolární oblasti k hrtanu je jen asi třetinová. Jde o velmi pomalý transport. Zbylé dvě třetiny se hromadí, pokud nejsou biologicky či jinými mechanismy odbourány. Při alveolární depozici NPs, se aktivují chemotaktické procesy, jež spouštějí systém komplementární kaskády. Obecně vlákna  $> 20$   $\mu\text{m}$  jsou obtížně čitelná makrofágy (Yah a kol., 2012; Dohnalová a Dohnal, 2015; Borm a Kreyling, 2004). Brayner, 2008 ve článku uvádí, že u částic  $> 100$  nm již není fagocytóza tak účinná jako u menších částic (Brayner, 2008). Dva dny po aerosolové expozici MNPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (1,3  $\mu\text{m}$ ) bylo u zdravých dobrovolníků odstraněno pouze 10 % částic. Poločas clearance u mladých nekuřáků  $124 \pm 66$  dní a kuřáků  $220 \pm 74$  dní (Möller a kol., 2001). Translokací přes alveolární epitel se částice dostávají do krevního oběhu k jiným orgánům. 14 zdravých dobrovolníků bylo po dobu 2 hod exponováno AgNPs (3,8 nm, aglomeráty 18,7 nm). Po 15 minutách byly AgNPs detekovány v krevním řečišti u 25 % zúčastněných. Do 24 hod již u 86 % a 3 měsíce od expozice byly přítomny u 50 % jedinců v krvi a u všech v moči (Miller a kol., 2017).



Vstup NPs do gastrointestinálního traktu (GIT) probíhá požitím (digescí), ale i cestou mukociliární clearance. Což je již nastíněný proces u vstupu NPs aspirací. Při němž se průdušky a řasinkový epitel snaží peristaltickým pohybem odstranit částice z dolních cest dýchacích směrem nahoru k hrtanu. Sledované NPs mohou procházet Peyerovými pláty se shluky lymfoidních folikulů tenkého střeva, tedy thymodependentním systémem, tvořícím hlavní složku slizniční imunity (Yah a kol., 2012).  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNPs přecházejí dále ze střeva přes lymfatické uzliny do jater a sleziny. Viz níže obrázek 6 A). Vyšší koncentrace oproti kontrolním skupinám lze následně také nalézt v mozkové tkáni. Což naznačuje schopnost MNPs proniknout hematoencefalickou bariérou (Wang a kol., 2010).

Lidská kůže je účinnou bariérou oproti dýchací či trávicí soustavě. Geneticky podmíněná ochrana je v různých variacích, díky epidermálnímu diferenciacímu komplexu na chromozomu 1q21 (Filipová a kol., 2012). Přes oslabenou kůži lehce pronikají částice 0,5 – 7  $\mu\text{m}$  (Yah a kol., 2012). Jinak se v průměru jedná o mechanický průnik částic menších než 1  $\mu\text{m}$ . Dochází k intracelulární trans-epidermální penetraci, difúzi přes kožní póry, potní žlázy či vlasové folikuly. Distribuce pokračuje lymfatickými cestami s uzlinami dále do organismu. Hydrofobicita kůže může být ovlivněna přítomností různých aktivních složek či organických látek, jež umožní proniknutí do bazálních buněk epidermis (Sajid a kol., 2014). Dále rychlejší průnik způsobuje přítomnost kationických a neutrálních částic, vliv UV záření, teploty, vypnutí či masáž pokožky, otevřené rány, mikroionizace ultrazvukem (sonoforézou), pulzní magnetoterapie (Dohnalová a Dohnal, 2015).

Průchod NPs přes spojivkový epitel patří do výčtu možných cest vstupu. Injekcí do rohovky zdravé myši, byly částice detekovány v cytoplazmě keratinocytů její rohovky. Za účelem testování se také využívá subkutánní či intravenózní podání (Yah a kol., 2012).  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNPs, potažené kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové (100 – 300 nm) se v přítomnosti magnetického pole dokáží dostat až do vnitřního ucha; hlemýždě (*cochlea*). Totéž lze využít k modulaci u dlouhodobého kontrolovaného podávání léků touto cestou (Swan a kol., 2008). Většina studií vyplývá z výzkumů akutní toxicity, cytotoxicity, genotoxicity, neurotoxicity, imunotoxicity či vlivů na reprodukci. Dlouhodobé potenciální negativní důsledky, epidemiologické studie a jasné přehledy bezpečnosti téměř neexistují (Valdiglesias a kol., 2016; Borm a Kreyling, 2004; Dohnalová a Dohnal, 2015).



**Obrázek 8:** Orgánová distribuce Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNPs v závislosti na čase A) a velikosti částic B), převzato a upraveno dle (Wang a kol., 2010; Zhou G. a kol., 2017)

#### 1.4.2 Vstup nanočástic do buňky

V průběhu prvních 6 hodin, kdy buňka pohltí NPs, se zintenzivní tvorba nitrobuňčných přenašečů (ATP, vápník, ROS → reaktivní formy kyslíku, viz podkapitola 1.4.3). Při přechodu NPs do lysozomů a mitochondrií v časech 6 až 9 hodin, dochází mimo jiné k deficitu ATP. Tím je ovlivněn potenciál na mitochondriální membráně, který je velmi citlivý na nedostatek energie či změny v koncentracích iontů v buňce nebo vně.

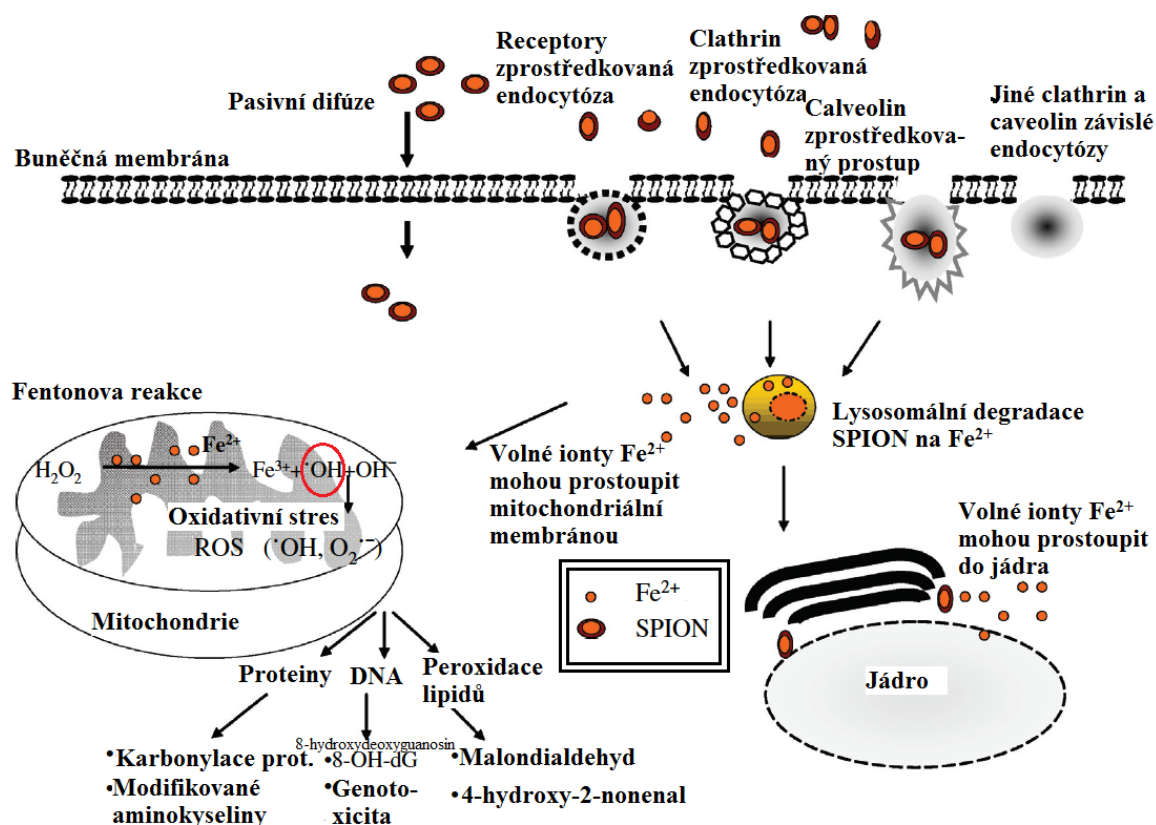
Následuje časový úsek 9 až 24 hodin, kdy se spouští sled řízených procesů, usilujících o apoptózu, aby se napadená poškozená buňka (např. fragmentace DNA) nemohla dále množit. Buněčným procesem autofagie lze degradovat proteinové agregáty nebo celé organely. Za určitých okolností je schopná aktivovat i autodestrukci buňky. Výjimkou není ani vznik nekrózy (Filipová a kol., 2012).

### **Prostup buněčnou membránou s rizikem poškození**

Některé NPs se přilepí na buněčný povrch bakterie, včlení se do membrány a ohrožují tak její integritu a funkci. Jsou to například silikonové částice nebo deriváty fulerenu. Karboxyfuleren proděraví membránu gram pozitivních bakterií. Výsledkem je buněčná smrt. Zlaté částice zase membránu *Escherichia coli* při testech oslabily a způsobily jí tepelný šok (Klaine a kol., 2008). Fluorescenčně značené polystyrenové, zlaté a nanočástice oxidu titaničitého nemusí vstupovat do buňky pomocí receptorů, fagocytů, ale postačí prostá pasivní difúze. Dojde tím k vytvoření dočasných pórů v cytoplazmatické membráně. Možné prostupy NPs přes membránu jsou zobrazeny na Obrázku 7. Svůj podíl na tom mají adhezivní interakce, elektrostatické, Van der Waalsovy síly nebo stericke parametry. Pomocí sofistikovaných mikroskopických vizualizací se takovýto vstup membránou prokázal například u epiteliálních buněk A549 či u červených krvinek. (Rothen-Rustishauser a kol., 2007). Jestliže NP takto vstoupí do buňky, buňka ji stejným mechanismem v nezměněné podobě může vyloučit na opačné či stejné straně membrány → transcytóza. Generování ROS NPs způsobuje oxidační degradaci dvojných vazeb na hydrofobních koncích fosfolipidové membrány → peroxidaci lipidů. Což následně spouští tvorbu dalších volných radikálů.

#### **1.4.3 Mechanismus toxicity magnetických nano/mikročásteček**

Nanočástice mohou, jak již bylo zmíněno, porušit membránu buňky, vyvolat buněčnou smrt, způsobit oxidaci bílkovin, genotoxicitu, interagují s respiračním řetězcem, způsobí lokální vyčerpání protonů a podílejí se na vzniku ROS. Úroveň toxicity se liší u G+ a G- bakterií díky odlišnému složení a náboji buněčné stěny (Hedge a kol., 2016).



**Obrázek 9** Vstup SPIONs do buňky, několik možných mechanismů toxicity, převzato a upraveno dle (Singh a kol., 2010)

Potenciálně může být tedy toxicita porovnáována dle indukce oxidačního stresu. Magnetit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> má při stejné velikosti prokazatelně větší toxicitu než maghemit γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Následuje vysvětlení, proč tomu tak je. Jak je známo, magnetit [Fe<sup>3+</sup>]<sub>Td</sub>[Fe<sup>3+</sup>+Fe<sup>2+</sup>]<sub>Oh</sub>O<sub>4</sub> je směsí FeO a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Tyto oxidy železa nejsou příliš stabilní. Snadno se působením vzduchu, světla, vlhkosti, podrobují oxidaci z Fe<sup>2+</sup> (magnetit) na Fe<sup>3+</sup> za vzniku maghemitu. Takto přes Fentonovu reakci vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS). Výsledkem je vysoce toxický hydroxylový radikál ·OH a superoxidový radikál O<sub>2</sub><sup>·-</sup> viz znázornění na Obrázku 9. Tyto jevy způsobují peroxidaci lipidů, karboxylaci proteinů, proteolýzu přes ubiquitin cyklus, a tím poškození DNA, buněk, tkání. Dochází k antioxidační odpovědi systému pro udržení homeostázy, k aktivaci mediátorů zánětu, cytokinů až k následné apoptóze (programované buněčné smrti). U buněk lidského alveolárního adenokarcinomu plic A549 opravdu došlo k vyššímu výskytu oxidačních DNA lézí. Kupodivu v porovnání s maghemitem se nevyskytla snížená viabilita vzhledem k oxidačnímu potenciálu (Singh a kol., 2010; Taze a kol., 2016). Lei a kol. (2016) uvádí, že Fe<sup>0</sup> je obecně považováno za nízkotoxické, protože snadno oxiduje do forem, jež jsou

v přírodě přirozené. Při koncentraci nanočástice  $\text{Fe}^0$  10 mg/ml (velikosti 20 – 30 nm) nebyla pozorována žádná inhibice růstu u *Aspergillus versicolor*, pouze 44 % inhibice u koncentrace 1000  $\mu\text{g/ml}$  (velikosti 40 – 60 nm) u *Saccharomyces cerevisiae*. Jak již bylo zmíněno výše, s nižším oxidačním číslem železa se toxicita zvyšovala (tj. železo může oxidovat za vzniku ROS). Nanočástice  $\text{Fe}^0$  byly dokonce tak reaktivní, že se dalo využít rozpuštěného kyslíku na produkci ROS přes Fentonovu reakci a vyvolat tak oxidační škody na buňkách (Lei a kol., 2016). Ve srovnání tzv. „čerstvé“ nanočástice  $\text{Fe}^0$  a 11 měsíců staré  $\text{Fe}^0$  nanočástice (časová prodleva u povrchových vod), se díky oxidaci materiálu snížila neurotoxicita (Phenrat a kol., 2009). Což by mohlo znamenat, že svou oxidací bude konat redukční činnost, čímž se současně sníží oxidační poškození buněk. Mimo jiné se také sníží magnetický moment a tím se inhibuje homo(hetero) agregace NPs. Heteroaglomerace a fyzikální interakce totiž přispívají k nanotoxicitě. Závěrem je nutné říci, že si i mnohdy protichůdné výsledky nadále žádají další komplexní bádání (Lei a kol., 2016).

#### 1.4.4 Chování a interakce nano/mikročásteč při *in vitro* a *in vivo* podmínkách

##### **Interakce s proteiny**

Vysoká koncentrace proteinů krevní plazmy (> 300 mg/ml) *in vivo*, způsobí rychlou absorpci NPs. Proteiny je váží s různou afinitou a dochází k výměně nízkoafinitních za vysokoafinitní proteiny. Například apolipoprotein A se pojí mnohem slabší vazbou než fibrinogen či albumin. Takto vytvořený proteinový obal okolo NPs se nazývá korona. Ta může ovlivnit osud NPs. Mění složení, konformaci, strukturu ovlivňující lokalizaci a disperzivitou. S tím souvisí retence NPs v organismu v řádech  $\mu\text{s}$  až po hodiny. V různých biologických tekutinách vznikají podstatně odlišné korony. U proteinů dochází k narušení jejich struktury také působením oxidačního stresu. Nejvíce citlivé jsou buněčné a transportní proteiny obsahující aminokyseliny cystein a methionin. Dvojně vazby aromatických AMK specificky reagují s  $\cdot\text{OH}$  (Filipová a kol., 2012).

##### **Agregace**

Jak přehledně uvádí Szekeres a kol. (2017), mezi jednu z potenciálních komplikací patří i agregace. Na částici suspendované v kapalině vzniká Sternova a difúzní elektrická dvojvrstva. Těsně u povrchu jsou přitahovány ionty s opačným nábojem, než má částice. Takže se jedná o prostor mezi povrchem částice a rozptylující kapalinou. Na rovině skluzu

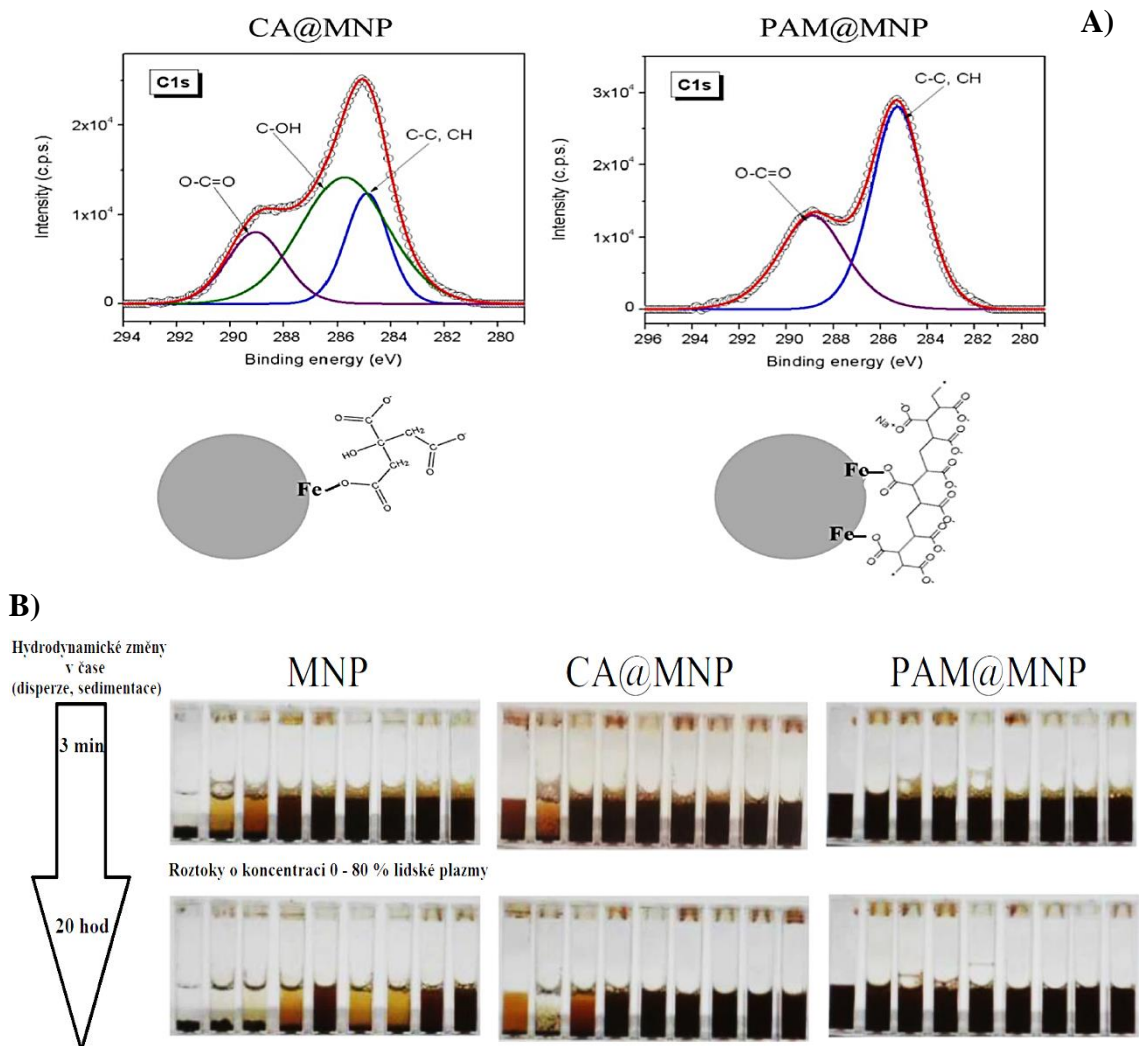
v difúzní vrstvě existuje zeta potenciál. Jeho hodnota se mění podle vzdálenosti od povrchu částice a je ovlivnitelná pH prostředí. Stabilita disperze pak závisí na zeta-potenciálu, neboli jaký bude trend vzhledem k vzájemné soudržnosti, agregaci částic (tzv. flokulace) či k odpuzování (Szekeres a kol., 2017).

V knize *Clinical Applications of Magnetic Nanoparticles* od autora Thanh (2018), je vysvětlena problematika vratné a nevratné agregace při působení vnějšího magnetického pole. García-Jimeno a kol. (2017) studovali agregaci superparamagnetických liposomů (suspenze magnetitu a liposomů). Jednalo se o konkrétní reprezentativní příklad pro fyziologické aplikace. Po vypnutí externího magnetického pole docházelo u liposomů ke vratné agregaci. Intenzita předchozího působení vnějšího magnetického pole byla nízká (menší než 40 mT). Nevratnou agregaci, při předchozím působení vnějšího magnetického pole a to o vysoké intenzitě (80 mT), ukázaly transmisní elektronové mikrofotografie (TEM), (García-Jimeno a kol., 2017).

Szekeres a kol. (2017) zjistili, že v případě použití holých částic byla při *in vitro* podmínkách pozorována změna složení buněčného média. Sérové proteiny média jsou totiž vázány na záporně nabitý povrch holých částic. Na obrázku 10 je vidět, že karboxylované MNPs magnetitu (s velikostí 8 nm) ve vyšších plazmatických koncentracích neagregovaly. Naopak byly koloidně stabilizované v porovnání s holými MNPs, v nízké koncentraci však okamžitě agregovaly. Lze si to vysvětlit rozdíly ve tvorbě bílkovinných koronových obalů okolo MNPs, v závislosti na sterickém rozložení polykarboxylátových skupin. Se zvyšováním koncentrace proteinů postupně narůstají negativní hodnoty zeta potenciálu (postupná adsorpce plazmatických proteinů zavádí negativní nadbytek na koroně), (Szekeres a kol., 2017). V experimentu Liu a kol. (2015) byly nanočástice s karboxylovou skupinou v prostředí pufru dispergovány (po dobu 3 měsíců). Okamžitá agregace však nastala u nanočástice s aminoskupinou po vložení do pufru (Liu a kol., 2015).

Některé povlaky použité na MNPs (např. monomer kyseliny citrónové; CA) v místě intravenózního vpichu *in vivo* agregovaly. V případě kyseliny citrónové nevedla ani dostatečná časová prodleva k vytvoření korony z plazmatických proteinů. Tím by vznikla koloidně stabilní disperze. Agregáty MNPs by se teoreticky daly zpětně v krevním oběhu rozpustit, aby se zabránilo zablokování malých tepen. Je však též třeba dalších studií. U poly akrylové-ko-maleinové kyseliny; (PAM) se nezávisle na čase,

avšak při vyšších koncentracích plazmatických proteinů, vytvořila v laboratorních podmínkách stabilní korona (disperze), (Szekeres a kol., 2017).



na tom, že právě povrchově upravené MNPs zmírňují potenciální toxické vlivy na biologické struktury. Následuje několik příkladů studií, zabývajících se rozdílnými typy povrchových úprav s vlivem na cytotoxicitu a genotoxicitu.

Je třeba uvést, že i vliv délky řetězců krycích vrstev může změnit toxikologický profil a vykazovat tak rozdílnou toxicitu. Krátké navázané řetězce například způsobily kondenzaci chromatinu a formování apoptotických tělísek (membránou ohraničené buněčné fragmenty). Je možné, že delší řetězce se stabilními etherovými skupinami a amid esterovými vazbami, ochránily SPION před degradací a enzymatickým štěpením na kratší řetězce (Singh a kol., 2010).



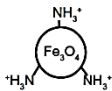
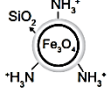
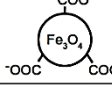
Škodlivé dopady zmírňuje zvětšující se velikost SPIONs díky povrchové úpravě. Příkladem je potažení maghemitu kyselinou 2,3-dimerkaptojantarovou, kdy při koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$  docházelo ke snížení životaschopnosti buněk fibroblastů. U koncentrací vyšších než 100  $\mu\text{g/ml}$  k významnému poklesu však nedošlo. Byla pozorována pouze zvýšená mitochondriální aktivita. Vysvětlením mohla být agregace SPIONs při vyšší saturaci. A to tím, že se změnila celková velikost SPIONs z 30 nm na 70 nm (Singh a kol., 2010). Obecně bylo prokázáno, že menší MNPs vykazovaly větší reaktivitu vzhledem k většímu povrchu a buněčná internalizace byla výraznější než u ekvivalentního množství větších částic. Stejně tomu je i u agregátů (viz v kapitole 1.3.4. Agregace) (Luque-Garcia a kol., 2013). Minaeva a kol. (2017) uvádí, že vícevrstevný polymerní obal z polyargininu a dextran-sulfátu na feromagnetických mikrokapslích blokuje toxické účinky původně menších MNPs samotného magnetitu. Ke snížení intracelulární cytotoxicity nejpravděpodobněji přispívá právě stínění nanokrystalů oxidů železa a již mnohokrát zmíněná zvětšující velikost. Takováto ochrana v podobě zapouzdření snižuje katalytický účinek MNPs na lipidovou peroxidaci. Mikrokapsle i MNPs podstupovaly fagocytózu v lidské krvi, nicméně aktivita byla pro tyto částice významně nižší než pro kontrolní latexové mikročástice. Vzhledem k nízké úrovni antigenicity a nespecifické adsorpce plazmatických proteinů, jsou hůře rozpoznány buňkami imunitního systému. Zjistilo se, že neovlivňovaly životaschopnost neutrofilů. Prováděno na L929 a lidských leukocytech (Minaeva a kol., 2017).

Cytotoxicita u magnetitu potaženým pouhou vrstvou dextranu se vysvětluje jako reakce řetězců zhroutěného dextranového pláště s buněčnými komponenty. Další možné vysvětlení je tvorba agregátů oxidů železa po zhroutění pláště. Holé částice



více narušují buněčnou membránu. Také se při nich tvořily plynné váčky, které vedly k alteraci (poruchy) funkce bílkovin a změnu v iontové rovnováze. U povrchově satureovaných SPIONs nebyl tento jev pozorován. *In vivo* nemusí být tyto efekty vidět. Homeostáza organismu si díky játrům a ledvinám účinně reguluje změny, jako jsou pH, iontová síla a chemické složení plazmy. Naopak ionty kultivačního média, povrchové použití proteinů, organických molekul či polymerů může dramaticky pozměnit chemickou reaktivitu, elektrické, magnetické a optické vlastnosti MNPs. Např. albumin derivatizované MNPs interagovaly s mastnými membránovými kyselinami a fosfolipidy. To však nevedlo ke snížení viability (Luque-Garcia a kol., 2012; Singh a kol., 2010).

Hong a kol. (2011) hodnotili SPIONs s průměrem velikosti 10 nm a 100 – 150 nm. Holé SPIONs magnetitu byly modifikovány hydroxylem (-OH), karboxylem (-COOH) a aaminovou vrstvou (-NH<sub>2</sub>) → viz obrázek 11 níže. Změny životaschopnosti buněk, metabolická aktivita, oxidační stres, integrita buněčné membrány, morfologie a stabilita DNA byla zkoumána na myši fibroblastové linii L929. Výsledek byl však překvapující. Mnohem podstatnějším faktorem pro viabilitu buněk byla koncentrace, než například zmíněná velikost či povrchová úprava. Koncentrace částic pod 200 µg/ml nevykazovaly po 24 hodinách téměř žádné cytotoxické účinky (různě modifikované SPIONs). Zůstávaly více než z 90 % živé. Při nejvyšší koncentraci 1000 µg/ml byla ztráta životaschopnosti okolo 15 % v porovnání s kontrolou. Se vzrůstající koncentrací se zvyšovala generace ROS, ale výsledky neodpovídaly tomu, že by se jednalo o hlavní mechanismus toxického účinku. Při koncentraci 1000 µg/ml bylo uvolňování LDH o 108 % vyšší než kontrola. Důvodem byla ztráta integrity membrány. Cytotoxicitu to ale také neovlivňovalo. Je tedy možné, že viabilita spíše než z fyzického poškození membrány, závisela primárně na buněčné internalizaci NPs. Pro bioaplikace doporučili užití koncentrací pod 500 µg/ml (Hong a kol., 2011). Jiná srovnávací studie MNPs magnetitu udává hodnotu koncentrace nižší než 100 µg/ml jako bezpečnou, s velmi nízkou toxicitou. Počet *in vivo* výzkumů je velmi omezený. Cílení MNPs pomocí magnetu do konkrétní části však přispívá k hromadění. Zejména vysoké hladiny volných iontů Fe<sup>2+</sup> mohou vést k nerovnováze, cytotoxickým účinkům, narušení DNA a iniciaci karcinogeneze (Singh a kol., 2010).

Modifying material	Size (nm)	Surface charge (mV)	Surface functional group	Scheme
None (bare)	10	-20	-O <sup>-</sup>	
TEOS	100-150	-30	-O <sup>-</sup>	
APTMS	10	25	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
TEOS-APTMS (T-A)	100-150	30	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
Citrate	10	-40	-COO <sup>-</sup>	

Abbreviations: APTMS, (3-aminopropyl)trimethoxysilane; TEOS, tetraethyl orthosilicate.

**Obrázek 11:** Schématický zobrazení SPIONs, různé velikosti a povrchové charakteristiky, převzato a upraveno dle (Hong a kol., 2011)

Buliaková a kol. (2016) uvádějí, že všechny tři druhy povrchově modifikovaných MNPs magnetitu (oleát sodný, oleát sodný + polyethylenglykol, oleát sodný + polyethylenglykol + poly(mléčná-ko-glykolová) kyselina), které zkoumali, vyvolaly mírné zvýšení frekvence zlomů řetězců DNA a tvorbu mikrojader v buňkách A549. I když nedocházelo ke vstupu do jádra, v cytoplazmě se hromadily aglomeráty. U naprosté většiny koncentrací (50 - 1000  $\mu\text{M}$ ) těchto upravených MNPs došlo v měřeném čase 40 hodin po ovlivnění k výraznému snížení proliferační aktivit (v procentuálním porovnání s kontrolou). A to až o 100 % u  $c = 600 \mu\text{M}$  MNPs magnetitu (povrch: oleát sodný + polyethylenglykol) a  $c = 1000 \mu\text{M}$  MNPs magnetitu (povrch: oleát sodný). V lidské periferní krvi se nenašly žádné chromozomální aberace. Lidské lymfoblasty MLC-5, které byly ovlivněny maghemitem potaženým dextranem vykazovaly také zvýšenou hladinu mikrojader. Při stejných podmínkách k tomuto zvýšení počtu mikrojader nedocházelo u embryonálních buněk syrského křečka, plicních buněk čínského křečka, buněčné linii CHS-20 z opičí ledviny, lidských granulózobuněčných HLG-5. A to bez ohledu na to, jestli se jednalo o holý maghemit či dextranem potažený (Buliaková a kol., 2017). Jiná studie uvádí, že stejně jako v předchozí studii, docházelo k agregaci MNPs v intracelulárním prostoru, ve vakuolách. V jádru taktéž nebyly žádné MNPs. Překvapivě ani MNPs s velikostí 5 nm (póry jádra mají velikost přibližně 9 nm). U buněčné linie aortálních endoteliálních buněk prasete (PAEC) se nezávisle na velikosti

částic snížila cytotoxicita MNPs oxidů železa potažených dextranskem a polyetylen glykolem (PEG) v porovnání s holými částicemi. Rozdíl s předchozí studií, kde se u všech modifikovaných částic viabilita buněk snížila, zde však u částic modifikovaných dextranskem a PEG při koncentraci 100 – 500 µg/ml zůstala viabilita stejná jako buněk bez ovlivnění. Holé částice při koncentraci částic 500 µg/ml narušovaly aktin cytoskeletu, měly vyšší produkci ROS a razantně se zvýšil počet mrtvých buněk. U buněk s potaženými částicemi nebyly tyto problémy znatelné. Naopak se u buněk inkubovaných s modifikovanými MNPs snížila produkce ROS o 35,2% u dextranského potahu a o 62,6 % u PEG oproti holým částicím (Yu a kol., 2012).

Při studii na pokusných zvířatech se při expozici MNPs potažených polyasparagovou kyselinou (intravenózně, intraperitoneálně), významně zvýšil počet mikrojadér v buňkách kostní dřevě. Holé částice maghemitu jež byly podány intraperitoneálně samicím potkanů, vyvolalo zvýšení počtu retikulocytů (vývojové stádium erytrocytu). Naopak při jejich orálním podání nebyl pozorován žádný účinek. Z hlediska chromozomového rozdělení během mitózy jsou velmi důležité mikrotubuly dělicího vřeténka, polymery  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ -tubulinu a polypeptidy. Fyziologicky by se měla vytvořit vláknitá síťovitá struktura obklopující jadernou oblast. U buněk vystavených MNPs maghemitu, jež byl zapouzdřený albuminem, došlo k narušení polymerace mikrotubulu. Snížila se tak exprese syntézy tubulinu v buňkách. To následně mělo za následek remodelaci a nerovnoměrné rozdělení tubulinu, jež je ovlivňován syntézou mikrotubulu. MNPs působily podobně jako kolchicin (alkaloid; silný mitotický jed), (Buliaková a kol., 2017, Valdiglesias a kol., 2015).

## 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

V rámci teoretické části práce prostudovat a formou kompilace zpracovat text na téma:

- Charakterizace, syntéza a využití magnetických nano/mikročásteč
- Metody, které se využívají ke stanovení cytotoxicity magnetických nano/mikro částic
- Vliv magnetických nano/mikročásteč na životní prostředí
- Vstup magnetických nano/mikročásteč do organismu, buňky
- Mechanismus toxicity v biologických systémech
- Výsledky studií a poznatků toxického působení magnetických nano/mikročásteč

Cílem experimentální části bylo:

- Stanovit cytotoxicitu magnetických nano/mikročásteč pomocí vybraných metod
- Optimalizovat postup práce s magnetickými nano/mikročástečkami při stanovení cytotoxicity
- Názorně porovnat dosažené výsledky stanovení cytotoxicity nano/mikro částic ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH a ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH · IgG anti *Salmonella Typhimurium* na nádorové buněčné linii A549 a primární buněčné linii MRC-5

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité pomůcky, přístroje a roztoky

##### Pomůcky:

- Kultivační lahve (25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>) a ostatní plast (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- Mikrozukmavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Pasteurovy pipety (P-LAB, Praha, Česká republika), jednotlivě balené sérologické pipety (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), CASY zkumavky (Roche, Basilej, Švýcarsko), alobal (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)
- Kultivační destičky – 96 jamek, 24 jamek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)
- Elektrodotové mikrotitrační destičky– 96 jamek (Roche, Basilej, Švýcarsko)
- Bürkerova komůrka (Opting Servis, Ostrava, Česká republika)

##### Přístroje:

- Laminární biohazard box třídy II ESCO BSC (ESCO, Singapur)
- Inkubátor Galaxy CO-170S (New Brunswick Scientific, Edison, USA)
- Biologický světelný mikroskop Primo Vert (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Německo), fotoaparát Canon EOS 500D (Carl Zeiss, Jena, Německo)
- Vodní lázeň SWB-10L-1 (Major science CO., Ltd, New Taipei City, Taiwan)
- Centrifuga Heraeus Labofuge 400R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)
- CASY Roche Innovatis TT Cell Counter and Analyzer System (Roche, Basilej, Švýcarsko)
- Orbitální třepačka Mini Shaker PSU-2T (Biosan Ltd., Riga, Lotyšsko)
- Spektrofotometr PowerWave 340 (BioTek, Winooski, Vermont, USA)
- xCELLigence RTCA SP (Roche, Basilej, Švýcarsko)

### **Programy:**

- Software CASY excell 2.4 (Roche, Basilej, Švýcarsko)
- Excel 2010 (Microsoft, Praha, Česká republika)
- PowerPoint 2013 (Microsoft, Praha, Česká republika)
- Software RTCA 1.2.1.1002 (Roche, Basilej, Švýcarsko)

### **Použité roztoky a chemikálie:**

- RPMI médium (Life Technologies, USA)
- MEM (Sigma-Aldrich, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS) Heat Inaktivated (Life Technologies, USA)
- L-Glutamin (200 mM) (Life Technologies, USA)
- Neesenciální aminokyseliny (Life Technologies, USA)
- Antibiotika- penicilin/streptomycin (10 000 U/mL) (Life Technologies, USA)
- HEPES (1 M) (Life Technologies, USA)
- Pyruvát sodný (100mM) (Life Technologies, USA)
- Fosfátový pufr (DPBS)
- Trypsin (Life Technologies, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH, Německo)
- 0,4% roztok Trypanové modři (Sigma-Aldrich, USA)
- 70% ethanol (Penta, Česká republika)
- CASY ton (Roche, Švýcarsko)
- Ultračistá destilovaná voda pro buněčné kultury LONZA (Cambrex), připravená ultrafiltrací, reverzní osmózou, deionizací, destilací a sterilizovanou filtrací (P-LAB, Česká republika)
- Electron-coupling reagent (ECR) (Roche, Švýcarsko)
- XTT labeling reagent (Roche, Švýcarsko)

### **Likvidace odpadů:**

Použitý materiál a mikrotitrační destičky se zlikvidovaly do připravených odpadních nádob. Vše se ve sterilních nádobách převezlo do spalovny.

## 3.2 Příprava médií a pufry

- **Inaktivační médium (100 ml):** RPMI 80 ml + FBS 20 ml
- **Médium pro A549 (100 ml):** MEM 90 ml, FBS (10% finálně) 10 ml, HEPES (10mM finálně) 1 ml, pyruvát (1mM finálně) 1 ml, penicilin/streptomycin (10mM finálně) 500  $\mu$ l
- **Médium pro MRC-5 (100 ml):** MEM 90 ml, FBS (10% finálně) 10 ml, L-glutamin (2mM finálně) 1ml, neesenciální AMK (1% finálně) 1 ml, penicilin/streptomycin (10mM finálně) 500  $\mu$ l
- **PBS:** naředění DPBS + ultračistá destilovaná voda (1:10)

## 3.3 Použité buněčné linie a práce s nimi

### 3.3.1 Testování cytotoxicity s buněčnou linií A549 a MRC-5

Pro tuto práci byly použity dvě adherentní buněčné linie. Buňky lidského alveolárního adenokarcinomu plic A549 (European Collection of Cell Cultures, UK) a nenádorové linie zdravých plicních fibroblastů MRC-5 (European Collection of Cell Cultures, UK). Pro testování cytotoxicity byly použity buňky nejvýše do 20. pasáže u A549 a 15. pasáže u MRC-5.

### 3.3.2 Pasážování, trypsinizace buněk a kultivační podmínky

Před uskutečněním samotného testování bylo třeba buněčné linie prekultivovat. Pracovalo se v aseptickém prostředí (laminární box) s minimálním časem stráveným mimo inkubační podmínky, atmosféru inkubátoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Buňky musely mít pro svůj růst dostatek živin. Pokud by však konfluence v kultivační lahvi dosáhla 70 – 90 %, živiny by se příliš rychle vyčerpávaly a společně s nedostatkem prostoru by buňky deadherovaly. Namnožené buňky se 2 x týdně pod světelným mikroskopem kontrolovaly a dle toho

se staré médium vyměnilo za čerstvé či se pasážováním rozdělily. Všechny potřebné roztoky byly před použitím zahřáty ve vodní lázni na 37°C.

Při pasážování se z jamek odpipetovalo médium (odpad; jelikož jsou to adherentní buňky). Miska se opláchla kývavými pohyby 3 ml fosfátového pufru PBS (odpad, mrtvé buňky, debris;) a následně se napipetovalo 3 ml enzymu trypsinu (deadherace ze dna). Po 9 minutách působení v inkubátoru, byl roztok trypsinu s uvolněnými buňkami resuspendován a opláchnuto jím dno misky. Celý objem se poté přepipetoval do inaktivačního média, který byl předem připraven v centrifugační zkumavce. Miska se opět opláchla 3 ml PBS pufru, aby žádné buňky nezůstaly na povrchu misky. Zkumavka s buňkami, trypsinem a PBS byla centrifugována 5 minut při 1500 otáček/ min. Poté byl supernatant nad buněčnou peletou Pasteurovou pipetou opatrně odsát do odpadu. Peleta byla rozředěna 1 ml či 2 ml media. Množství a viabilita byla proměřena CASY přístrojem.

### **3.3.3 Počítání buněk tzv. metodou „Electric Current Exclusion“, přístroj CASY TT Cell Counter**

Jedná se o neinvazivní stanovení počtu, koncentrace, velikosti a stavu buněk, bez použití barviva. Na principu analýzy pulsních oblastí byl zjištěn počet viabilních buněk. Viabilní buňka vystavená nízkému napětí se díky neporušené membráně chovala jako elektrický izolátor. Poškozenou či rozpadlou buňkou elektrický proud procházel.

Po nastavení programu pro daný typ buněk, promytí přístroje a stanovení pozadí se provedlo počítání prekultivovaných buněk. Z důkladně promíchané buněčné suspenze bylo do CASY zkumavek s tonem odpipetováno 10  $\mu$ l. Software během velmi krátké doby vyhodnotil celkový počet buněk, viabilní buňky či debris v 1 ml. Tato informace posloužila k přepočtu množství nasazených buněk do nových misek, jamek (koncentrace buněčné suspenze  $1_{Z0}$ ) nebo k samotnému spočítání viability (%) u koncentrační řady buněk ovlivněných MMPs.



## 3.4 Příprava destičky a ovlivnění mikročásticemi

### 3.4.1 Testované mikročástice

V experimentu se pracovalo se zakoupenými SPIONs od firmy Bang Laboratories, Inc (Fishers, IN, USA). Konkrétně s homogenními magnetitovými nano/mikročásticemi oxidu železnato-železitého ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH o velikosti 0,8  $\mu\text{m}$ . Nejdříve se testovala cytotoxicita těchto částic a poté i její modifikovaná varianta. Katedra biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice provedla biofunkcionalizaci  $\rightarrow$  ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH · IgG namířené proti *Salmonella Typhimurium*.

**3,9 mg ProMag · COOH / 95  $\mu\text{g}$  Ab (IgG  $\rightarrow$  anti *Salmonella Typhimurium*)**

### 3.4.2 Postup

Nejdříve se bylo třeba ujistit, zda bude dostatečný počet prekulturnovaných buněk. Pomocí analyzátoru CASY TT pro počítání buněk, se spočítala koncentrace buněčné suspenze  $1_{ZO}$  (zpasážované a zcentrifugované buňky). Výsledek se porovnal s úvahou, kolik buněk bude potřeba pro uskutečnění celého experimentu. Jednotlivé koncentrace a kontroly se vyhotovovaly ve čtyřech opakování na destičce dle Tabulky 3. V případě buněčné linie A549 bylo třeba  $20 \cdot 10^3$  buněk/jamku a MRC-5  $40 \cdot 10^3$  buněk/jamku. Tento počet se vynásobil počtem jamek. Následná příprava buněčné suspenze  $2_{ZR}$  spočívala v naředění původního  $1_{ZO}$  médiem, aby vznikla výsledná koncentrace  $3 \cdot 10^5$  buněk/ml. Výsledná hodnota se musela vynásobit 6, protože vzhledem k počtu jamek (+ rezerva) bylo třeba  $V_c$  suspenze  $2_{ZR}$  6 ml. Koncentrace buněčné suspenze  $2_{ZR}$  se po naředění médiem a opětovným spočítáním reálně pohybovala kolem  $3 \cdot 10^5$  buněk/ml. Jednoduchým přepočtem ( $20 \cdot 10^3$  buněk/jamku) se vypočítalo množství pipetovaných  $\mu\text{l}$ /jamku. Od  $V_{c \text{ jamky}} = 100 \mu\text{l}$  se odečetl zmíněný  $V_{2ZR}$  buněk a vypočítaný  $V_{MMPs}$  (měnící se hodnoty v závislosti na koncentraci). Takto se získal pipetovaný  $V_{media}$ .

Kultivační 96 jamková destička s nadávkovanými buňkami a médiem (inokulum) byla ihned po dokončení vložena do inkubátoru ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) pro kultivaci buněk. Zde buňky adherovaly na dno jamky a mohly dále proliferovat.

Po 24 hodinové inkubaci se zkontrolovalo, zda jsou buňky živé a adherované. Případně, zda nedošlo k bakteriální kontaminaci. V tuto dobu bylo úkolem ovlivnit buňky mikročásticemi ProMag™ 1 Series · COOH či ProMag™ 1 Series · COOH · IgG. V literatuře nebyla nalezena optimální doporučená koncentrační řada, kde by byl vidět skok, jež se projevuje na viabilitě buněk. Proto bylo nutné nejdříve zoptimalizovat počet nasazených buněk a nástřel koncentrací se znatelným cytotoxickým účinkem. Po promyšlení byly zvoleny koncentrace 0,1; 1; 2; 10; 100; 200; 500; 1000  $\mu\text{g/ml}$  částic (viz Obrázek 12).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$	Medium	Medium	Medium	Medium	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$
B	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	NK živé	NK živé	NK živé	NK živé	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
C	2 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	10% DMSO	10% DMSO	10% DMSO	10% DMSO	2 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
D	10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$					10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
E	100 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$					100 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
F	200 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	Medium	Medium	Medium	Medium	200 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$
G	500 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	NK živé	NK živé	NK živé	NK živé	500 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
H	1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	10% DMSO	10% DMSO	10% DMSO	10% DMSO	1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$

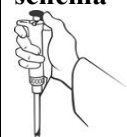
**MRC-5**

**Obrázek 12:** Koncentrační schéma pro XTT. Ovlivnění adherovaných buněk A549 ( $20 \cdot 10^3$  buněk/jamku) a MRC-5 ( $40 \cdot 10^3$  buněk/jamku) testovanými MMPs.

Ze zásobního roztoku byly připraveny tři zředěné roztoky  $Z_{\ominus}$  MMPs. Výpočtem se zjistilo, kolik  $\mu\text{l}$  I, II, III zředěného  $\ominus$  MMPs bude potřeba pro dosažení jednotlivých koncentrací v jamkách. Počet  $\mu\text{l}$  znázorněn v Tabulce 3. Částice se do jamky pipetovaly na 3 a více míst v konkrétní jamce. Následně byla tatáž špička v jamce propláchnuta, aby se částice rozprostřely po celé jamce. Manipulování s pipetou muselo být opatrné

a jemné. Minimalizovalo se tak odloupení buněk ze dna. Takto ovlivněná destička nanočásticemi se opět nechala 24 hodin inkubovat.

**Tabulka 3:** Pipetovací schéma destičky pro analýzu buněčné viability, nasazení buněk a jejich ovlivnění MMPs.

Pipetovací schéma 		1 2 3 4				5 6 7 8			
		1. den nasazení bb A549		2. den ovlivnění MMPs (24hod)		Bez ovlivnění MMPs, pouze kontroly			
	c <sub>MMPs</sub> [µg/ml]	bb [µl]	Medium [µl]	Zředěný Z <sub>O</sub> MMPs	MMPs [µl]		Medium, bb, DMSO [µl]		
A	0,1	61,8	37,4	I	0,77	Medium	100 Medium		
B	1		30,5		7,69	NK	61,8 bb + 38,2 Medium		
C	2		36,2	II	2	10%DMSO	61,8 bb+28,3 Med+10 DMSO		
D	10		28,2		10				
E	100		37,2	III	1				
F	200		36,2		2				
G	500		33,2		5				
H	1000		28,2		10				

$$V_c = 100 \mu\text{l/jamku}$$

- bb: buňky A549
- n<sub>cMMPs</sub>, kontroly: 4 jamky v řádku
- $20 \cdot 10^3 \text{ buněk/jamku} \rightarrow \frac{20\,000 \text{ bb/jamku}}{323\,400 \text{ bb/ml}} = 0,0618 \text{ ml}$   
 $= 61,8 \mu\text{l zředěné suspenze buněk 2ZŘ / jamku}$
- Medium: médium pro A549
- NK: negativní kontrola; živé buňky
- 10 % DMSO; mrtvé buňky; přidáno po 24 hodinách od nasazení destičky
- MMPs: ProMag<sup>TM</sup> · 1 Series · COOH · IgG anti *Salmonella Typhimurium*
- Z<sub>O</sub>MMPs: zásobní roztok ProMag<sup>TM</sup> · COOH o c = 26 000 µg/ml

$$\text{I zředění: } c_{\text{I}} = 13 \mu\text{g/ml} \rightarrow 1 \mu\text{l Z}_{\text{O}} \text{MNP}_s + 1999 \mu\text{l PBS}$$

$$\text{II zředění: } c_{\text{II}} = 100 \mu\text{g/ml} \rightarrow 1 \mu\text{l Z}_{\text{O}} \text{MNP}_s + 259 \mu\text{l PBS}$$

$$\text{III zředění: } c_{\text{III}} = 10\,000 \mu\text{g/ml} \rightarrow 38,5 \mu\text{l Z}_{\text{O}} \text{MNP}_s + 65,5 \mu\text{l PBS}$$

### 3.5 Stanovení viability testem XTT

Byla vybrána citlivá, netoxická a neradioaktivní metoda. Buněčná viabilita se stanovovala kolorimetrickým, ve vodě rozpustným, testem, za použití vysoce rozpustné tetrazoliové soli. Díky mitochondriální aktivitě dehydrogenáz a kofaktorů NADH a NADPH byly živé buňky schopné přeměnit žlutou tetrazoliovou sůl na oranžový formazan. Znamená to, že čím byla nižší proliferační schopnost; viabilita, tím se absorbance ( $A_{450\text{nm}}$ ) dostávala k nižším hodnotám. Vzniklo méně formazanu. Mrtvé buňky (negativní kontrola) měly stejnou  $A_{450\text{nm}}$  jako médium.

#### 3.5.1 Použité roztoky a chemikálie

- Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Mannheim, Německo)
  - **XTT** labeling reagent (hydrát 3'-[1-(fenylaminokarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro)benzensulfonátu sodného) v médiu RPMI 1640, bez fenolové červeně, sterilní 1 mg/ml
  - **ECR** electron coupling reagent, PMS (N-methyl-dibenzopyrazin- methylsulfát), 0,383 mg/ml (1,25 mM) v PBS, sterilní

→ XTT směs v poměru **50 XTT : 1 ECR** → 50  $\mu\text{l}$  XTT směsi do každé jamky

- Buněčná suspenze adherentních buněk A549 o  $c = 20 \cdot 10^3$  buněk/100  $\mu\text{l}$ ; jamku
- Kultivační médium A549
- Buněčná suspenze adherentních buněk MRC-5 o  $c = 40 \cdot 10^3$  buněk/100  $\mu\text{l}$ ; jamku
- Kultivační médium MRC-5
- Fosfátový pufr PBS

#### 3.5.2 Postup

Po 24 hodinách od ovlivnění kultivovaných buněk mikročásticemi ProMag™ 1 Series · COOH či ProMag™ 1 Series · COOH · IgG (48 hodin od počátečního nasazení buněk do 96 jamkové destičky) byly v první fázi odstraněny MMPs. U nízkých koncentrací, pozitivní, negativní kontroly a media (blanku) → jamky A, B, C, D, NK, 10 % DMSO, MEDIUM, se nejdříve obsah jamek opatrně promíchal. Šlo o velmi jemné

nasávání a vypouštění tekutého obsahu v rámci destičky pomocí 100 µl pipety, aby nedocházelo k odloupení, odmytí viabilních buněk adhezaných na dno jamek. Původní medium (+MMPs), jímž se jamky proplachovaly, bylo následně opatrně odsáto a vypuštěno do nebezpečného odpadu a nahrazeno 100 µl čerstvého média. Rozdíl u jamek E, F, G, H byl ten, že ještě před přidáním nového média byly promyty 1x 100µl PBS. V případě nedokonalého resuspendování a odpipetování MMPs se promytí 100 µl PBS, v oblasti vysokých koncentrací G a H, ještě jednou opakovalo. Vysvětlení proč tomu tak bylo lze nalézt ve výsledcích v podkapitole 4.1.1.

Druhá část spočívala v přidání XTT směsi do všech jamek na destičce, s nimiž se pracovalo. Jednalo se o fotosenzitivní roztok. Bylo nutné mít po celou dobu, od vyndání z mrazáku, až po vlastní spektrofotometrické vyhodnocení, vypnutá světla v místnosti i boxu. Případně též zabalit destičku do alobalu. Pokud by se tak neučinilo, mohlo by dojít ke zkreslení výsledků. Po rozmrazení XTT a ECR ve vodní lázni se připravila XTT směs. Aby byl zachován výše zmíněný poměr, vynásobila se hodnota 50 počtem jamek. Tak se zjistilo množství XTT [µl], ke kterému bylo následně přidáno 1 x stejný počet jamek ECR [µl]. Z této směsi bylo do všech jamek napipetováno 50 µl. Celkový objem 150 µl/jamku (50 µl XTT směsi + 100 µl nového média z první části). Dávkovalo se co nejrychleji, aby nedošlo k ovlivnění reakce časovou prodlevou.

Destička zakrytá alobalem byla přenesena k spektrofotometrickému ELISA readeru. Při vlnové délce 450 nm, se změřila absorbance v čase 0 ( $A_{0hod}$ ). Díky přeměně žluté tetrazoliové soli XTT na oranžový formazan se v metabolicky aktivních buňkách intenzita zbarvení po hodinové inkubaci v inkubátoru zvýšila. U buněk A549 stačil odečet absorbance v jedné hodině ( $A_{1hod}$ ). Avšak u MRC-5 byly hodnoty absorbancí v první hodině nízké. Proto se proměřila ještě druhá hodina ( $A_{2hod}$ ). Mezi jednotlivými měřeními se destička nechala 1 minutu protřepat na třepačce. Bublínky se propíchly špičkou či jehlou.

Při vyhodnocení se od  $A_{1hod}$  u A549 ( $A_{2hod}$  u MRC-5) odečetla  $A_{0hod}$ . Ze zprůměrovaných odečtených hodnot jednotlivých  $A_{1hod} - A_{0hod}$  koncentrační řady se počítala viabilita. K výpočtu byl použit vzorec, jenž byl vztažen k negativní kontrole (100 % viabilita; pouze buňky a médium, bez částic):

$$viabilita [\%] = \frac{A_{vz} \cdot 100}{A_{NK} (buňky + médium)}$$

### 3.6 Manuální stanovení viability trypanovou modří

Jako srovnávací metoda pro zjištění viability se využila jednoduchá manuální metoda s kalibrovanou Bürkerovou komůrkou. Ta slouží ke zjištění koncentrace buněk/1 ml. Specifickým obarvením buněk za použití 0,4 % roztoku trypanové modře (Sigma-Aldrich, USA), byly odlišeny viabilní a mrtvé buňky. Z viabilních buněk byla modř aktivně transportována vně buněk. Zůstaly tak bezbarvé. U mrtvých buněk byla porušena integrita membrány a její transportní vypuzovací mechanismy, že barvivo prostoupilo plazmatickou membránou. Jeho hromadění v intracelulárním prostoru zviditelnilo buňky. Pro mikroskopické počítání v Bürkerově komůrce byl použit světelný mikroskop.

#### 3.6.1 Postup

Pro testování buněk A549 byl použit 24 jamkový panel. Jelikož se jednalo o větší objem jamek, počet nasazených buněk byl  $75 \cdot 10^3$  buněk/jamku. Princip prekulivace buněk A549 byl proveden stejně jako při testování viability pomocí XTT, včetně ovlivnění buněk mikročásticemi s následnou 24 hodinovou expozicí. Rozdíl byl v celkovém objemu, s nimž se počítalo  $\rightarrow 500 \mu\text{l}$ /jamku. Muselo se tak přepočítat i pipetované množství částic ze zředěných roztoků I, II, III  $\text{MMPs}$ . Další změnou byl postup po 24 inkubaci buněk s nanočásticemi. Z jamek byl opatrně odpipetován supernatant a adherované buňky byly dvakrát promyty  $500 \mu\text{l}$  PBS. Následně se provedla pasáž buněk přidavkem  $300 \mu\text{l}$  trypsinu. Po 9 minutové inkubaci v inkubátoru se buňky trypsinem resuspendovaly, opláchly a přepipetovaly do centrifugační zkumavky se  $600 \mu\text{l}$  inaktivačního média. Znovu byl proveden oplach  $300 \mu\text{l}$  PBS, aby nedošlo k zanechání zbylých buněk v jamce. Zkumavky s inaktivačním médiem, trypsinem a PBS byly 5 minut centrifugovány při  $1500$  otáček/min. Supernatant byl odstraněn do odpadu a k peletě bylo přidáno čerstvé médium.

Druhá část spočívala v obarvení buněk trypanovou modří. Zkumavka, která byla připravena přidáním  $100 \mu\text{l}$  čerstvého média k sedlině centrifugovaných A549 buněk, byla důkladně resuspendována. Následně se do připravené eppendorf zkumavky odebralo  $20 \mu\text{l}$  a přidalo  $20 \mu\text{l}$  trypanové modře.  $10 \mu\text{l}$  této obarvené buněčné suspenze se pipetou aplikovalo do prohlubně Bürkerovy komůrky s krycím sklíčkem. Díky vzlínivosti zaplnila směs celou střední část komůrky. V ohnisku světelného mikroskopu, kam se komůrka vložila, byl vidět síťovitý obrazec s velkými zornými poli. Ta se dále dělila na 16 malých

čtverců. Kulaté, projasněné živé a modré mrtvé buňky se počítaly v 6 velkých zorných polích. Následně z nich byl vypočítán průměr. Započítávaly se buňky ležící na levé a horní hraně malého čtverce; pouze dva okraje tak, aby nedocházelo k duplikaci. Buňky, jež nebyly součástí vnitřního prostoru čtverce alespoň z 50 %, se nezapočítávaly. Z takto spočítaných živých a mrtvých buněk byl udělán průměr. Při vyhodnocení se muselo brát v úvahu počáteční ředění primární suspenze buněk. Tento postup se opakoval u všech koncentrací MMPs, které v jamkách ovlivňovali buněčnou linii A549 + pozitivní a negativní kontrola. Ze zprůměrovaných hodnot byla vypočítána viabilita a zanesena do grafu. Vzorec výpočtu:

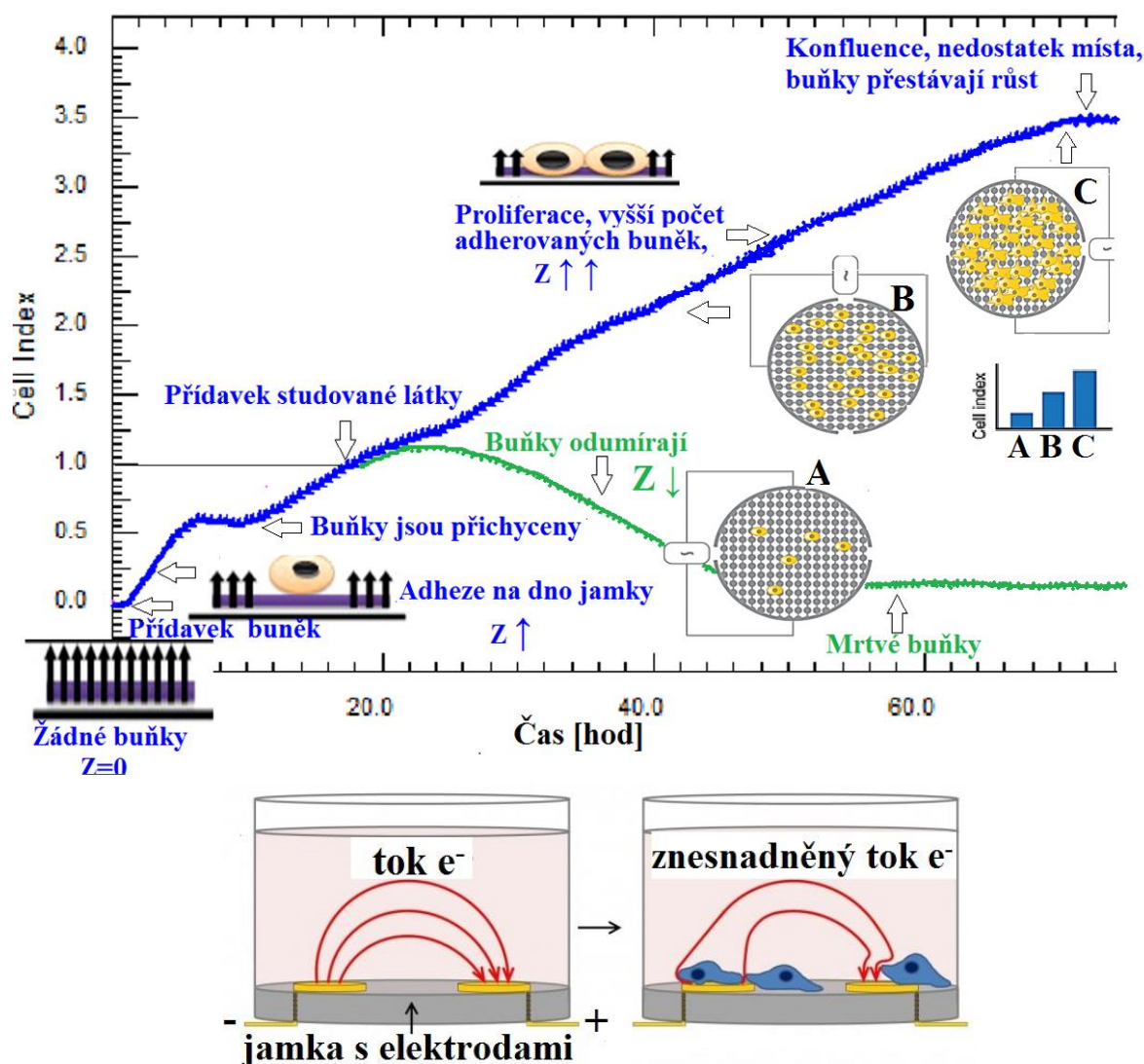
$$viabilita [\%] = \frac{\text{počet viabilních buněk} \cdot 100}{\text{celkový počet buněk}}$$

### 3.7 Analýza proliferace buněk v reálném čase systémem xCELLigence

Alternativní metodou korelující s výsledky získanými z tzv. „end point“ analýz, mezi které se řadí např. XTT, trypanová modř, LDH, je vysoce účinné hodnocení cytotoxicity Real-Time Cell Analyzer Single Plate (RTCA SP); xCELLigence. Výhodou je nepřetržité sledování, kontrola viability, proliferace či případná cytotoxicita zkoumaných látek na buňku. Elektrický odpor neboli impedance  $Z$  odráží aktuální fyzický stav buněk. A to díky adhezenci a kvalitě interakce se zlatými elektrodami na dně jamky. Míra impedance, odvozená z relativních změn elektrické impedance, je zaznamenávána jako CI (Cell Index). Jedná se o bezrozměrnou veličinu, která je automaticky intervalově zanášena do grafu. Ukázalo se, že impedance není narušena nanočásticemi. Lze tak pozorovat přechodný či dlouhodobý účinek studované látky, kdy dochází ke stimulaci proliferace nebo naopak k buněčnému odumírání. Monitorování probíhá při optimálních podmínkách v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Časový průběh RTCA analýzy je zřetelně vyobrazen na Obrázku 13.

Systém xCELLigence se skládá ze stanice RTCA SP, uložené v inkubátoru pro tkáňové kultury, do níž se vkládá jedna 96 jamková E-destička. Stanice přenáší signál vně inkubátor do RTCA analyzátoru, který během 15 s proměří impedanci na elektrodách na celé destičce. Přenosný počítač RTCA s porty tvoří kontrolní jednotku umístěnou taktéž venku. Integrovaný operační systém a software počítače zobrazuje naměřené hodnoty s křivkami. CI závislém na čase. E-destička je určena jen na jedno použití. Elektrody pokrývají přibližně 80 % dna jamky a hodnota napětí na nich je okolo 20 mV. Vzniklý elektrický proud mezi kladnou a zápornou elektrodou prochází iontovým prostředím růstového média. Přítomnost adherovaných buněk mění iontové složení na elektrodě, v mediu. Buňky tak působí jako izolátory a zvyšují impedanci ( $\uparrow$ CI). Tento jev je znázorněn ve spodní části Obrázku 13. Víko E-destičky je konstruováno velmi nízko. Tím se zajistí, co nejmenší odpařování. Mezi doporučené podmínky patří teplota od +15 do 40 °C s relativní vlhkostí 98 % (ACEA Bioscience, Ins, 2017; Urcan a kol., 2010).





**Obrázek 13** Znáznornění průběhu RTCA analýzy. Zlaté mikroelektrody detekují impedanci  $Z$ , jejíž velikost závisí na počtu buněk. Vyjádřeno jako buněčný index v závislosti na čase, převzato a upraveno dle (Limame a kol., 2012; Urcan a kol., 2010; ACEA Bioscience, Inc., 2017)

### 3.7.1 Postup

V první fázi testování byla zoptimalizována počáteční koncentrace buněčné linie MRC-5. Pro experiment byla zvolena optimální koncentrace buněk MRC-5  $17,5 \cdot 10^3$  buněk/jamku. Pracovalo se s 8. pasáží buněk MRC-5. Jako MMPs se opět použily ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH a ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH · IgG.

Zpasážívané buňky byly spočítány na přístroji CASY TT Cell Counter. E-destička se umístila na ohřívací plochu. Do všech jamek bylo nejprve napipetováno 100  $\mu$ l vyhřátého média na 37 °C. Následně byla k médiu pipetována spočítaná buněčná suspenze o finální koncentraci 17 500 buněk/jamku o objemu maximálně 90  $\mu$ l. Takto připravená

E-destička se nechala 30 minut při pokojové teplotě, aby si buňky sedly na dno jamek (kvůli počátečnímu odporu elektrod). V RTCA programu byl mezitím zadán nový experiment. Po zmíněných 30 minutách se E-destička vložila do RTCA SP stanice přístroje xCELLigence, která se nacházela v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Tímto krokem započalo buněčné monitorování impedance v závislosti na přisedajících buňkách a jejich profileraci. Monitorovací interval probíhal každých 5 minut po dobu celého experimentu. Druhý den vzrostla hodnota buněčného indexu k CI=1 (viz Obrázek 13). V tuto dobu se inkubované buňky ovlivnily 10 µl 5 % DMSO (pozitivní kontrola) či MMPs podle schéma Obrázku 14. Pro srovnání se ponechala negativní kontrola. Tyto jamky se ničím neovlivňovaly (NK → jen buňky + medium). Pouze se přidalo 10 µl média. Celkový objem všech experimentálních jamek byl 200 µl. E-destička vložila zpět do inkubátoru a pokračovalo se v monitorování. Vliv MMPs na buněčnou proliferaci byl hodnocen po dobu 80 hodin od ovlivnění.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,1 µg/ml		NK živé
B	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml		NK živé
C	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml		NK živé
D	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml		NK živé
E	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml		NK živé
F	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml		
G	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	5 % DMSO	5 % DMSO
H	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	5 % DMSO	5 % DMSO
	ProMag™ I Series · COOH					ProMag™ I Series · COOH · IgG						

**Obrázek 14:** Koncentrační schéma pro metodu xCELLigence. Ovlivnění adheovaných buněk MRC-5 testovanými MMPs (červeně a modře označené). Počet nasazených buněk  $17,5 \cdot 10^3$  buněk/jamku. NKneovlivněné buňky; živé. 5 % DMSO kontrola.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Stanovení cytotoxicity testem XTT

Pomocí XTT testu byl hodnocen cytotoxický efekt MMPs ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH a ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH · IgG na buněčné linii A549 a MRC-5. Pracovní postup byl optimalizován. Pro 100 % viabilitu byla použita negativní kontrola neovlivněných buněk (NK). K této hodnotě byly vztahovány hodnoty dalších naměřených absorbancí. Pro tuto práci byla zvolena kontrola, buňky s přidavkem 10% DMSO (tzn. mrtvé buňky). Měření bylo prováděno v kvadrupletech pro každou ze stanovovaných koncentrací MMPs 0,1, 1, 2, 10, 100, 200, 500, 1000 µg/ml. Doba předchozí expozice MMPs na buněčné linie byla 24 hodin. U buněčné linie A549 byla proměřena  $A_{0\text{hod}}$  a  $A_{1\text{hod}}$  na spektrofotometru PowerWave při 450nm. Pro linii MRC-5 se barevná změna substrátu odečetla v čase  $A_{2\text{hod}}$  od které se opět odečetla  $A_{0\text{hod}}$ .

$$\text{Viabilita bb A549 [\%]} = \frac{(A_{1\text{ hod bb+MMPs}} - A_{0\text{ hod bb+MMPs}}) \cdot 100}{(A_{1\text{ hod(NK)}} - A_{0\text{ hod(NK)}})}$$

$$\text{Viabilita bb MRC-5 [\%]} = \frac{(A_{1\text{ hod bb+MMPs}} - A_{0\text{ hod bb+MMPs}}) \cdot 100}{(A_{2\text{ hod(NK)}} - A_{0\text{ hod(NK)}})}$$

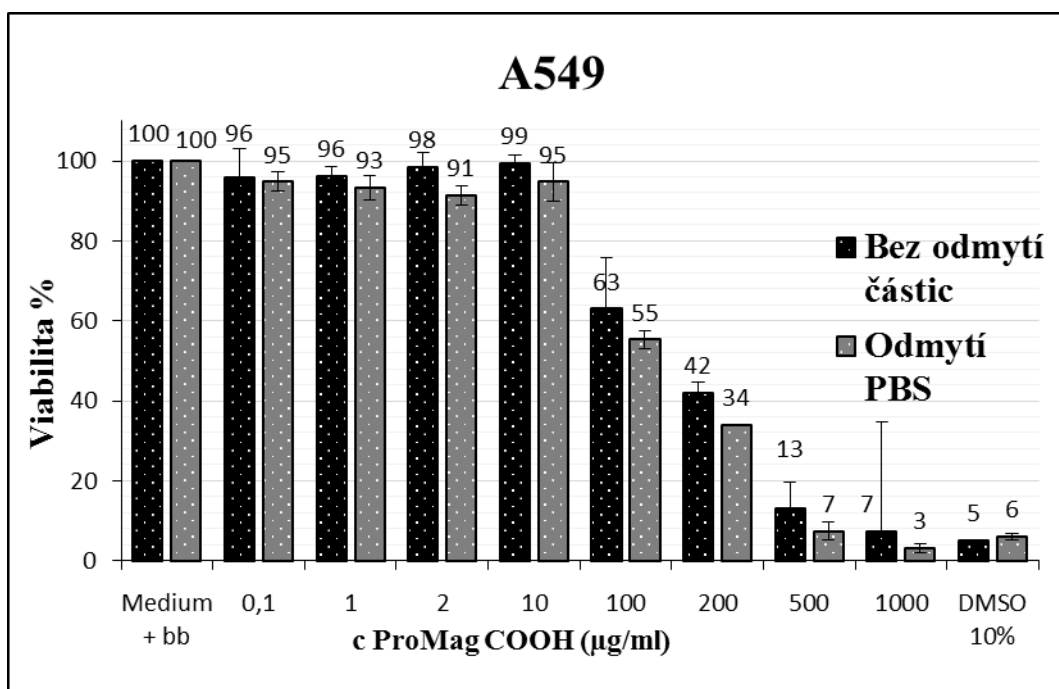
#### 4.1.1 Optimalizace práce s ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH při studiu jejich vlivu na buněčnou linii A549

V počáteční fázi testování MMPs ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH byla proměřena koncentrační řada MMPs od 2 µg/ml – 2500 µg/ml, aby se zjistilo, při jaké koncentraci dochází ke zlomovému poklesu viability ovlivněných buněk. Výsledky ukázaly, že tato změna bude v rozsahu 200 µg/ml až 500 µg/ml. Také analýza dat Minaeva a kol. (2017) naznačuje výrazný inhibiční účinek částic SPIONs magnetitu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> na viabilitu buněk L929 až od koncentrace částic 322 µg/ml (viabilita 42 %). Proto se při dalším testování používaly již jen koncentrace částic v rozsahu 0,1 – 1000 µg/ml.

Při promývání buněk a měření experimentálních dat se ukázalo, že přítomnost částic v roztoku s buňkami ovlivňuje hladiny absorbancí a to podle množství částic do reakce přidaných. Při vyhodnocení se interference projevovovala zvýšenou absorbancí,

což vedlo k nesprávné interpretaci dat, že je viabilita vyšší (Graf 1). Také naměřené hodnoty, zejména při vyšších koncentracích částic, vykazovaly velkou směrodatnou odchylku. Pravděpodobně v důsledku tvorby agregátů z částic a buněk. Obzvláště při koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$ , jak je vidět na Grafu 1. Variantou pro eliminaci chyby zvyšující absorpenci bylo buňky v jamkách propláchnout dodatečně pufrem PBS. Tím se MMPs před přidáním XTT odsály pryč. V experimentech Dorniani a kol. (2014), Radu a kol. (2015) také promývali jamky pufrem PBS. Zhou a kol. (2017) promývali jamky dokonce 3x pufrem PBS.

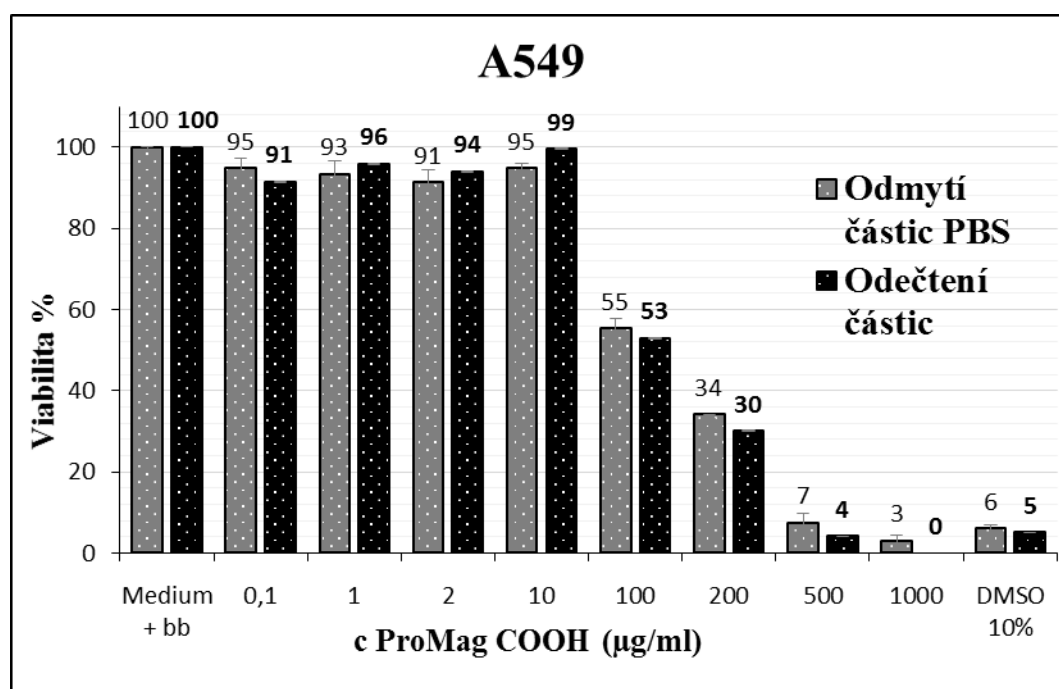
Naměřené hodnoty absorpencí získané optimalizovaným postupem byly vyjádřeny formou grafu. V Grafu 1 je patrný výrazný pokles viability buněčné linie A549 až od koncentrace částic 100  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s kontrolou. Děje se tak bez ohledu na způsob úpravy jamek před vyhodnocením. Trend cytotoxického účinku MMPs je ve vyšších koncentracích zjevný. Graf 1 srovnává černé sloupce viability, které znázorňují proměření absorpence bez předchozího odmytí částic a šedých sloupců s oplachem PBS. Hodnoty se mezi sebou lišily v průměru o 5 %.



**Graf 1:** Porovnání viability buněčné linie A549 po expozici ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH v koncentracích 0,1 – 1000  $\mu\text{g/ml}$  s odlišným způsobem postupu před vyhodnocením. Negativní kontrola buňky bez ovlivnění MMPs, mrtvé buňky 10 % DMSO. Typ použitého stanovení: XTT.

Původní myšlenka, tj. propláchnutí všech jamek 2x puforem PBS, se ukázala jako nevhodná. Ukázalo se, že u buněk A549 při nízkých koncentracích částic 0,1 – 10 µg/ml docházelo k výraznému odmytí viabilních buněk a to v průměru o 19 %. Také viabilita buněk, v případě koncentrace částic 100 µg/ml a 200 µg/ml působící na buněčnou linii MRC-5, byla nižší až o 42 %. Adherence na dno jamky nebyla u MRC-5 tak výrazná. Po optimalizaci postupu, se pro obě linie ukázal jako nejvhodnější postup proplach kultivačním médiem (pro nižší koncentrace 0,1 – 10 µg/ml) a pouze 1x puforem PBS od jamek E, F, G, H s koncentracemi od 100 µg/ml MMPs a výše (viz podkapitola 3.5.2. s postupem XTT).

Další variantou eliminace nadhodnocené viability, díky absorpci interferujících MMPs, bylo proměření absorbancí samotných MMPs. Absorbance koncentrací částic 0,1 – 1000 µg/ml (v kvadrupletu) se odečetly od absorbancí jamek s buňkami a částicemi. Rozdíl mezi výsledky s odečtem samotných MMPs při vyhodnocení a výsledky, kdy se MMPs odmyvaly PBS, je v průměru 0,8 %. Graf 2 tuto skutečnost porovnává. Lze říci, že se jedná o velmi podobné výsledky. Z ekonomického hlediska bylo tedy zbytečné plýtvat MMPs a samostatně je zařazovat do schématu destičky.

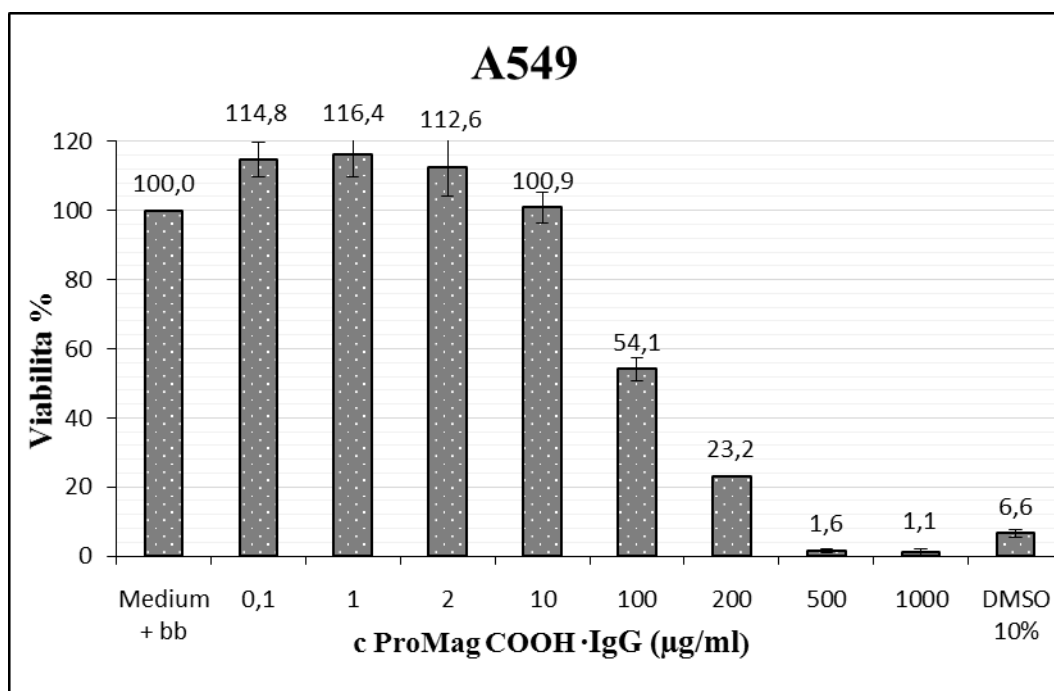


**Graf 2:** Porovnání viability buněčné linie A549 po expozici ProMag™ 1 Series · COOH v koncentracích 0,1 – 1000 µg/ml s odlišným způsobem postupu před vyhodnocením. Negativní kontrola buňky bez ovlivnění MMPs, mrtvé buňky 10 % DMSO. Typ použitého stanovení: XTT.

#### 4.1.2 Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH s vázaným IgG na buněčnou linii A549

Viabilita buněčné linie A549, která byla ovlivněna přítomností MMPs ProMag™ 1 Series · COOH s vázanou molekulou IgG v kultivačním médiu, je znázorněna v Grafu 3. V přítomnosti takto modifikovaných MMPs lze pozorovat zvýšenou viabilitu u koncentrace částic 0,1 – 10 µg/ml oproti kontrole. I přes počáteční stimulaci je opět vidět zjevný pokles viability u koncentrace částic 100 µg/ml a 200 µg/ml.

V práci Kučírkové a kol. (2015) také zaznamenali mírnou stimulaci buněčné profilerace u linie A549 v oblasti nízkých koncentrací nanočástic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1 µg/ml a 5 µg/ml. Rozdíl je, že v našich experimentech ke stimulaci dochází pouze u částic s navázanou protilátkou IgG. U částic bez protilátky nepřesáhla viabilita, v rozmezí těchto koncentrací, negativní kontrolu. Při experimentech s nanočásticemi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> obalenými vrstvou SiO<sub>2</sub> pozorovali významný cytotoxický efekt. Prkazatelný negativní vliv modifikace s SiO<sub>2</sub> nepodpořil jejich záměr povrchovou modifikací zvýšit biokompatibilitu částic (Kučírková a kol., 2015).

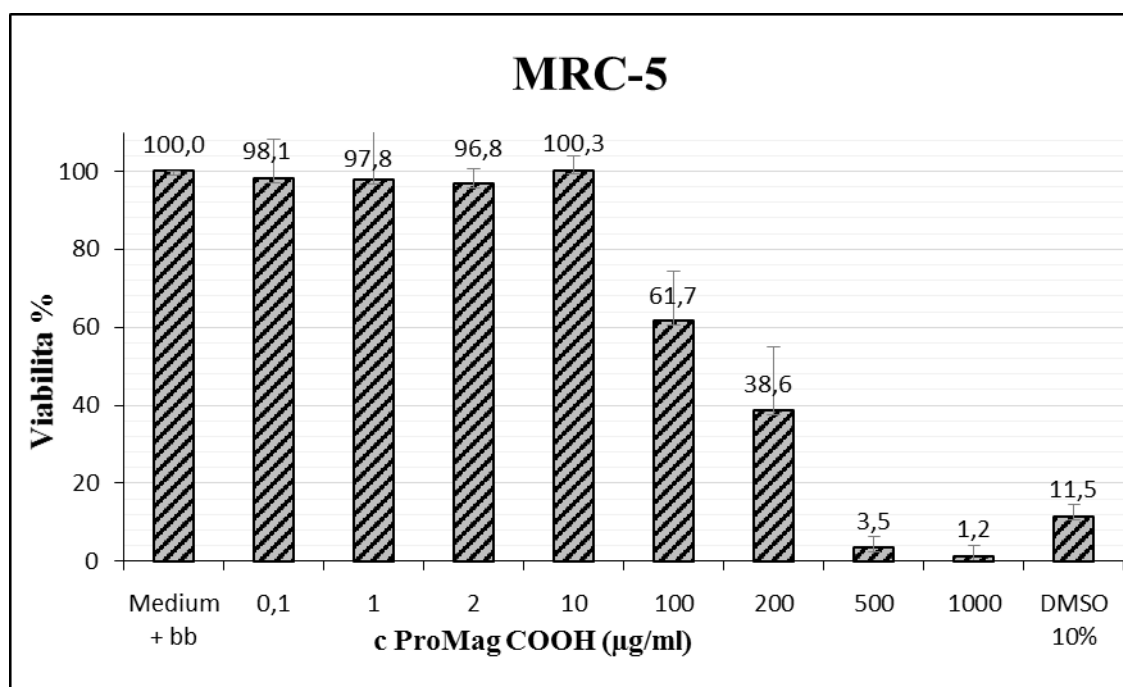


**Graf 3:** Analýza viability buněčné linie A549 po expozici ProMag™ 1 Series · COOH · IgG v koncentracích 0,1 – 1000 µg/ml. Negativní kontrola buňky bez ovlivnění MMPs, mrtvé buňky 10 % DMSO. Typ použitého stanovení: XTT.

#### 4.1.3 Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH na buněčnou linii MRC-5

Viabilita buněčné linie MRC-5, která byla po dobu 24 hodin ovlivněna přítomností MMPs ProMag™ 1 Series · COOH, je znázorněna v Grafu 4. Při koncentraci MMPs 0,1 - 10 µg/ml lze podobně jako u buněčné linie A549 pozorovat nezměněnou viabilitu oproti negativní kontrole. V experimentech Radu a kol. (2015), také po 24 hodinové expozici Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNPs o koncentraci 2,5 µg/ml – 12 µg/ml nezaznamenali pokles viability buněk MRC-5 oproti kontrole. Nicméně po 72 hodinové expozici již mírný pokles byl. Naproti tomu studie Dorniani a kol. (2014) nevypozorovala ani po 72 hodinové expozici MNPS žádný pokles viability buněk MRC-5 pro koncentrace Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNPs 0,78 - 25 µg/ml. Naopak docházelo k mírné stimulaci proliferace.

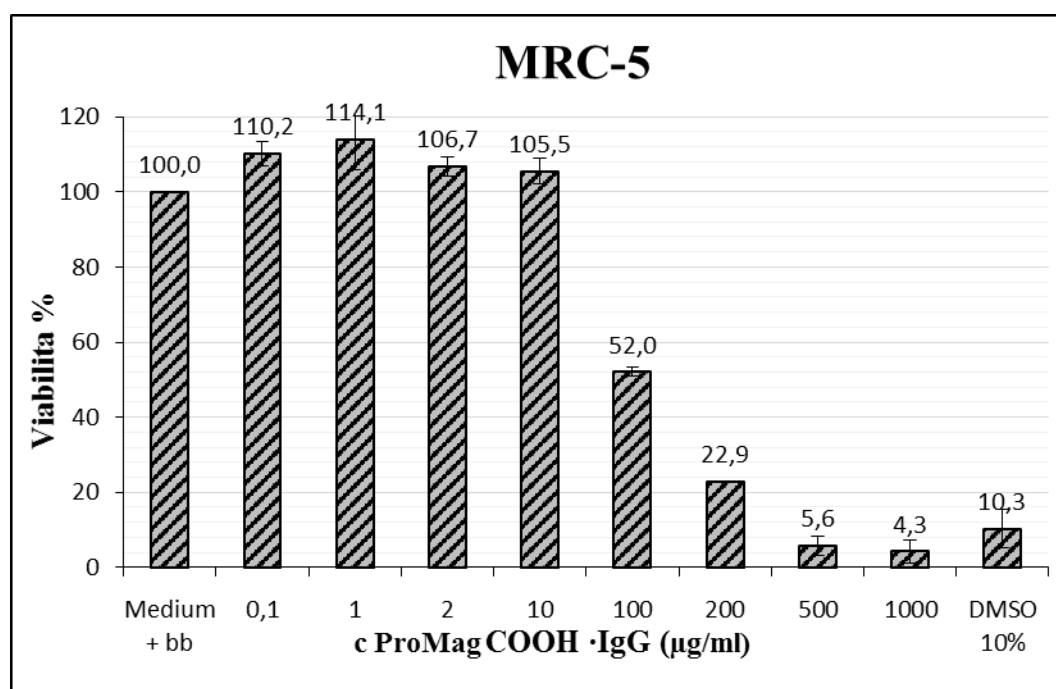
V grafu 4 lze dále pozorovat pokles viability buněk MRC-5 po expozici MMPs u koncentrace částic 100 µg/ml, 200 µg/ml a silně toxický efekt s téměř nulovou viabilitou u koncentrace 500 µg/ml.



**Graf 4:** Analýza viability buněčné linie MRC-5 po expozici ProMag™ 1 Series · COOH v koncentracích 0,1 – 1000 µg/ml. Negativní kontrola buňky bez ovlivnění MMPs, mrtvé buňky 10 % DMSO. Typ použitého stanovení: XTT.

#### 4.1.4 Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH s vázaným IgG na buněčnou linii MRC-5

V Grafu 5 je znázorněn vliv působení MMPs ProMag™ 1 Series · COOH, s navázanou molekulou IgG na viabilitu buněčné linie MRC-5. V přítomnosti takto modifikovaných MMPs lze pozorovat zvýšenou viabilitu u koncentrace částic 0,1 - 10 µg/ml oproti kontrole. I přes počáteční stimulaci je opět vidět zjevný pokles viabilit u koncentrace částic 100 µg/ml a 200 µg/ml. Avšak v porovnání MMPs bez protilátky došlo u těchto koncentrací k ještě většímu poklesu viability. Adherence buněčné linie MRC-5 nebyla tak výrazná. Proto je možné, že při zvyšující se koncentraci MMPs, kdy rostla pravděpodobnost vzniku agregátů částic a jejich adherence na povrch buněk, bylo část buněk při proplachu PBS odmyto. Sledování viability v reálném čase systémem xCELLigence naopak ukázalo, že u MMPs s vázanou protilátkou IgG o koncentraci 100, 200 i 500 µg/ml byly všechny tyto ovlivněné buňky stimulovány k proliferaci.



**Graf 5:** Analýza viability buněčné linie MRC-5 po expozici ProMag™ 1 Series · COOH · IgG v koncentracích 0,1 – 1000 µg/ml. Negativní kontrola buňky bez ovlivnění MMPs, mrtvé buňky 10 % DMSO. Typ použitého stanovení: XTT

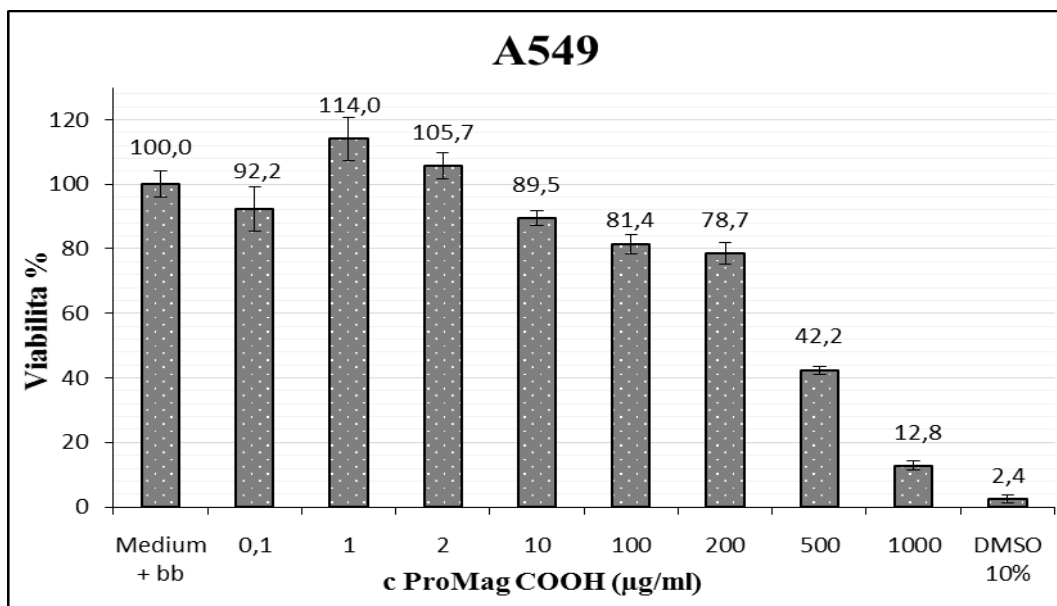


## 4.2 Stanovení viability buněk v Bürkerově komůrce s trypanovou modří

### 4.2.1 Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH na buněčnou linii A549

K porovnání výsledků cytotoxických účinku MMPs oxidů železa ProMag™ 1 Series · COOH na buněčnou linii A549, byl mimo jiné použit test vylučování trypanové modře testovanými buňkami. Bezbarvé živé buňky a modře obarvené mrtvé buňky byly výsledkem 24 hodinového ovlivnění buněk A549 částicemi v koncentračním rozmezí 0,1 – 1000 µg/ml. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce a to v 6 velkých zorných polích pro každou koncentraci. Pro 100 % viabilitu byla použita pozitivní kontrola neovlivněných buněk. Negativní kontrolou byly mrtvé buňky ovlivněné 10 % DMSO. Do Grafu 6 byly zaneseny zprůměrované hodnoty přepočítané na procentuální zastoupení viabilních buněk.

Mírný pokles viability od koncentrace částic 10 µg/ml je znázorněn v Grafu 6. Vysvětlením nižší hodnoty viability oproti XTT může být skutečnost, že trypanová modř má sama o sobě silné cytotoxické účinky, pokud měření trvá déle než 5 minut (Altman a kol., 1993). Výrazné poškození buněčné membrány ovlivněných buněk A 549 bylo možné pozorovat až od hodnoty 500 µg/ml (viz Graf 6).



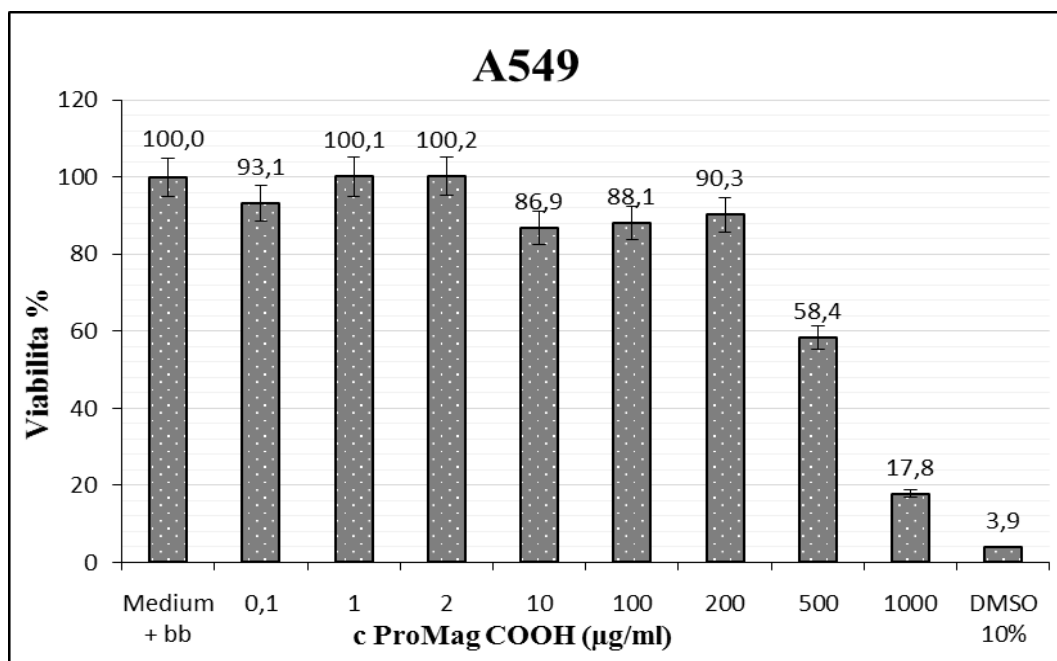
**Graf 6:** Analýza viability buněčné linie A549 po expozici ProMag™ 1 Series · COOH v koncentracích 0,1 – 1000 µg/ml. Negativní kontrola buňky bez ovlivnění MMPs, mrtvé buňky 10 % DMSO. Typ použitého stanovení: Trypanová modř.

### 4.3 Stanovení viability buněk tzv. metodou „Electric Current Exclusion“

#### 4.3.1 Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH na buněčnou linii A549

Technikou pracující na odlišném principu (Electric Current Exclusion) než ostatní provedené testy, byl analyzován počet viabilních buněk linie A549 po ovlivnění MMPs ProMag™ 1 Series · COOH. Pozitivní kontrola se silně cytotoxickými účinky na buňky byla s přidavkem s 10 % DMSO kontrolou. Negativní kontrolou byly neovlivněné buňky (100 % viabilita). Doba předchozí expozice MMPs na buněčnou linii A549 byla 24 hodin.

V Grafu 8 lze u koncentrace 200 µg/ml stále ještě pozorovat viabilitu okolo 90 %. Buňky do těchto koncentrací částic celkem dobře odolávaly nízkému napětí. Cytotoxicita se výrazněji projevuje až při 500 µg/ml. Tehdy se rozpadlé buňky již nechovají jako elektrický izolátor. V porovnání s hodnotami viabilit při použití trypanové modře, jsou výsledky podobné. U obou metod totiž dochází ke zlomovému poklesu viability při koncentraci částic 500 µg/ml.



**Graf 7:** Analýza viability buněčné linie A549 po expozici ProMag™ 1 Series · COOH v koncentracích 0,1 – 1000 µg/ml. Negativní kontrola buňky bez ovlivnění MMPs, mrtvé buňky 10 % DMSO. Typ použitého stanovení: Přístroj CASY TT Cell Counter (Electric Current Exclusion).

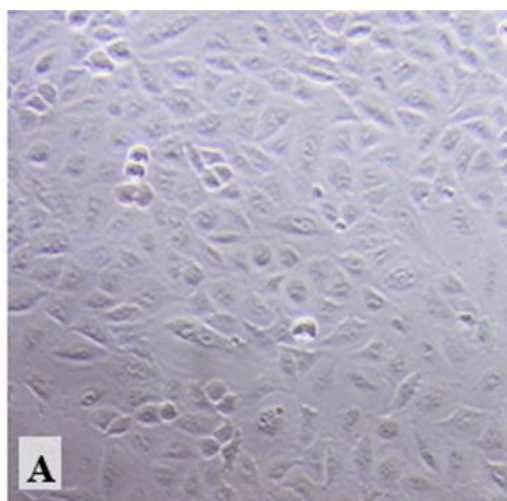
## 4.4 Mikroskopické pozorování efektu magnetických nano/mikročásteček na vybranou buněčnou linii

### 4.4.1 Studium vlivu mikročástic ProMag™ 1 Series · COOH na buněčnou linii A549

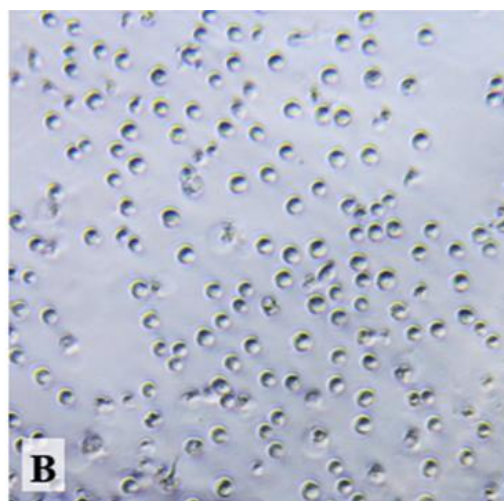
Pomocí světelného mikroskopu a fotoaparátu Canon byly pořízeny fotografie buněčné linie A549 po 24 hodinové expozici magnetickými mikročásticemi ProMag™ 1 Series · COOH. Pro tyto doplňkové informace o fyziologickém a morfologickém stavu buněk byl použit fázový kontrast při zvětšení 200x. Buňky s MMPs byly foceny ihned po vyndání z inkubátoru, kde se inkubovaly s MMPs.

Na Obrázku 15 (A) negativní kontroly lze vidět monovrstvu velkého počtu živých proliferujících buněk v dobrém stavu. Jsou adherované s protáhlým vzhledem. Buňky (B) ovlivněné 10 % DMSO považované za mrtvé, jsou skutečně deadherované, zmenšily svou velikost a tvar v kulovitý. Jednoznačný inhibiční účinek a blokace proliferace jsou zjevné. Buňky (C) byly ovlivněny MMPs, avšak k žádnému výraznému úbytku viabilních buněk oproti kontrole nedošlo. U 10 µg/ml MMPs lze zřetelně pozorovat jejich intracelulární depozit. Prostup buněčnou membránou se uskutečnil. A to jak u viabilních tak u mrtvých buněk. Projevuje se zde slabá cytotoxicita, která roste se zvyšující se koncentrací. Naše pozorování koreluje s výsledky testů ostatních. Mikroskopické obrázky Kolářové a kol. (2013) také dokazují intracelulární prostup. Částice kopírovaly tvar buňky a jádra. Svatáková a kol. (2012) ve své práci uvádí, jak pomocí videa zachytili buněčnou inkorporaci SPIONs magnetitu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> v koncentraci 50 µg/ml. Při buněčném cyklu dělení se částice předávaly společně s cytoplazmou. Metodou skenovací elektronové mikroskopie (SEM) názorně ukázali, že však nanočástice nejsou lokalizovány uvnitř jádra.

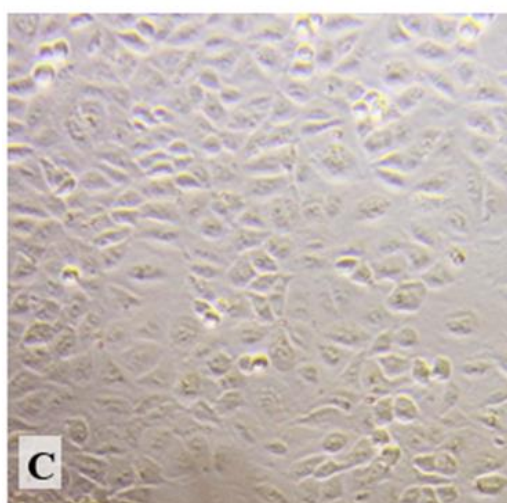
Při koncentraci 500 µg/ml, část našeho obrázku (E), agregované MMPs již překrývají buňky, což znesnadňuje vyhodnocení. Navíc jsou adherované na povrch buněk. Radikální úbytek živých buněk či fakt, že jsou buňky poškozeny, je zjevný. V části obrázku (F) při koncentraci 1000 µg/ml je počet částic tak hojný, že výrazná cytotoxicita nezanechala žádnou buňku viabilní. Navíc stejně jako u koncentrace částic 500 µg/ml je velmi dobře viditelná agregace.



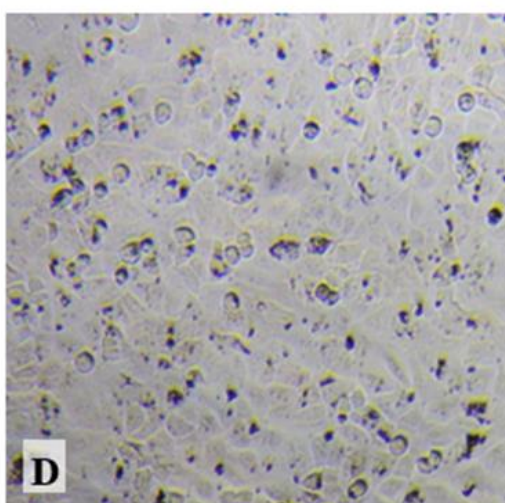
**A**  
Negativní kontrola (bb+medium)



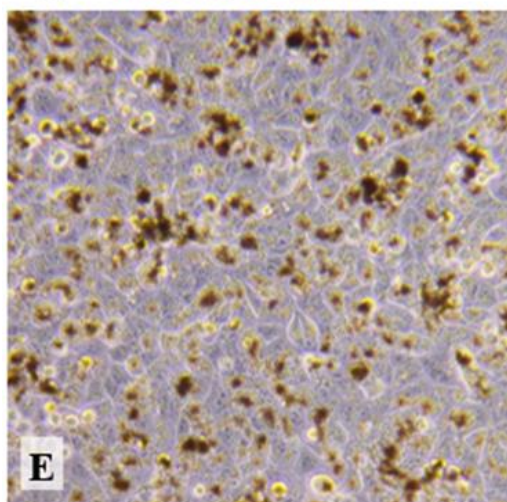
**B**  
10% DMSO (mrtvé buňky)



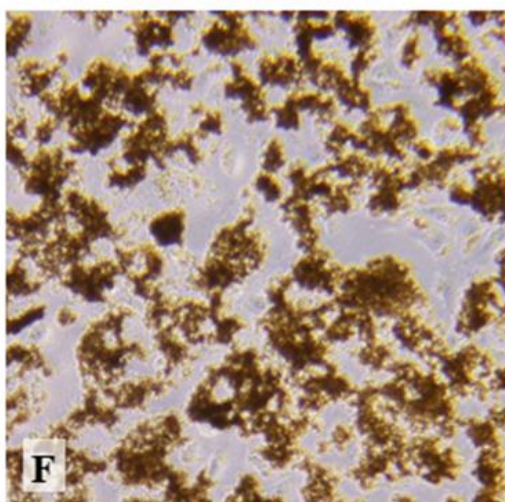
**C**  
2 µg/ml ProMag™ 1 Series · COOH



**D**  
10 µg/ml ProMag™ 1 Series · COOH



**E**  
500 µg/ml ProMag™ 1 Series · COOH



**F**  
1000 µg/ml ProMag™ 1 Series · COOH

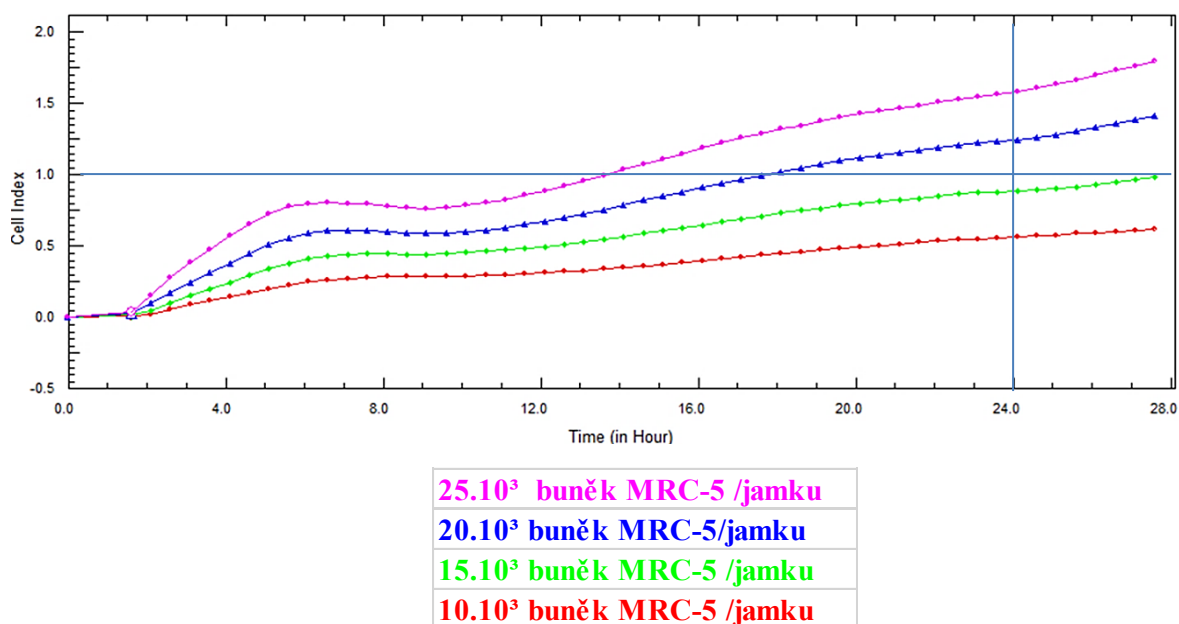
**Obrázek 15:** Mikrofotografie buněčné linie A549 ovlivněné magnetickými mikročásticemi magnetitu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ProMag™ 1 Series · COOH. Na obrázku (A) jsou neovlivněné buňky negativní kontroly, (B) mrtvé buňky ovlivněné 10 % DMSO, (C) ovlivněné 2 µg/ml, (D) 10 µg/ml, (E) 500 µg/ml, (F) 1000 µg/ml, foceno fázovým kontrastem se zvětšením 200x.

## 4.5 Analýza buněčné cytotoxicity magnetických nano/mikročásteč v reálném čase systémem xCELLigence

### 4.5.1 Studium vlivu mikročásteč ProMag™ 1 Series · COOH a ProMag™ 1 Series · COOH s navázaným IgG na buněčnou linii MRC-5

Přístrojem xCELLigence RTCA SP (Roche, Švýcarsko) byla v E-destičce proměřena proliferační a antiproliferační buněčná aktivita. U buněčné linie MRC-5 se nejdříve zoptimalizoval počáteční počet nasazených buněk na  $17 \cdot 10^3$  buněk/jamku.

Z Grafu 8 lze odhadnout optimální počáteční koncentraci buněk pro ovlivnění při  $CI = 1$ , v čase 24. hodina od nasazení buněk do destičky. Jedná se o rozmezí mezi  $15 - 20 \cdot 10^3$  buněk/jamku. Dle těchto výsledků se zvolila pipetovaná koncentrace  $17,5 \cdot 10^3$  buněk/jamku.



**Graf 8:** Optimalizace počáteční koncentrace buněk MRC-5/jamku. Růstové křivky v koncentracích  $10 \cdot 10^3$ ,  $15 \cdot 10^3$ ,  $20 \cdot 10^3$ ,  $25 \cdot 10^3$  buněk/jamku. Kultivováno pouze v buněčném médiu, bez ovlivnění MMPs. Počet opakování na destičce: 5.

Fyziologický stav buněk, které byly ovlivněny MMPs, se odrážel na jejich adhezenci ke dnu jamek E-destičky se zlatými elektrodami. Viabilní buňky působily jako izolátory a zvyšovaly impedanci. Míra impedance se zaznamenávala jako Cell Index (CI).

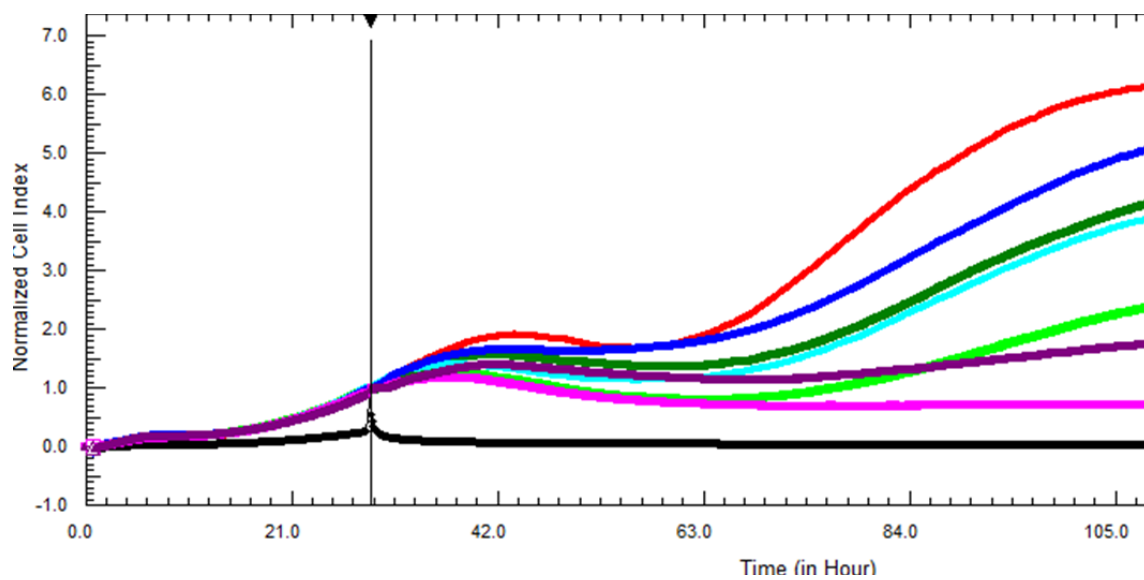
V čase přidání MMPs, měly ovlivňované buňky hodnotu buněčného indexu  $CI = 1$ . K této chvíli byl buněčný index normalizován a ostatní hodnoty se k tomuto času přepočítaly (normalizovaný buněčný index). Jednotlivé impedance v každé jamce jsou graficky uváděny právě jako normalizovaný buněčný index. Vzorec:

$$CI_{\text{normalizovaný}} = CI_{\text{čas}} \times CI_{\text{normalizovaný čas}}$$

Na buněčné linii MRC-5 je v Grafu 9 zobrazeno porovnání vlivu ProMag<sup>TM</sup>1 Series · COOH a ProMag<sup>TM</sup>1 Series · COOH · IgG. K expozici došlo po 29 hodin od nasazení buněk do E-destičky. Oba typy MMPs bez protilátky i s protilátkou byly testovány v rozsahu koncentrací částic 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml. V grafu jsou však pro přehlednost vybrány jen koncentrace 100, 200, 500 µg/ml. Výsledky jsou udávány jako aritmetický průměr z pěti opakování na destičce. Červenou křivkou je v grafu znázorněna přirozená proliferace negativní kontroly, kdy nedocházelo k ovlivnění MMPs. Černá křivka představuje 5 % DMSO kontrolu mrtvých buněk. Zde ihned, po začátku expozice 5 % DMSO, klesá hodnota normalizovaného indexu k nule. Vysoká cytotoxicita se projevuje okamžitým buněčným odumíráním.

Všechny uvedené koncentrace MMPs navázanou IgG protilátkou v Grafu 9 mají vyšší normalizovaný buněčný index; vyšší viabilitu ve srovnání s vlivem MMPs bez protilátky. Žádná však nepřevyšuje negativní kontrolu neovlivněných buněk. Nástup cytotoxického působení je u koncentrace 500 µg/ml již během 1. hodiny od ovlivnění. U koncentrací 100 a 200 µg/ml dochází k viditelnému poklesu viability oproti kontrole kolem 4. hodiny. Žádná další z testovaných koncentrací částic, kromě 500 µg/ml MMPs bez protilátky, se nedostává pod hodnotou normalizovaného buněčného indexu 1 (počátek expozice). Neovlivněné MRC-5 buňky negativní kontroly, které jsou pouze v médiu, přecházejí do exponenciální fáze po 61 hodinách od nasazení. Buňky negativní kontroly se od 35 hodiny dělí rychleji v porovnání s buňkami ovlivněnými částicemi. Strmost proliferačních růstových křivek v exponenciální fázi klesá a to se zvyšující

se koncentrací částic a typem MMPs bez protilátky (oproti MMPs s protilátkou). Obecně je zřetelný pozvolnější přechod do exponenciální fáze růstu u koncentrací částic 100 a 200  $\mu\text{g/ml}$ . A to minimálně o 4 až 8 hodin později než kontrola. U koncentrace MMPs bez protilátky 500  $\mu\text{g/ml}$  lze vyčíst, že buňky z lag fáze přecházejí rovnou do stacionární fáze již během prvních několika hodin od ovlivnění. Následně přecházejí do fáze deklinační; odumírání.



<b>NK-buňky MRC-5 bez částic</b>	<b>DMSO (5.00%)</b>
<b>ProMag_IgG (100 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>ProMag (100 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>ProMag_IgG (200 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>ProMag (200 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>ProMag_IgG (500 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>ProMag (500 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>

**Graf 9 :** Graf znázorňující změny proliferace buněk MRC-5. Křivky vykreslují tzv. normalizovaný buněčný index, který je v závislosti na čase zaznamenáván systémem xCELLigence. Jednotlivé koncentrace ProMag<sup>TM</sup>1 Series · COOH a koncentrace ProMag<sup>TM</sup>1 Series · COOH · IgG byly přidány v čase označeném svislou přímkou se šipkou. Barevné popisky jednotlivých křivek jsou pod grafem. Počet opakování na destičce: 5.

V závěru této kapitoly je nutné zmínit, že vzhledem k prostudované problematice není možné jednotlivé studie porovnávat navzájem. Většina studií totiž pracuje s konkrétními typy nano/mikročásteček, které jsou různě modifikované, za různých experimentálních podmínek nebo využívají metodicky odlišné testy stanovení cytotoxicity. Zejména pro *in vitro* testování existuje celá škála nenádorových primárních buněčných linií či nádorové buněčné linie s neomezeným počtem dělení. Výsledky buněčné cytotoxicity různých studií se tak mohou bez zohlednění odlišných faktorů a výchozích experimentálních podmínek výrazně lišit.

V obecném slova smyslu, lze pro srovnání uvést několik příkladů. Jedná se např. o studii, kde se studovala cytotoxicita MNPs s oxidy železa v podobném koncentračním rozmezí částic.

Balas a kol. (2017) zkoumali cytotoxicitu MNPs  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  potažených dextranem na buněčné linii Jurkat. Použili metodu s MTT. U koncentrace částic 56  $\mu\text{g/ml}$  byl po 48 hodinách pokles viability o 26 %. Po 72 hodinách se aktivita mitochondriální dehydrogenázy opět snížila o 35 % oproti kontrole. Koncentrace 14  $\mu\text{g/ml}$  neměla na buněčnou viabilitu vliv žádný (Balas a kol., 2017).

Pokles viability u potkaních lymfocytů sleziny ve studované koncentraci MNPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  100 – 800  $\mu\text{g/ml}$  v měřených intervalech (24, 48, 72 hodin) popsal Gaharwar a kol. (2017). U koncentrace částic 200  $\mu\text{g/ml}$  došlo po 24 hodinách k poklesu viability o 19 %, 48 hodinách o 26 %, 72 hodinách o 38 %. U koncentrace 800  $\mu\text{g/ml}$  po 24 hodinách snížení viability o 36 %, 48 hodinách o 49 %, 72 hodinách o 60 %. Navíc mimo jiné docházelo ke zvýšení hladin ROS, peroxidaci lipidů, poškození DNA, vyčerpání antioxidantních enzymů (Gaharwar a kol., 2017).

Pomocí metody aktivace procesu apoptózy formou měření aktivity kaspázy 3/7, byly v diplomové práci Kučírkové a kol. (2013) sledovány jednotlivé fáze buněčného cyklu linií A549 a HK-2. Výsledky testů pro koncentrace MNPs 25  $\mu\text{g/ml}$  a 100  $\mu\text{g/ml}$  nepotvrdily aktivaci kaspázy 3/7. Z toho autoři usuzují, že indukce apoptózy není přímou příčinou cytotoxického efektu. Předpokládají, že mechanismus podílející se výrazněji na cytotoxickém vlivu částic, je proces nekrózy buněk (Kučírková a kol., 2013).

Zhou a kol. (2017) provedli studii, kde testovali vliv ultra SPIONs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (velikost menší než 50 nm) o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  na psí kmenové buňky tukové tkáně (ADSCs). 12 hodinová inkubace s ultra SPIONs neovlivnila buněčnou aktivitu testovaných



buněk, tedy viabilitu nebo proliferaci a též tendenci buněk přecházet do apoptózy. ADSCs byly následně transplantovány do pokusného zvířete (myš). Z výsledků vyplynulo, že se dají buňky, nesoucí částice ultra SPIONs jako značku, použít pro neinvazivní a nepřetržité sledování jejich mobility v rámci organismu a to po dobu nejméně 12 týdnů (Zhou a kol., 2017).

## 5 ZÁVĚR

Hlavní náplní této práce bylo prostudovat problematiku potencionálního cytotoxického působení magnetických nano/mikročástic (MNPs/MMPs) na eukaryotní buňky. Experimentální část se proto zaměřila na stanovení cytotoxicity MMPs na bázi maghemitu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  s karboxylovou skupinou COOH. Konkrétně šlo o komerční částice ProMag<sup>TM</sup> 1 Series · COOH a jejich modifikovanou formu s navázanou protilátkou IgG. Jejich vliv na viabilitu buněčné linie lidského alveolárního adenokarcinomu plic A549 a nenádorové linie zdravých plicních fibroblastů MRC-5 se studoval pro rozmezí koncentrace částic MMPs 0,1 – 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

Při použití XTT testu založeného na měření aktivity mitochondriálních dehydrogenáz dýchacího řetězce buněk, byl pokles buněčné viability pozorován až od koncentrace MMPs 100  $\mu\text{g/ml}$ . Viabilita buněk A549 po ovlivnění MMPs byla pro c 100  $\mu\text{g/ml}$  = 55 %, c 200  $\mu\text{g/ml}$  = 34 %, c 500  $\mu\text{g/ml}$  = 7 %. U buněk MRC-5 byly hodnoty viabilit pro c 100  $\mu\text{g/ml}$  = 62 %, c 200  $\mu\text{g/ml}$  = 38 %, c 500  $\mu\text{g/ml}$  = 3,5 %. Bez cytotoxického efektu byly suspenze buněk ovlivněných částicemi o koncentračním rozmezí 0,1 - 10  $\mu\text{g/ml}$ . Což znamená, že se viabilita buněk A549 i MRC-5 pohybovala okolo 100 %. Navíc u MMPs s navázanou protilátkou IgG, v oblasti koncentrací MMPs 0,1 - 10  $\mu\text{g/ml}$ , docházelo u obou buněčných linií k přechodné a mírné stimulaci.

Další dvě metody monitorovaly stav a funkčnost buněčné membrány ovlivněných buněčných linií. Zda nebyla poškozená či porušená. Výsledky ze stanovení cytotoxicity pomocí vylučování trypanové modře i tzv. metodou Electric Current Exclusion (přístroj CASY) ukazovaly na výrazné poškození membrány až při vysoké koncentraci MMPs, tj. 500  $\mu\text{g/ml}$ . Fakt radikálního úbytku živých buněk potvrdily i naše mikroskopické snímky buněk s MMPs. Při této koncentraci MMPs byla také výrazná adherence na povrch buněk a docházelo k agregaci buněk.

Na základě našich výsledků jsme došli k závěru, že výsledky získané metodou XTT nejvíce korelovaly s hodnotami naměřenými systémem xCELLigence. Systém xCELLigence umožnil sledovat průběh působení MMPs v čase. Zde měly modifikované MMPs s navázanou molekulou IgG ve všech jamkách vyšší normalizovaný buněčný index než MMPs bez protilátky. Což znamená, že buňky byly skutečně stimulovány přítomností molekul IgG na povrchu částic. Avšak celkově trend klesající

viability od koncentrace MMPs 100  $\mu\text{g/ml}$  a zejména 200  $\mu\text{g/ml}$  se potvrdil i u těchto povrchově modifikovaných částic. U koncentrace 500  $\mu\text{g/ml}$  byl cytotoxický efekt výrazný již 1 hodinu po ovlivnění. Při této koncentraci MMPs docházelo u všech buněk k přechodu do stacionární fáze.

Kvalitní vyhodnocení dat vyžaduje zohlednit mnoho aspektů. Je velmi důležité dodržet stanovené časové intervaly, optimalizované postupy či pro experimenty nepoužívat buněčné kultury s vysokou pasáží. Pokud to podmínky dovolí, je žádoucí, zahrnout do experimentů různé metody a výsledky všech vzájemně porovnat. Systém xCelligence umožní díky kontinuálnímu sledování stanovit buněčnou viabilitu v jakémkoliv časovém intervalu, ale pouze pro adherentní buňky a jedná se o finančně nákladnější metodu. S levnější tzv. „end point“ analýzou (testem XTT), lze stanovit viabilitu i suspenzních buněk. Mikroskopie upřesní informace o morfologickém stavu buněk.

Otázka cytotoxicity MNPs a MMPs by měla být řešena pro konkrétní podmínky a účely. Pro definitivní odpověď toxického účinku MMPs je třeba více dlouhodobějších *in vivo* studií.

## SEZNAM ZDROJŮ

ACEA Bioscience, Inc., ©2017. xCELLigence® RTCA SP. *ACEA Bioscience, Inc* [online]. [vid. 2017-11-23]. Dostupné z: <https://www.aceabio.com/products/rtca-sp/>

ADAMAKI B., D. KARATZA, S. CHIANESE, D. MUSMARRA, E. METAXA, E. HRISTOFOROU. Super-Paramagnetic Nanoparticles: Manufacturing, Structure, Properties, Simulation, Applications. *Chemical Engineering Transactions*. 2016, 47, 79-84.

ALTMAN S. A., L. RANDERS, G. RAO; RANDERS, Lisa; RAO, Govind. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology progress*. 1993, 9(6), 671-674.

ALTAN C. L., B. GURTEN, R. SADZA, E. YENIGUL, N. A. J. M. SOMMERDIJK, S. BUCAK. Poly(acrylic acid)-directed synthesis of colloiddally stable single domain magnetite nanoparticles via partial oxidation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2016, 416, 366-372.

AMBUCHI J. J., Z. ZHANG, L. SHAN, D. LIANG, P. ZHANG, Y. FENG. Response of anaerobic granular sludge to iron oxide nanoparticles and multi-wall carbon nanotubes during beet sugar industrial wastewater treatment. *Water Research*. 2017, 117, 87-94.

BABIČ M. Dizertační práce: *Superparamagnetické nano- a mikročástice s hydrofilními povrchy*. Praha: Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta a Ústav makromolekulární chemie Akademie věd České republiky, 2012.

BALAS M., C. S. CIOBANU, C. BURTEA, M. S. STAN, E. BEZIRTZOGLU, D. PREDOI, A. DINISCHIOTU. Synthesis, Characterization, and Toxicity Evaluation of Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *Metals*. 2017, 7(2), 63.

BALDÍKOVÁ E., K. POSPÍŠKOVÁ, Z. MADĚROVÁ, M. ŠAFAŘÍKOVÁ, I. ŠAFAŘÍK. Příprava magnetických kompozitních materiálů: experimenty pro studenty středních škol. *Chemické Listy*. 2016, 110, 64-68.

Bang Laboratories, Inc, ©1996 - 2017. ProMag®. *Bang Laboratories, Inc* [online]. [vid. 2017-11-23]. Dostupné z: <http://www.bangslabs.com/products/magnetic-microspheres-particles/promag-particle-line>

BENZ M. Superparamagnetism: theory and applications. *Discussion of Two Papers on Magnetic Nanoparticles*. 2012, 1-27 [online]. [vid. 2017-11-23]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Sergei\\_Sergeenkov/post/How\\_to\\_calculate\\_superparamagnetic\\_relaxation\\_time/attachment/59d6339179197b80779913ec/AS:375364678373376@1466505321382/download/1302\\_Superparamagnetism\\_ManuelBenz.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sergei_Sergeenkov/post/How_to_calculate_superparamagnetic_relaxation_time/attachment/59d6339179197b80779913ec/AS:375364678373376@1466505321382/download/1302_Superparamagnetism_ManuelBenz.pdf)

BLANEY L. Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): Properties, Synthesis, and Applications. *The Lehigh Review*. 2007,15, paper 5, 49-51.

BOHARA R. A., N. D. THORAT, S. H. PAWAR. Role of functionalization: strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. *Royal Society of Chemistry*. 2016, 6(50), 43989-44012.

BORM P. J. A., W. KREYLING. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2004, 4(5), 521-531.

BRAYNER R. The toxicological impact of nanoparticles. *Nano Today*. 2008, 3(1), 48-55.

BRIDI R., J. PREBBLE, I. VITOUCH. *PROMAG – Improvements in casthouse processing using in – furnace and in – line refining systems*. Krasnoyarsk, Russia: International Congress and Exhibition „Non - Ferrous Metals - 2011“. 2011, 1-11.

BULIAKOVÁ B., M. MESÁROŠOVÁ, A. BÁBELOVÁ, M. ŠELC, V. NÉMETHOVÁ, L. ŠEBOVÁ, F. RÁZGA, M. URSÍNYOVÁ, I. CHALUPA, A. GÁBELOVÁ. Surface-modified magnetite nanoparticles act as aneugen-like spindle poison. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017, 13(1), 69-80.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA G, J. GOLIMOWSKI, P. L. URBAN. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste management*. 2009, 29(9), 2587-2595.

CABRERA M. P., P. E. C. FILHO, C. M. C. M. SILVA, R. M. OLIVEIRA, C. F. G. C. GERALDES, M. M. C. A. CASTRO, B. F. O. COSTA, M. S. C. HENRIQUES, J. A. PAIXÃO, L. B. CARVALHO, B. S. SANTOS, F. HALLWASS, A. FONTES, G. A. L. PEREIRA. Highly fluorescent and superparamagnetic nanosystem for biomedical applications. *Nanotechnology*. 2017, **28**(28), 285704-, 1-17.

CONDE J., J. T. DIAS, V. GRAZÃ, M. MOROS, P. V. BAPTISTA, J. M. DE LA FUENTE. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Frontiers in Chemistry*. 2014, 2(48), 1-28.

CORDOVA G., S. ATTWOOD, R. GAIKWAD, F. GU, Z. LEONENKO. Magnetic force microscopy characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). *Nano Biomedicine and Engineering*. 2014, 6(1), 31-39.

ČSN EN ISO 10993-5:2009. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, 2010.

DOHNALOVÁ L., DOHNAL V. Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické Listy*. 2015, 109, 444-450.

DORNIAN D., A. UMAR KURA, S. H. HUSSEIN-AL-ALI, M. ZOBIR BIN HUSSEIN, S. FAKARAZI, A. H. SHAARI, Z. AHMAD. In vitro sustained release study of gallic acid coated with magnetite-PEG and magnetite-PVA for drug delivery system. *The Scientific World Journal*. 2014,(2014), Article ID 416354, 1-11.

ESTELRICH J., E. ESCRIBANO, J. QUERALT, M. BUSQUETS. Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16(4), 8070-8101.

EVANS B. A., J. C. RONECKER, D. T. HAN, D. R. GLASS, T. L. TRAIN, A. E. DEATSCH. High-permeability functionalized silicone magnetic microspheres with low autofluorescence for biomedical applications. *Materials Science & Engineering C, Materials For Biological Applications*. 2016, 62, 860-9.

FILIPOVÁ Z., J. KUKUTSCHOVÁ, M. MAŠLÁŇ. Rizika nanomateriálů. *Univerzita Palackého v Olomouci*. 2012, 1-87.

FONTANA F., D. HIRVONEN, J. HIRVOREN, H. A. SANTOS. Delivery of therapeutics with nanoparticles: what's new in cancer immunotherapy? *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*. 2017, 9(1), 1-26.

FRIEDRICH R. P., C. JANKO, M. POETTLER, P. TRIPAL, J. ZALOGA, I. CICHA, S. DÜRR, J. NOWAK, S. ODENBACH, I. SLABU, M. LIEBL, L. TRAHMS, M. STAPF, I. HILGER, S. LYER, CH. ALEXIOU. Flow cytometry for intracellular SPION quantification: specificity and sensitivity in comparison with spectroscopic methods. *International Journal of Nanomedicine*. 2015, 10, 4185-4201.

GAHARWAR U. S., M. RAMOVATAR, P. RAJAMANI. Iron oxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in lymphocytes. *Journal of Applied Toxicology*. 2017, 37, 1232-1244

GARCÍA-JIMENO S., J. ESTELRICH, J. CALLEJAS-FERNÁNDEZ, S. ROLDÁN-VARGAS. Reversible and irreversible aggregation of magnetic liposomes. *Nanoscale*. 2017, 9(39), 15131-15143.

GHAZANFARI M. R., M. KASHEFI, S. F. SHAMS, M. R. JAAFARI. Perspective of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Role in Biomedical Applications. *Biochemistry Research International*. 2016, (2016), 1-32.

GILL SUKHMANN KAUR, G. SINGH, M. KHATRI. Synthesis and Characterization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Water Purification Applications. *Synthesis*, 2017, 4(4), 355-359.

GINER-CASARES J. J., M. HENRIKSEN-LACEY, M. CORONADO-PUCHAU, L. M. LIZ-MARZÁN. Inorganic nanoparticles for biomedicine: where materials scientists meet medical research. *Materials Today*. 2016, 19(1), 19-28.

GOODMAN J. T. Graduate Theses and Dissertations: Targeted nanovaccines against respiratory pathogens. Paper 15023. Iowa: Iowa State University, 2016.

GUPTA A. K., M. GUPTA. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005, 26(18), 3995-4021.

HEDGE K., S. K. BRAR, M. VERMA, R. Y. Surampalli. Current understandings of toxicity, risks and regulations of engineered nanoparticles with respect to environmental microorganisms. *Nanotechnology for Environmental Engineering*. 2016, 1(1), 5.

HOFMANN-AMTENBRINK M., B. RECHENBERG, H. HOFMANN. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Nanostructured Materials for Biomedical Applications*. 2009, 119–149.

HONG S. C., J. Ho LEE, J. LEE, H. Y. KIM, J. Y. PARK, J. CHO, J. LEE, D. W. HAN. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, 6, 3219-3231.

HORIKOSHI S., N. SERPONE. Introduction to nanoparticles. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*. 2013, 1-24.



ISSA B., I. OBAIDAT, B. ALBISS, Y. HAIK. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14(11), 21266-21305.

JILES D. Recent advances and future directions in magnetic materials. *Acta Materialia*. 2003, 51(19), 5907-5939.

JOHNSON I. and M. T. Z. SPENCE. The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. Thermo Fisher Scientific. 2010, 11, 655-738.

JOO S. H., D. ZHAO. Environmental dynamics of metal oxide nanoparticles in heterogeneous systems: A review. *Journal of hazardous materials*, 2017, 322, 29-47.

KAKAR Satinder, Deepa BATRA, Ramandeep SINGH a Ujjwal NAUTIYAL. Magnetic microspheres as magical novel drug delivery system: A review. *Journal of Acute Disease*. 2013, 2(1), 1-12.

KEERTHI P., T. LAKSHMI TEJA, D. DATTA, M. N. BABU, V. LAVAKUMAR, S. S. NEFEES. MAGNETIC MICROSPHERES- A NOBEL APPROACH. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013, 3(1), 320-323.

KHALIL I. S. M., H. ABASS, M. SHOUKRY, A. KLINGNER, R. M. EL-NASHAR, M. SERRY, S. MISRA. Robust and Optimal Control of Magnetic Microparticles inside Fluidic Channels with Time-Varying Flow Rates. *International Journal of Advanced Robotic Systems*. 2016, 13(3), 1-13

KIM D., A. E. HERR. Protein immobilization techniques for microfluidic assays. *Biomicrofluidics*. 2013, 7(4), 041501, 16,26,27.

KLAINÉ S. J., P. J. J. ALVAREZ, G. E. BATLEY, T. F. FERNANDES, R. D. HANDY, D. Y. LYON, S. MAHENDRA, M. J. McLAUGHLIN, J. R. LEAD. Nanomaterials in the

environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008, 27(9), 1825-1851.

KOLÁŘOVÁ M. Diplomová práce: *Optimalizace značení kmenových a fibroblastických buněk superparamagnetickými nanočásticemi oxidů železa*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta, 2013.

KRUKEMEYER, M. G., V. KRENN, F. HUEBNER, W. WAGNER, R. RESCH. History and possible uses of nanomedicine based on nanoparticles and nanotechnological progress. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 2015, 6(6), 1.

KUČÍRKOVÁ L. Diplomová práce: *Stanovení cytotoxicity magnetických nanočástic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>*. Pardubice: Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická, 2015.

LANDGRAF L., C. CHRISTNER, W. STORCK, I. SCHICK, I. KRUMBEIN, H. DÄHRINH, K. HAEDICKE, K. H. HERRMANN, U. TEICHGRÄBER, J. R. REICHENBACH, W. TREMEL, S. TENZER, I. HILGER. A plasma protein corona enhances the biocompatibility of Au@ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Janus particles. *Biomaterials*. 2015, 68, 77-88.

LEE B., Y. BAEK, M. LEE, D. H. JEONG, H. H. LEE, J. YOON, Y. H. KIM. A carbon nanotube wall membrane for water treatment. *Nature Communications*. 2015, 6, 7109.

LEI Ch., L. ZHANG, K. YANG, L. ZHU, D. LIN. Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. *Environmental Pollution*. 2016, 218, 505-512.

LI W., J. ZHOU, Y. XU. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical reports*, 2015, 3(5), 617-620.

LIN S., M. XUM W, ZHANG, X. HUA, K. LIN. Quantitative effects of amination degree on the magnetic iron oxide nanoparticles (MIONPs) using as adsorbents to remove aqueous heavy metal ions. *Journal of Hazardous Materials*. 2017, 335, 47-55.

LIU Y., D. L. PURICH, C. WU, T. CHEN, C. CUI, L. ZHANG, S. CANSIZ, W. HOU, Y. WANG, S. YANG, W. TAN. Ionic Functionalization of Hydrophobic Colloidal Nanoparticles To Form Ionic Nanoparticles with Enzymelike Properties. *Journal of the American Chemical Society*. 2015, 137(47), 14952-14958.

LUQUE-GARCIA J. L., R. SANCHEZ-DÍAZ, I. LOPEZ-HERAS, M. PILAR, C. CAMARA. Bioanalytical strategies for in-vitro and in-vivo evaluation of the toxicity induced by metallic nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 43, 254-268.

MA J., K. CHEN. Discovery of superparamagnetism in sub-millimeter-sized magnetite porous single crystals. *Physics Letters A*. 2016, 380(41), 3313-3318.

MAHDAVI M., M. B. AHMAD, M. J. HARON, F. NAMVAR, B. NADI, M. RAHMAN, J. AMIN. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Molecules*. 2013, 18(7), 7533-7548

MAHMOUDI M., S. SANT, B. WANG, S. LAURENT, T. SEN. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, 63(1-2), 24-46

MANIYA N. H., S. R. PATEL, Z. V. P. MURTHY. DRUG DELIVERY WITH POROUS SILICON FILMS, MICROPARTICLES, AND NANOPARTICLES. *Reviews on Advanced Materials Science*. 2016, 44(3), 257-272.

MANNOVÁ N. Bakalářská práce: *Vliv dopace gadolinia u nanočástic oxidů železa na cytotoxicitu zdravých buněčných linií*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta, 2016.

MARKIDES H., M. ROTHERHAM, A. J. EL HAJ. Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. *Journal of Nanomaterials*. 2012, (2012), 1-11.

MILLER M. R., J. B. RAFTIS, J. P. LANGRISH, S. G. McLEAN, P. SAMUTRTAI. Inhaled nanoparticles accumulate at sites of vascular disease. *American Chemical Society NANO*. 2017, 11(5), 4542.

MINAEVA O. V., E. P. BRODOVSKAYA, M. A. PYATAEV, M. V. GERASIMOV, M. N. ZHARKOV, I. A. YURLOV, O. A. KULIKOV, A. A. KOTLYAROV, L. A. BALYKOVA, A. V. KOKOREV, A. V. ZABOROVSKIY, N. A. PYATAEV, G. B. SUKHORUKOV. Comparative study of cytotoxicity of ferromagnetic nanoparticles and magnetite-containing polyelectrolyte microcapsules. *Journal of Physics: Conference Series, IOP Publishing*. 2017, 784(1), 012038.

MOHAMMED L., H. G. GOMMA, D. RAGAB, J. ZHU. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*. 2017, 30, 1-14.

MOKRÝ J. Česká společnost histo- a cytochemická. *Akademický bulletin*. 2010, 10 [online]. [vid. 2018-03-20]. Dostupné z: <http://abicko.avcr.cz/2010/10/08/>

Morag E., E. A. Bayer, M. Wilchek. Immobilized nitro-avidin and nitro-streptavidin as reusable affinity matrices for application in avidin-biotin technology. *Analytical Biochemistry*. 1996, 243(2), 257-263.

MÖLLER W., W. BARTH, M. KOHLHÄUFL, K. HÄUSSINGER, W. STAHLHOFEN, J. HEYDER. Human alveolar long-term clearance of ferromagnetic iron oxide microparticles in healthy and diseased subjects. *Experimental Lung Research*. 2001, 27(7), 547-568.

MUKHERJEE S., P. BANDYOPADHYAY. Magnetic microspheres: a latest approach in novel drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*. 2012, 1(5), 21-25.

MURUGAN K., D. DINESH, D. NATARAJ, J. SUBRAMANIAM, P. AMUTHAVALLI, J. MADHAVAN, A. RAJASEKAR, M. RAJAN, K. P. THIRUPPATHI, S. KUMAR, A. HIGUCHI, M. NICOLETTI, G. BENELLI. Iron and iron oxide nanoparticles are highly

toxic to *Culex quinquefasciatus* with little non-target effects on larvivoracious fishes. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017, 1-11.

NAGAOSA N., Y. TOKURA. Topological properties and dynamics of magnetic skyrmions. *Nature Nanotechnology*. 2013, 8(12), 899-911.

PANKHURST Q. A., J. CONNOLLY, S. K. JONES, J. DOBSON. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*. 2003, 36(13), 167-181.

PARHAM H., B. ZARGAR, R. SHIRALIPOUR. Fast and efficient removal of mercury from water samples using magnetic iron oxide nanoparticles modified with 2-mercaptobenzothiazole. *Journal of hazardous materials*. 2012, 205, 94-100.

PARIDA P., M. LOLAGE, A. ANGAL, D. RAUTARAY. Iron Oxide Nanoparticles to Remove Arsenic from Water. *Nanoscience in Food and Agriculture 4*. Springer International Publishing. 2017, 24, 279-299.

PEČOVÁ M., L. ZAJONCOVÁ, K. POLÁKOVÁ, J. ČUDA, M. ŠAFAŘÍKOVÁ, M. Šebela, I. Šafařík. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy*. 2011, 105(7), 524-530.

PELCLOVÁ D., V. ŽDÍMAL, P. KAČER, Z. FENCLOVÁ, Š. VLČKOVÁ, K. SYSLOVÁ, T. NAVRÁTIL, J. SCHWARZ, N. ZIKOVÁ, H. BAROŠOVÁ, F. TURCI, M. KOMARC, T. PELCL, J. BELACEK, J. KUKUTSCHOVA, S. ZAKHAROV. Oxidative stress markers are elevated in exhaled breath condensate of workers exposed to nanoparticles during iron oxide pigment production. *Journal of breath research*. 2016, 10(1), 016004.

PHENRAT T., T. C. LONG, G. V. LOWRY, B. VERONESI. Partial oxidation (“aging”) and surface modification decrease the toxicity of nanosized zerovalent iron. *Environmental science & technology*. 2008, 43(1), 195-200.

POLÁKOVÁ K. Magnetické nanočástice v medicíně. Výzkumné centrum nanomateriálů, Univerzita Palackého, Olomouc. *Pokročilé vzdělávání ve výzkumu a aplikacích nanomateriálů*. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: [https://www.google.cz/search?q=POL%20KOV%20Kate%20ina.+Magnetick%C3%A9+nano%20%C3%A1stice+v+medic%C3%A1n%C4%9B&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b&gfe\\_rd=cr&ei=8LABWdO3GPTf8gfl16KYDA](https://www.google.cz/search?q=POL%20KOV%20Kate%20ina.+Magnetick%C3%A9+nano%20%C3%A1stice+v+medic%C3%A1n%C4%9B&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b&gfe_rd=cr&ei=8LABWdO3GPTf8gfl16KYDA).

POLIEVKOVÁ E. Bakalářská práce: *Magnetické částice jako analytický nástroj v medicíně*. Brno: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií Vysokého učení technického v Brně, 2012.

POLLER J .M., J. ZALOGA, E. SCHREIBER, H. UNTERWEGER, CH. JANKO, P. RADON, D. EBERBECK, L. TRAHMS, CH. ALEXIOU, R. P. FRIEDRICH. Selection of potential iron oxide nanoparticles for breast cancer treatment based on in vitro cytotoxicity and cellular uptake. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, 3207-3220.

RADU M., D. DINU, C. SIMA, R. BURLACU, A. HERMENEAN, A. ARDELEAN, A. DINISCHIOTU. Magnetite nanoparticles induced adaptive mechanisms counteract cell death in human pulmonary fibroblasts. *Toxicology in Vitro*. 2015, 29(7), 1492-1502.

RAHMAN L., N. R. JACOBSEN, S. A. AZIZ, D. WU, A. WILLIAMS, C. L. YAUK, P. WHITE, H. WALLIN, U. VOGEL, S. HALAPPANAVAR. Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and pro-fibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2017, 823, 28-44.

RAJPUT S., L. P. SINGH, CH. U. PITTMAN, D. MOHAN. Lead (Pb 2+) and copper (Cu 2+) remediation from water using superparamagnetic maghemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles synthesized by Flame Spray Pyrolysis (FSP). *Journal of colloid and interface science*. 2017, 492, 176-190.

ROTHEN-RUTISHAUSER B., C. MÜHLFELD, F. BLANK, C. MUSSO, P. GEHR. Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles

and nanoparticles in an epithelial airway model. *Particle and Fibre Toxicology*. 2007, 4(9).

RUFFERT C. Magnetic bead—Magic bullet. *Micromachines*. 2016, 7(2), 21.

SAFARIK I., M. SAFARIKOVA. Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chemical Papers*. 2009, 63(5), 495-505.

SAJID M., M. ILYAS, CH., BASHEER, M. TARIQ, M. DAUD, N. BAIG, F. SHEHZAD. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, 22(6), 4122-4143.

SALAFI T., K. K. ZEMING, Y. ZHANG. Advancements in microfluidics for nanoparticle separation. *Lab on a Chip*. 2017, 17(1), 11-33.

SHARMA V. K., J. FILIP, R. ZBORIL, R. S. VARMA. Natural inorganic nanoparticles – formation, fate, and toxicity in the environment. *Royal Chemical Society Reviews*. 2015, 44(23), 8410-8423.

SHUKLA S., U. KUMAR, A. PRAKASH, V. K. JAIN. An artificial neural network (ANN)-based framework for the Cr removal from the spiked water samples by chitosan oligosaccharide-coated iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology for Environmental Engineering*. 2017, 2(1), 6, 1-11.

SINGH N., G. J. S. JENKINS, R. ASADI, S. H. DOAK. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*. 2010, 1(1), 5358

SRBOVÁ J. Disertační práce: *Biofunkcionalizace moderních materiálů pro afinitní separace a biokatalýzu*. Pardubice: Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická, 2015.

SUTENS B., T. SWUSTEN, K. ZHONG, J. K. JOCHUM, M. J. BAEL, E. V. EYCKEN, W. BRULLOT, M. BLOEMEN, T. VERBIEST. Tunability of Size and Magnetic Moment of Iron Oxide Nanoparticles Synthesized by Forced Hydrolysis. *Materials*. 2016, 9(7), 554.

SVATÁKOVÁ M. Diplomová práce: *In vitro studie mezenchymálních kmenových buněk značených magnetickými nanočásticemi*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta, 2012.

SVATÁKOVÁ M., K. POLÁKOVÁ, J. SKOPALÍK, V. BŘEZINA, J. NEBESAROVÁ, R. ZBOŘIL. LIVE IN VITRO MONITORING OF STEM CELL LABELING PROCESS BY SPIO NANOPARTICLES USING ADVANCED MICROSCOPIC TECHNIQUES. Brno: *4. ročník mezinárodní konference NANOCON 2012*. 2012.

STERNER O. Chemistry, Health and Environment. Second, completely revised edition. *Weinheim: Wiley-Blackwell*. 2010, 185-186.

SWANE. E. L., M. J. MESCHER, W. F. SEWELL, S. L. TAO, J. T. BORENSTEIN. Inner ear drug delivery for auditory applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2008, 60(15), 1583-1599.

SZEKERES M., I. Y. TÓTH, R. TURCU, E. TOMBÁ CZ. The effect of polycarboxylate shell of magnetite nanoparticles on protein corona formation in blood plasma. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2017, 427, 95-99.

ŠVANDOVÁ E. Disertační práce. *Buněčné a molekulární mechanismy během vývoje zubů a kostí se zaměřením na funkce kaspáz*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2014.



TAKAGI S., M. L. MCFADDEN, R. E. HUMPHREYS, B. A. WODA, T. SAIRENJI. Detection of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdUrd) incorporation with monoclonal anti-brdurd antibody after deoxyribonuclease treatment. *Cytometry Part A*. 1993, 14(6), 640-648.

TAZE Ch., I. PANETAS, S. KALOGIANNIS, K. FEIDANTISIS, G. P. GALLIOS, G. KASTRINAKI, A. G. KONSTANDOPOULOS, M. VÁCLAVÍKOVÁ, L. IVANICOVÁ, M. KALOYIANN. Toxicity assessment and comparison between two types of iron oxide nanoparticles in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. 2016, 172, 9-20.

THANH N. T. K. Magnetic nanoparticles: from fabrication to clinical applications. *CRC press*. 2012.

THANH N. T. K. Clinical Applications of Magnetic Nanoparticles. *CRC Press*. 2018.

TUČEK J. Úvod do magnetismu, vod magnetické vlastnosti materiálů a magnetické jevy v nanosvětě. Olomouc: *Nanosystémy-Workshop 14.4.2010*. 2010.

UMASHANKAR A., M. J. CORENBLOM, S. RAY, M. VALDES, E. S. YOSHIMARU, T. P. TROUARD, L. MADHAVAN. Effects of the iron oxide nanoparticle Molday ION Rhodamine B on the viability and regenerative function of neural stem cells: relevance to clinical translation. *International journal of nanomedicine*. 2016, 11, 1731-1748.

URCAN E., U. HAERTEL, M. STYLLOU, R. HICKEL, H. SCHERTHAN, F. X. REICH. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *dental materials*. 2010, 26(1) 51-58.

VADIVALAGAN CH., P. KARTHIKA, K. MURUGAN, CH. PANNEERSELVAM, P. D. SERRONE, G. BENELLI. Exploring genetic variation in haplotypes of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) through DNA barcoding. *Acta Tropica*. 2017, 169, 43-50.

VALDIGLESIAS V., G. KILIÇ, C. COSTA, N. FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, E. PÁSARO, J. P. TEIXEIRA, B. LAFFON. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2015, 56(2), 125-148.

VALDIGLESIAS V., N. FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, G. KILIÇ, C. COSTA, S. COSTA, S. FRAGA, M. J. BESSA, E. PÁSARO, J. P. TEIXEIRA, B. LAFFON. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2016, 38, 53-63.

VEISEH O., J. W. GUNN, M. ZHANG. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, 62(3), 284-304.

WANG J., Y. CHEN, B. CHEN, J. DING, G. XIA, CH. GAO, J. CHENG, N. JIN, Y. ZHOU, Y. LI, M. TANG, X. M. WANG. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in mice. *International Journal of Nanomedicine*. 2010,5,861-866.

WANG G., W. REN, H. R. TAN, Y. LIU. Carbon nanoparticle-modified multi-wall carbon nanotubes with fast adsorption kinetics for water treatment. *Nanotechnology*. 2017, 28(8), 085703.

WANG S., H. YU, J. K. WICKLIFFE. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. *Toxicology in Vitro*. 2011, 25(8), 2147-2151.

WANG P., Y. QU, C. LI, L. YIN, C. SHEN, S. YANG, X. BIAN, D. FANG. Bio-functionalized dense-silica nanoparticles for MR/NIRF imaging of CD146 in gastric cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2015, 10, 749-763.

WILLIAMS T. A., J. LEE, C. A. DIEMLER, M. SUBIR. Magnetic vs. non-magnetic colloids – A comparative adsorption study to quantify the effect of dye-induced aggregation on the binding affinity of an organic dye. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016, 481, 20-27.

XU P., Z. SHEN, B. ZHANG, J. WANG, R. WU. Synthesis and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as calcium-responsive MRI contrast agents. *Applied Surface Science*. 2016, 389, 560-566.

YAH C. S., G. S. SIMATE, S. E. IYUKE. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2012, 25(2).

YAMAGISHI A., M. TANAKA, J. J. M. LENDERS, J. THIESBRUMMEL, N. A. J. M. SOMMERDIJK, T. MATSUNAGA, A. ARAKAKI. Control of magnetite nanocrystal morphology in magnetotactic bacteria by regulation of *mms7* gene expression. *Scientific Reports* . 2016, 6(1), article number 29785.

YANG W. J., J. H. LEE, S. C. HONG, J. LEE, J. LEE, D. W. HAN. Difference between toxicities of iron oxide magnetic nanoparticles with various surface-functional groups against human normal fibroblasts and fibrosarcoma cells. *Materials*. 2013, 6(10), 4689-4706.

YU M, S. HUANG, K. JUN YU, A. MORSS CLYNE. Dextran and polymer polyethylene glycol (PEG) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2D and 3D cell culture. *International journal of molecular sciences*. 2012, 13(5), 5554-5570.

ZHOU S., T. YIN, Q. ZOU, K. ZHANG, G. GAO, J.G. SHAPTER, P. HUANG, Q. FU. Labeling adipose derived stem cell sheet by ultrasmall super-paramagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and magnetic resonance tracking in vivo. *Scientific Reports*. 2017, 7, 42793

ZHU X., S. TIAN, Z. CAI. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Public Library of Science One*, 2012, 7(9), e46286.

## Obrázky:

ACEA Bioscience, Inc., ©2017. xCELLigence® RTCA SP. ACEA Bioscience, Inc [online]. [vid. 2017-11-23]. Dostupný z: <https://www.aceabio.com/products/rtca-sp/>

AMBUCHI J. J., Z. ZHANG, L. SHAN, D. LIANG, P. ZHANG, Y. FENG. Response of anaerobic granular sludge to iron oxide nanoparticles and multi-wall carbon nanotubes during beet sugar industrial wastewater treatment. *Water Research*. 2017, 117, 87-94.

BOHARA R. A., N. D. THORAT, S. H. PAWAR. Role of functionalization: strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. *Royal Society of Chemistry*. 2016, 6(50), 43989-44012.

ESTELRICH J., E. ESCRIBANO, J. QUERALT, M. BUSQUETS. Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16(4), 8070-8101.

GE Y., O HECZKO, O. SÖDERBERG, S. P. HANNULA, V. K. LINDROOS. Investigation of magnetic domains in Ni–Mn–Ga alloys with a scanning electron microscope. *Smart materials and structures*. 2005, 14(5), S211- S215.

HONG S. C., J. Ho LEE, J. LEE, H. Y. KIM, J. Y. PARK, J. CHO, J. LEE, D. W. HAN. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, 6, 3219-3231.

LIMAME R., A. WOUTERS, B. PAUWELS, E. FRANSEN, M. PEETERS, F. LARDON, O. WEVER, P. PAUWELS. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PloS one*. 2012, 7(10), e46536.

MEHRMOHAMMADI M, KY. YOON, M. QU, K. JOHNSTON, S. EMELIANOV. Enhanced pulsed magneto-motive ultrasound imaging using superparamagnetic nanoclusters. *Nanotechnology*. 2011, 22(4), 045502.

NAGAOSA N., Y. TOKURA. Topological properties and dynamics of magnetic skyrmions. *Nature Nanotechnology*. 2013, 8(12), 899-911.

OTIENO B. A., C. E. KRAUSE, J. F. RUSLING. Bioconjugation of Antibodies and Enzyme Labels onto Magnetic Beads. *Methods in enzymology. Academic Press*. 2016, 571, 135-150.

PAUNOVIĆ N., Z. V. POPOVIĆ, Z. D DOHČEVIĆ-MITROVIĆ. Superparamagnetism in iron-doped CeO<sub>2</sub>-y nanocrystals. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2012, 24(45), 456001.

RUFFERT C. Magnetic bead—Magic bullet. *Micromachines*. 2016, 7(2), 21.

TUČEK J. Úvod do magnetismu, vod magnetické vlastnosti materiálů a magnetické jevy v nanosvětě. Olomouc: *Nanosystémy-Workshop 14.4.2010*. 2010.

SINGH N., G. J. S. JENKINS, R. ASADI, S. H. DOAK. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*. 2010, 1(1), 5358

SZEKERES M., I. Y. TÓTH, R. TURCU, E. TOMBÁCZ. The effect of polycarboxylate shell of magnetite nanoparticles on protein corona formation in blood plasma. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2017, 427, 95-99.

URCAN E., U. HAERTEL, M. STYLLOU, R. HICKEL, H. SCHERTHAN, F. X. REICH. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *dental materials*. 2010, 26(1) 51-58.

VEISEH O., J. W. GUNN, M. ZHANG. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, 62(3), 284-304.

WANG J., Y. CHEN, B. CHEN, J. DING, G. XIA, CH. GAO, J. CHENG, N. JIN, Y. ZHOU, Y. LI, M. TANG, X. M. WANG. Pharmacokinetic parameters and tissue

distribution of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in mice. *International Journal of Nanomedicine*. 2010,5,861-866.

ZHOU G., JIN ZHANG, CH. PAN, N. LIU, Z. WANG, JUNFENG ZHANG. Enhanced Uptake of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles by Intestinal Epithelial Cells in a State of Inflammation. *Molecules*. 2017, 22, 1240.

# PŘÍLOHY

## Příloha 1. Vybraná experimentálně zjištěná data pomocí spektrofotometru PowerWave 340

- zdroj: vytvořeno autorem
- použito pro následné vyhodnocení toxicity vybraného materiálu na vybrané buněčné linie
- oblast absorpčního maxima 450 nm
- měřeno po 24 hodinové inkubaci (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) s magnetickými mikročásticemi
- použitá metoda: kolorimetrický test tetrazoliové soli XTT

bb A549: Mikročástice ProMag · COOH, měřeno 20. 4. 2016

- c částic = 2 µg/ml – 2500 µg/ml
- buňky se před přidáním činidla XTT nepromývaly pufrem PBS (tj. částice se před přidáním činidla XTT neodmývaly)
- 20.10<sup>3</sup> buněk A549/jamku

0 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,191	0,2	0,207	0,178	0,146	0,142	0,31	0,303	1,048	1,05	0,941	1,025
B	0,509	0,48	0,529	0,39	0,507	0,436	2,322	2,302	1,214	1,189	1,148	1,026
C	0,657	0,545	0,545	2,303	0,301	0,296	0,302	0,305	1,152	0,988	1,06	0,94
D	0,543	0,442	0,558	2,187	0,031	0,034	0,032	0,03	0,923	1,173	1,13	0,874
E	1,763	1,587	0,52	1,397	0,031	0,031	0,031	0,03	0,686	0,691	0,695	0,615
F	1,688	0,753	0,62	0,653	0,278	0,298	0,29	0,276	0,355	0,305	0,364	0,409
G	1,619	0,773	1,135	0,41	0,651	1,047	1,001	0,968	0,512	0,446	0,424	0,413
H	1,392	0,896	1,069	0,325	0,281	0,302	0,313	0,309	0,351	0,317	0,347	0,381

1 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,818	0,994	1,046	0,211	0,214	0,221	0,31	0,303	1,048	1,05	0,941	1,025
B	2,358	2,131	2,269	2,041	2,243	2,176	2,322	2,302	1,214	1,189	1,148	1,026
C	1,764	1,54	1,361	2,303	0,301	0,296	0,302	0,305	1,152	0,988	1,06	0,94
D	1,195	1,178	1,047	2,187	0,031	0,034	0,032	0,03	0,923	1,173	1,13	0,874
E	2,031	1,361	0,767	1,397	0,031	0,031	0,031	0,03	0,686	0,691	0,695	0,615
F	1,623	1,091	0,791	0,653	0,278	0,298	0,29	0,276	0,355	0,305	0,364	0,409
G	1,321	1,379	1,261	0,41	0,651	1,047	1,001	0,968	0,512	0,446	0,424	0,413
H	1,513	1,451	1,562	0,325	0,281	0,302	0,313	0,309	0,351	0,317	0,347	0,381

1,5 hodiny	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,151	1,443	1,527	0,269	0,25	0,276	0,31	0,303	1,048	1,05	0,941	1,025
B	3,257	2,999	3,151	2,856	3,133	3,109	2,322	2,302	1,214	1,189	1,148	1,026
C	2,36	2,078	1,815	2,303	0,301	0,296	0,302	0,305	1,152	0,988	1,06	0,94
D	1,501	1,499	1,25	2,187	0,031	0,034	0,032	0,03	0,923	1,173	1,13	0,874
E	2,155	1,327	0,827	1,397	0,031	0,031	0,031	0,03	0,686	0,691	0,695	0,615
F	1,726	1,117	0,788	0,653	0,278	0,298	0,29	0,276	0,355	0,305	0,364	0,409
G	1,38	1,416	1,205	0,41	0,651	1,047	1,001	0,968	0,512	0,446	0,424	0,413
H	1,477	1,42	1,449	0,325	0,281	0,302	0,313	0,309	0,351	0,317	0,347	0,381

bb A549: Mikročástice ProMag · COOH, měřeno 4. 5. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- buňky se před přidáním činidla XTT nepromývaly pufrem PBS
- v destičce také částice bez buněk (pouze v médiu)
- 20.10<sup>3</sup> buněk A549/jamku

0 hodina	bb + částice				částice				9	10	11	12
	1	2	3	4	5	6	7	8				
<b>A</b>	0,447	0,545	0,523	0,553	0,158	0,174	0,26	0,167	0,172	0,172	0,167	0,172
<b>B</b>	0,492	0,642	0,779	0,663	0,173	0,168	0,168	0,17	0,545	0,711	0,611	0,501
<b>C</b>	0,526	0,54	0,592	0,646	0,171	0,169	0,18	0,174	0,167	0,163	0,163	0,174
<b>D</b>	0,469	0,771	0,607	0,567	0,242	0,193	0,176	0,196	0,031	0,032	0,03	0,03
<b>E</b>	0,438	0,389	0,473	0,377	0,318	0,296	0,374	0,28	0,032	0,03	0,03	0,03
<b>F</b>	0,399	0,453	0,419	0,451	0,348	0,46	0,405	0,477	0,029	0,031	0,029	0,031
<b>G</b>	0,587	0,552	0,638	0,509	0,632	0,667	0,453	0,688	0,035	0,031	0,031	0,034
<b>H</b>	0,822	0,391	0,582	0,637	1,355	1,193	1,121	1,229	0,03	0,031	0,031	0,029

1 hodina	bb + částice				částice				9	10	11	12
	1	2	3	4	5	6	7	8				
<b>A</b>	1,814	1,714	1,966	1,814	0,219	0,216	0,222	0,215	0,224	0,229	0,235	0,255
<b>B</b>	2,017	2,147	2,004	1,944	0,203	0,21	0,213	0,213	1,966	2,304	2,051	1,921
<b>C</b>	1,757	1,993	1,939	2,071	0,217	0,214	0,223	0,22	0,223	0,233	0,237	0,257
<b>D</b>	1,896	2,038	2,113	2,101	0,252	0,235	0,224	0,245	0,031	0,032	0,03	0,03
<b>E</b>	1,261	1,049	1,176	1,273	0,368	0,301	0,38	0,335	0,032	0,03	0,029	0,029
<b>F</b>	1,023	0,875	1,037	0,897	0,324	0,598	0,592	0,601	0,029	0,03	0,028	0,033
<b>G</b>	0,648	0,776	0,826	0,81	0,742	0,827	0,698	0,717	0,035	0,032	0,03	0,034
<b>H</b>	0,707	1,451	1,185	1,073	1,169	1,246	1,888	1,447	0,03	0,031	0,032	0,03



bb A549: Mikročástice ProMag · COOH, měřeno 11. 5. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- 20.10<sup>3</sup> buněk A549/jamku
- buňky se před přidáním činidla XTT nepromývaly pufrem PBS

0 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,291	0,211	0,247	0,238	0,144	0,147	0,147	0,144	0,03	0,03	0,03	0,03
<b>B</b>	0,266	0,35	0,259	0,265	0,476	0,283	0,284	0,251	0,032	0,032	0,032	0,032
<b>C</b>	0,242	0,338	0,252	0,232	0,138	0,138	0,139	0,139	0,029	0,031	0,03	0,03
<b>D</b>	0,397	0,344	0,529	0,339	0,03	0,033	0,032	0,033	0,031	0,032	0,031	0,03
<b>E</b>	0,383	0,354	0,399	0,289	0,03	0,03	0,03	0,032	0,03	0,03	0,03	0,03
<b>F</b>	0,266	0,306	0,3	0,358	0,029	0,029	0,029	0,031	0,029	0,032	0,029	0,029
<b>G</b>	0,912	0,645	0,671	0,669	0,031	0,031	0,031	0,032	0,031	0,033	0,032	0,03
<b>H</b>	1,183	1,204	0,993	0,688	0,029	0,029	0,029	0,029	0,03	0,029	0,029	0,029

1 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	2,041	2,073	2,052	2,069	0,198	0,203	0,208	0,221	0,029	0,03	0,03	0,03
<b>B</b>	2,256	2,154	1,828	1,844	2,144	2,024	2,086	2,08	0,031	0,031	0,031	0,031
<b>C</b>	2,003	2,199	1,922	1,785	0,199	0,238	0,235	0,215	0,029	0,03	0,029	0,028
<b>D</b>	2,436	2,207	2,272	2,088	0,03	0,033	0,036	0,034	0,03	0,03	0,029	0,031
<b>E</b>	1,778	1,836	1,56	1,644	0,03	0,03	0,03	0,032	0,03	0,029	0,029	0,029
<b>F</b>	1,001	1,073	0,868	1,114	0,029	0,029	0,03	0,03	0,028	0,031	0,029	0,028
<b>G</b>	0,831	0,63	0,796	0,605	0,031	0,031	0,031	0,032	0,031	0,033	0,031	0,029
<b>H</b>	0,794	0,909	0,532	0,581	0,032	0,029	0,029	0,029	0,031	0,029	0,031	0,028

bb A549: Mikročástice ProMag · COOH, měřeno 25. 5. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- 20.10<sup>3</sup> buněk A549/jamku
- buňky se před přidáním činidla XTT promývaly 2x pufrem PBS

bb MRC-5: Mikročástice ProMag · COOH, měřeno 25. 5. 2016

- optimalizace počtu nasazených MRC-5 buněk
- bez ovlivnění mikročásticemi
- c buněk 20.10<sup>3</sup>, 30.10<sup>3</sup>, 40.10<sup>3</sup>, 60.10<sup>3</sup>/jamku

0 hodina	A549, odmytí částic 2x PBS									MRC5		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,326	0,297	0,251	0,221	0,142	0,148	0,151	0,157	0,043	0,239	0,215	0,247
<b>B</b>	0,22	0,246	0,301	0,233	0,282	0,291	0,422	0,296	0,034	0,357	0,297	0,288
<b>C</b>	0,227	0,21	0,266	0,195	0,144	0,144	0,152	0,14	0,047	0,291	0,331	0,291
<b>D</b>	0,333	0,288	0,531	0,363	0,029	0,03	0,03	0,03	0,03	0,505	0,397	0,366
<b>E</b>	0,272	0,198	0,298	0,333	0,03	0,038	0,032	0,03	0,029	0,031	0,029	0,03
<b>F</b>	0,25	0,23	0,357	0,236	0,037	0,029	0,029	0,031	0,035	0,029	0,031	0,029
<b>G</b>	0,223	0,205	0,248	0,268	0,031	0,03	0,031	0,031	0,03	0,032	0,037	0,031
<b>H</b>	0,253	0,287	0,218	0,158	0,03	0,032	0,031	0,029	0,029	0,029	0,029	0,03

1 hodina	A549									MRC5		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1,003	1,244	1,288	1,258	0,223	0,23	0,232	0,249	0,044	0,974	0,929	1,07
<b>B</b>	1,15	1,286	1,583	1,291	1,713	1,59	1,521	1,707	0,036	1,388	1,519	1,473
<b>C</b>	1,195	1,405	1,245	1,292	0,23	0,234	0,236	0,212	0,049	1,507	1,414	1,584
<b>D</b>	1,393	1,44	1,336	1,549	0,032	0,031	0,032	0,031	0,03	1,889	1,717	1,914
<b>E</b>	1,006	0,986	1,155	1,161	0,03	0,04	0,033	0,032	0,031	0,031	0,032	0,03
<b>F</b>	0,8	0,89	0,856	0,922	0,039	0,029	0,029	0,032	0,035	0,029	0,03	0,029
<b>G</b>	0,52	0,494	0,563	0,652	0,032	0,03	0,032	0,037	0,031	0,033	0,037	0,031
<b>H</b>	0,43	0,451	0,384	0,286	0,029	0,03	0,031	0,03	0,029	0,032	0,029	0,03

1,5 hodiny	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	2,064	1,843	1,975	1,92	0,274	0,281	0,273	0,292	0,044	1,333	1,182	1,387
<b>B</b>	1,838	2,028	2,267	2,098	2,44	2,361	2,538	2,359	0,042	1,952	1,933	1,986
<b>C</b>	1,865	1,983	1,835	1,949	0,27	0,28	0,285	0,256	0,053	2,075	2,056	2,192
<b>D</b>	2,084	2,02	2,16	2,202	0,031	0,032	0,032	0,031	0,03	2,577	2,459	2,641
<b>E</b>	1,453	1,492	1,612	1,605	0,031	0,041	0,037	0,033	0,031	0,031	0,03	0,031
<b>F</b>	1,09	1,242	1,614	1,23	0,039	0,029	0,029	0,032	0,035	0,028	0,032	0,028
<b>G</b>	0,676	0,649	0,735	0,82	0,031	0,03	0,031	0,037	0,031	0,033	0,037	0,032
<b>H</b>	0,524	0,543	0,472	0,346	0,031	0,03	0,03	0,029	0,029	0,029	0,031	0,029

bb MRC-5: Mikročástice ProMag · COOH, měřeno 30. 05. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- 30.10<sup>3</sup> buněk MRC-5/jamku
- buňky se před přidáním činidla XTT promývaly 2x pufrem PBS

0 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,203	0,209	0,2	0,248	0,158	0,142	0,132	0,223	0,03	0,03	0,031	0,032
B	0,188	0,221	0,239	0,193	0,199	0,346	0,199	0,206	0,03	0,037	0,031	0,031
C	0,21	0,231	0,221	0,204	0,141	0,144	0,154	0,137	0,028	0,027	0,027	0,027
D	0,192	0,23	0,214	0,26	0,029	0,03	0,031	0,03	0,029	0,029	0,029	0,03
E	0,169	0,189	0,144	0,249	0,03	0,031	0,03	0,03	0,033	0,029	0,03	0,03
F	0,164	0,154	0,155	0,162	0,029	0,029	0,029	0,032	0,029	0,029	0,029	0,029
G	0,138	0,145	0,155	0,175	0,031	0,03	0,03	0,031	0,03	0,031	0,03	0,029
H	0,153	0,147	0,152	0,144	0,03	0,03	0,03	0,029	0,029	0,03	0,03	0,029

1 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,897	0,971	0,911	0,891	0,229	0,217	0,214	0,253	0,03	0,029	0,03	0,032
B	0,683	1,008	0,948	0,97	0,995	0,639	0,905	1,041	0,04	0,048	0,038	0,032
C	0,905	1,05	1,022	1,016	0,198	0,217	0,223	0,206	0,033	0,032	0,031	0,031
D	0,74	0,982	1,003	1,024	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,03
E	0,528	0,562	0,267	0,685	0,03	0,032	0,031	0,031	0,032	0,03	0,03	0,03
F	0,291	0,233	0,249	0,232	0,03	0,029	0,03	0,032	0,029	0,029	0,029	0,029
G	0,208	0,226	0,225	0,255	0,032	0,031	0,03	0,031	0,031	0,032	0,031	0,03
H	0,221	0,225	0,218	0,216	0,029	0,029	0,03	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029

1,5 hodiny	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,288	1,37	1,305	1,269	0,264	0,249	0,244	0,282	0,03	0,03	0,03	0,032
B	0,954	1,456	1,356	1,39	1,424	0,783	1,301	1,487	0,037	0,042	0,032	0,032
C	1,263	1,507	1,506	1,498	0,259	0,249	0,264	0,244	0,032	0,032	0,031	0,03
D	1,035	1,424	1,456	1,476	0,032	0,032	0,032	0,031	0,031	0,03	0,03	0,03
E	0,714	0,708	0,345	0,928	0,03	0,031	0,031	0,031	0,032	0,03	0,03	0,03
F	0,328	0,265	0,286	0,265	0,029	0,029	0,035	0,039	0,029	0,029	0,03	0,03
G	0,227	0,261	0,254	0,283	0,032	0,032	0,031	0,031	0,031	0,032	0,031	0,03
H	0,249	0,255	0,243	0,242	0,028	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029

2 hodiny	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,594	1,718	1,649	1,615	0,303	0,283	0,279	0,316	0,03	0,034	0,03	0,032
B	1,19	1,823	1,63	1,76	1,792	0,877	1,638	1,868	0,056	0,065	0,057	0,051
C	1,601	1,894	1,882	1,893	0,299	0,278	0,302	0,278	0,046	0,046	0,044	0,039
D	1,284	1,795	1,852	1,827	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,031	0,03	0,03
E	0,866	0,862	0,398	1,13	0,037	0,041	0,039	0,037	0,035	0,031	0,031	0,031
F	0,364	0,298	0,322	0,29	0,03	0,029	0,036	0,04	0,031	0,029	0,03	0,03
G	0,252	0,284	0,277	0,302	0,032	0,031	0,03	0,032	0,031	0,032	0,031	0,03
H	0,278	0,285	0,27	0,266	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,03	0,029



bb A549: Mikročástice ProMag · COOH · IgG, měřeno 3. 11. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- 20.10<sup>3</sup> buněk A549/jamku
- buňky se před přidáním činidla XTT promývaly 1-2x pufrem PBS

0 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,252	0,321	0,381	0,271	0,148	0,156	0,152	0,15	0,031	0,031	0,033	0,03
B	0,258	0,305	0,293	0,351	0,456	0,275	0,32	0,331	0,032	0,031	0,031	0,031
C	0,276	0,526	0,275	0,244	0,162	0,158	0,148	0,169	0,029	0,03	0,029	0,031
D	0,269	0,244	0,296	0,252	0,377	0,295	0,294	0,246	0,031	0,031	0,031	0,031
E	0,218	0,17	0,173	0,203	0,03	0,031	0,031	0,031	0,03	0,03	0,03	0,03
F	0,154	0,162	0,191	0,188	0,029	0,029	0,029	0,03	0,029	0,029	0,029	0,029
G	0,147	0,157	0,186	0,165	0,03	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,03	0,031
H	0,171	0,169	0,175	0,151	0,029	0,029	0,03	0,029	0,029	0,03	0,029	0,029

1 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,175	2,077	2,201	1,742	0,209	0,223	0,216	0,223	0,03	0,03	0,032	0,03
B	2,044	2,079	1,809	1,739	1,618	1,77	1,841	2,165	0,032	0,031	0,031	0,031
C	2,176	1,875	1,764	1,754	0,246	0,227	0,231	0,239	0,033	0,032	0,031	0,031
D	1,812	1,837	1,98	2,012	1,913	2,004	1,785	1,694	0,031	0,03	0,03	0,046
E	0,827	0,575	0,592	0,604	0,03	0,031	0,031	0,03	0,029	0,03	0,029	0,029
F	0,337	0,331	0,267	0,361	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029
G	0,232	0,232	0,266	0,258	0,03	0,031	0,031	0,031	0,03	0,031	0,03	0,03
H	0,282	0,249	0,25	0,227	0,029	0,029	0,03	0,028	0,028	0,029	0,029	0,028

bb A549: Mikročástice ProMag · COOH · IgG, měřeno 24. 11. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- 20.10<sup>3</sup> buněk A549/jamku
- buňky se před přidáním činidla XTT promývaly 1-2x pufrem PBS

0 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,331	0,571	0,419	0,303	0,134	0,163	0,133	0,146	0,029	0,029	0,028	0,029
B	0,291	0,375	0,359	0,696	0,321	0,443	0,361	0,342	0,03	0,03	0,03	0,03
C	0,323	0,444	0,328	0,366	0,153	0,161	0,152	0,134	0,028	0,027	0,029	0,029
D	0,384	0,336	0,338	0,345	0,029	0,031	0,029	0,029	0,029	0,03	0,029	0,028
E	0,262	0,25	0,246	0,234	0,031	0,029	0,029	0,029	0,029	0,028	0,028	0,028
F	0,159	0,156	0,171	0,191	0,03	0,028	0,027	0,028	0,028	0,027	0,027	0,027
G	0,164	0,146	0,141	0,159	0,03	0,029	0,03	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029
H	0,139	0,151	0,141	0,161	0,036	0,028	0,027	0,028	0,028	0,027	0,027	0,027

1 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,362	1,881	1,877	2,215	0,203	0,233	0,224	0,224	0,029	0,031	0,03	0,029
B	2,337	2,304	2,25	2,262	1,762	1,949	1,729	2,103	0,029	0,03	0,03	0,031
C	2,247	1,812	1,686	1,757	0,257	0,362	0,262	0,201	0,027	0,027	0,028	0,029
D	2,053	1,981	1,778	1,908	0,029	0,029	0,034	0,028	0,029	0,03	0,029	0,029
E	1,213	1,264	0,903	1,069	0,03	0,029	0,029	0,029	0,028	0,028	0,028	0,028
F	0,63	0,559	0,54	0,636	0,03	0,028	0,028	0,028	0,029	0,028	0,028	0,028
G	0,287	0,224	0,205	0,24	0,031	0,03	0,03	0,031	0,029	0,029	0,032	0,037
H	0,197	0,212	0,206	0,236	0,036	0,03	0,037	0,028	0,029	0,03	0,034	0,028

bb A549: Mikročástice ProMag · COOH · IgG, měřeno 30. 11. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- 20.10<sup>3</sup> buněk A549/jamku
- buňky se před přidáním činidla XTT promývaly 1x pufrem PBS

bb MRC-5: Mikročástice ProMag · COOH · IgG, měřeno 30. 11. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- 40.10<sup>3</sup> buněk MRC-5/jamku
- buňky se před přidáním činidla XTT promývaly 1x pufrem PBS

A549												
0 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,182	0,199	0,342	0,219	0,147	0,144	0,147	0,149	0,197	0,186	0,184	0,184
B	0,27	0,171	0,177	0,183	0,196	0,171	0,169	0,205	0,188	0,193	0,208	0,182
C	0,187	0,295	0,203	0,208	0,149	0,146	0,148	0,143	0,19	0,185	0,196	0,184
D	0,185	0,209	0,218	0,242	0,034	0,032	0,034	0,034	0,187	0,229	0,198	0,176
E	0,235	0,234	0,224	0,231	0,034	0,034	0,034	0,03	0,198	0,19	0,218	0,22
F	0,197	0,198	0,193	0,202	0,159	0,158	0,163	0,152	0,17	0,282	0,215	0,215
G	0,198	0,176	0,199	0,183	0,25	0,186	0,19	0,217	0,208	0,167	0,217	0,163
H	0,238	0,169	0,186	0,173	0,156	0,161	0,17	0,163	0,175	0,211	0,2	0,179
MRC-5												

A549												
1 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,051	1,201	1,317	1,209	0,208	0,218	0,211	0,207	0,574	0,569	0,524	0,584
B	1,214	1,175	1,316	1,265	1,178	1,124	1,198	1,174	0,652	0,672	0,622	0,568
C	1,335	1,241	1,178	1,322	0,207	0,203	0,211	0,21	0,638	0,56	0,578	0,528
D	1,134	1,113	1,173	1,165	0,034	0,034	0,034	0,034	0,507	0,636	0,625	0,491
E	0,964	0,653	0,681	0,75	0,034	0,034	0,034	0,03	0,398	0,395	0,387	0,38
F	0,452	0,449	0,522	0,392	0,209	0,221	0,217	0,208	0,244	0,249	0,271	0,293
G	0,271	0,255	0,294	0,27	0,411	0,558	0,543	0,532	0,319	0,282	0,294	0,27
H	0,792	0,218	0,235	0,222	0,211	0,218	0,225	0,227	0,25	0,233	0,252	0,249
MRC-5												

A549												
2 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,033	2,266	2,337	2,157	0,3	0,318	0,31	0,303	1,048	1,05	0,941	1,025
B	2,25	2,155	2,338	2,262	2,136	2,178	2,322	2,302	1,214	1,189	1,148	1,026
C	2,256	2,204	2,127	2,303	0,301	0,296	0,302	0,305	1,152	0,988	1,06	0,94
D	2,146	2,122	2,087	2,187	0,034	0,034	0,032	0,03	0,923	1,173	1,13	0,874
E	1,769	1,238	1,254	1,397	0,034	0,034	0,034	0,03	0,686	0,691	0,695	0,615
F	0,822	0,834	0,991	0,653	0,278	0,298	0,29	0,276	0,355	0,305	0,364	0,409
G	0,373	0,373	0,418	0,41	0,651	1,047	1,001	0,968	0,512	0,446	0,424	0,413
H	0,514	0,314	0,322	0,325	0,281	0,302	0,313	0,309	0,351	0,317	0,347	0,381
MRC-5												

bb MRC-5: Mikročástice ProMag · COOH, měřeno 8. 12. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- 40.10<sup>3</sup> buněk MRC-5/jamku
- buňky se před přidáním činidla XTT promývaly 1x puforem PBS

bb MRC-5: Mikročástice ProMag · COOH · IgG, měřeno 8. 12. 2016

- c částic = 0,1 µg/ml – 1000 µg/ml
- 40.10<sup>3</sup> buněk MRC-5/jamku
- buňky se před přidáním činidla XTT promývaly 1x puforem PBS

ProMag-COOH												
0 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,164	0,194	0,214	0,196	0,141	0,141	0,136	0,137	0,18	0,203	0,179	0,217
B	0,182	0,252	0,208	0,228	0,224	0,167	0,218	0,194	0,218	0,201	0,214	0,217
C	0,192	0,191	0,227	0,231	0,139	0,146	0,138	0,137	0,185	0,215	0,191	0,186
D	0,209	0,199	0,205	0,219	0,034	0,032	0,03	0,03	0,216	0,2	0,205	0,221
E	0,214	0,154	0,174	0,18	0,03	0,034	0,032	0,034	0,205	0,214	0,186	0,195
F	0,166	0,164	0,149	0,153	0,146	0,139	0,149	0,146	0,163	0,179	0,196	0,156
G	0,232	0,161	0,158	0,15	0,206	0,189	0,191	0,219	0,157	0,167	0,167	0,167
H	0,216	0,159	0,159	0,166	0,151	0,147	0,158	0,15	0,17	0,179	0,143	0,198
ProMag-COOH-IgG												

ProMag-COOH												
1 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,781	0,798	0,891	0,831	0,2	0,199	0,194	0,198	0,946	0,869	0,849	0,96
B	0,807	0,902	0,907	1,032	0,865	0,713	0,813	0,84	0,953	0,994	1,045	0,966
C	0,702	0,779	0,859	0,917	0,193	0,211	0,195	0,201	0,921	1,024	0,89	0,959
D	0,86	0,828	0,83	0,923	0,03	0,03	0,034	0,03	0,959	0,946	0,911	0,973
E	0,694	0,41	0,401	0,462	0,03	0,034	0,034	0,034	0,47	0,59	0,527	0,601
F	0,309	0,341	0,259	0,277	0,205	0,2	0,22	0,206	0,341	0,51	0,37	0,273
G	0,273	0,216	0,228	0,207	0,878	0,961	0,944	0,831	0,213	0,229	0,246	0,232
H	0,244	0,223	0,226	0,235	0,22	0,21	0,247	0,229	0,24	0,235	0,204	0,27
ProMag-COOH-IgG												

ProMag-COOH												
2 hodina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,299	1,319	1,474	1,321	0,252	0,249	0,246	0,255	1,584	1,439	1,413	1,584
B	1,295	1,498	1,448	1,664	1,38	1,153	1,365	1,38	1,598	1,641	1,736	1,589
C	1,157	1,266	1,383	1,526	0,254	0,267	0,262	0,257	1,556	1,676	1,473	1,594
D	1,417	1,371	1,396	1,49	0,032	0,033	0,033	0,034	1,598	1,558	1,502	1,573
E	1,075	0,65	0,657	0,745	0,034	0,034	0,032	0,03	0,734	0,973	0,797	0,982
F	0,461	0,509	0,379	0,405	0,262	0,249	0,262	0,259	0,483	0,808	0,55	0,373
G	0,345	0,287	0,307	0,275	1,421	1,562	1,53	1,361	0,275	0,296	0,33	0,301
H	0,329	0,293	0,297	0,304	0,276	0,273	0,298	0,277	0,308	0,291	0,264	0,341
ProMag-COOH-IgG												

## Příloha 2. Vybraná experimentálně naměřená data systémem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer Single Plate

- zdroj: vytvořeno autorem a pracovníky KBBV FCHT Pardubice
- monitorováno v reálném čase při inkubačních podmínkách (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>).

bb MRC-5: optimalizace počtu nasazených MRC-5 buněk do E-destičky

- bez ovlivnění mikročásticemi
- c buněk 10.10<sup>3</sup>(A), 15.10<sup>3</sup>(B), 20.10<sup>3</sup>(C), 25.10<sup>3</sup>(D)/jamku
- analýza v experimentální části hodnocena do: 30 hodin v intervalu 30 minut
- měření ukončeno 25. 1. 2017

Time	Y	Y	Y	Y
(hh:mm:ss)	(A8-12)	(B8-12)	(C9-12)	(D9-D12)
0:00:00	0	0	0	0
0:00:15	-0,0007	0,0007	0,0002	0,0004
1:37:55	0,0158	0,0229	0,0255	0,0372
2:07:55	0,0214	0,051	0,0976	0,156
2:37:56	0,0573	0,102	0,1756	0,2759
3:07:57	0,0884	0,1531	0,244	0,3823
3:37:57	0,1175	0,1985	0,3108	0,4775
4:07:58	0,1462	0,2442	0,3797	0,5713
4:37:59	0,1713	0,2929	0,4456	0,656
5:08:00	0,199	0,3409	0,5054	0,7225
5:38:01	0,2262	0,3793	0,5539	0,7753
6:08:01	0,2477	0,41	0,5874	0,7955
6:38:01	0,2634	0,4315	0,6054	0,8033
7:08:02	0,2735	0,4424	0,6069	0,7948
7:38:03	0,28	0,4464	0,6038	0,7901
8:08:04	0,2845	0,4461	0,6022	0,7764
8:38:05	0,285	0,4417	0,5929	0,7637
9:08:06	0,2858	0,4429	0,5868	0,7627
9:38:07	0,2878	0,4479	0,5866	0,7645
10:08:07	0,2917	0,4524	0,5985	0,7816
10:38:07	0,2951	0,4618	0,6106	0,802
11:08:07	0,3005	0,47	0,6259	0,8245
11:38:07	0,3066	0,4805	0,6496	0,8541
12:08:08	0,3115	0,4942	0,671	0,885
12:38:09	0,3193	0,5137	0,7003	0,9188
13:08:10	0,3267	0,5292	0,727	0,9538
13:38:10	0,3372	0,5467	0,7537	0,9903
14:08:10	0,3499	0,5658	0,7865	1,0323
14:38:10	0,3601	0,5854	0,8188	1,0687
15:08:10	0,3715	0,6073	0,8463	1,1079
15:38:11	0,3843	0,6281	0,8758	1,1411
16:08:12	0,3957	0,6473	0,9069	1,19

16:38:13	0,41	0,667	0,9369	1,2208
17:08:14	0,4215	0,6884	0,9647	1,2529
17:38:14	0,4343	0,7089	0,9925	1,2847
18:08:15	0,4454	0,7284	1,0204	1,3178
18:38:16	0,4593	0,7478	1,0453	1,339
19:08:17	0,4715	0,7632	1,0713	1,3732
19:38:18	0,4807	0,7813	1,093	1,397
20:08:17	0,4925	0,7951	1,1159	1,4223
20:38:18	0,5022	0,8119	1,1351	1,4421
21:08:19	0,5113	0,8222	1,1492	1,4598
21:38:05	0,5238	0,8307	1,167	1,4828
22:08:06	0,5322	0,8464	1,1891	1,5019
22:38:07	0,5421	0,8615	1,204	1,5196
23:08:07	0,5483	0,873	1,2187	1,5386
23:38:08	0,5565	0,878	1,2316	1,5582
24:08:09	0,5626	0,8848	1,2417	1,5735
24:38:09	0,5683	0,8936	1,2582	1,6007
25:08:09	0,5755	0,9042	1,2787	1,6274
25:38:10	0,586	0,9139	1,303	1,6539
26:08:11	0,5919	0,9306	1,3289	1,6898
26:38:12	0,6007	0,9481	1,3514	1,7264
27:08:12	0,6094	0,9664	1,3779	1,7583
27:38:13	0,618	0,9838	1,4112	1,7948
28:08:14	0,6276	0,9999	1,44	1,8309
28:38:14	0,6359	1,0165	1,4784	1,874
29:08:14	0,6489	1,0448	1,516	1,9175
29:38:15	0,6591	1,0623	1,5554	1,9575
30:08:16	0,6719	1,0907	1,5903	2,0107
30:38:16	0,6853	1,1179	1,6225	2,0581



bb MRC-5: Mikročástice ProMag · COOH a ProMag · COOH · IgG

- $17,5 \cdot 10^3$  buněk MRC-5/jamku
- c částic = 0,1  $\mu\text{g/ml}$  – 1000  $\mu\text{g/ml}$
- expozice magnetickými mikročásticemi: 29. hodina od nasazení buněk do jamek
- analýza v experimentální části hodnocena do: 109 hodin v intervalu 5 minut
- Z důvodu velkého množství dat je zde uveden pouze 30 minutový interval do 53. hodiny  
→ 24 hodin po ovlivnění ProMag · COOH (ostatní údaje jsou uloženy CD médiu)
- měření ukončeno 20. 3. 2017

Time (hh:mm:ss)	pouze bb	5% DMSO	ProMag-COOH							
			0,1 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
0:00:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0:00:13	0,0011	0,0003	0,0004	-0,0005	0,0001	0,001	0,0005	0,0007	-0,0008	-0,0009
1:00:44	-0,0287	-0,0071	0,0242	0,007	-0,0051	-0,0192	-0,0218	-0,0052	0,0116	0,0274
1:30:41	-0,0135	-0,0079	0,0025	0,0025	0,0095	0,0162	0,0213	0,0195	0,0071	0,0106
2:00:42	0,0033	-0,0054	0,0171	0,0156	0,0199	0,0243	0,0358	0,0325	0,022	0,0304
2:30:44	0,0214	-0,0002	0,0344	0,0287	0,0332	0,0354	0,0521	0,0455	0,0405	0,0552
3:00:49	0,04	0,0045	0,0528	0,042	0,0449	0,0474	0,0675	0,0628	0,0582	0,0767
3:30:52	0,0573	0,0097	0,0712	0,0566	0,0612	0,0585	0,0814	0,0789	0,0755	0,0975
4:00:56	0,0725	0,0154	0,0917	0,0741	0,0752	0,0708	0,0964	0,0955	0,0903	0,1181
4:31:00	0,0891	0,0209	0,1074	0,0909	0,0904	0,0864	0,1127	0,1156	0,1069	0,1372
5:01:03	0,1079	0,0271	0,1275	0,1065	0,1058	0,1028	0,1288	0,134	0,122	0,1548
5:31:06	0,125	0,0336	0,1419	0,1215	0,1222	0,1187	0,1452	0,148	0,1361	0,1709
6:01:09	0,1376	0,0376	0,1547	0,1346	0,1333	0,1315	0,1575	0,1617	0,149	0,1823
6:31:13	0,1452	0,0401	0,1635	0,1429	0,1413	0,1394	0,1668	0,1712	0,1569	0,19
7:01:18	0,1507	0,0416	0,1682	0,1475	0,1481	0,1428	0,1716	0,1765	0,1611	0,1956
7:31:21	0,1516	0,042	0,1726	0,1517	0,1494	0,1462	0,1746	0,1788	0,1648	0,1998
8:01:24	0,1508	0,043	0,1747	0,1542	0,1515	0,1448	0,1761	0,1799	0,1659	0,202
8:31:28	0,1483	0,0435	0,1768	0,1554	0,1534	0,1464	0,1773	0,1817	0,1687	0,2039
9:01:33	0,1446	0,0435	0,1782	0,157	0,1539	0,1473	0,1767	0,1814	0,1693	0,2057
9:31:36	0,1445	0,0436	0,1809	0,1585	0,1553	0,1486	0,1767	0,1833	0,1698	0,2089
10:01:40	0,1443	0,0435	0,1827	0,1599	0,1582	0,1511	0,1779	0,1833	0,1712	0,2132
10:31:45	0,1476	0,0438	0,1865	0,1631	0,1612	0,1537	0,1797	0,1867	0,1786	0,2177
11:01:49	0,1533	0,0445	0,1902	0,168	0,1632	0,1584	0,1843	0,1919	0,1821	0,2219
11:31:52	0,1547	0,0459	0,1992	0,1711	0,1694	0,1647	0,1889	0,1983	0,1876	0,2268
12:01:57	0,1601	0,0471	0,2068	0,1767	0,1751	0,1704	0,1915	0,2027	0,1941	0,2334
12:32:01	0,1661	0,0492	0,2154	0,1822	0,1818	0,1767	0,1993	0,2088	0,2001	0,2408
13:02:05	0,1733	0,0503	0,2221	0,1888	0,1891	0,1839	0,2092	0,2168	0,2056	0,2484
13:32:09	0,1806	0,0527	0,2334	0,1971	0,1959	0,1919	0,2176	0,2247	0,2139	0,2564
14:02:13	0,1866	0,0555	0,2427	0,2065	0,2049	0,2018	0,2216	0,2327	0,2243	0,2648
14:32:16	0,1972	0,0587	0,2525	0,2193	0,2159	0,2126	0,2327	0,2416	0,2327	0,2747
15:02:20	0,2095	0,0618	0,2641	0,2311	0,2249	0,2235	0,2429	0,2527	0,2436	0,2878
15:32:24	0,2195	0,0649	0,2776	0,2434	0,2362	0,2351	0,2532	0,2635	0,2538	0,3004
16:02:28	0,2331	0,0693	0,2921	0,257	0,2497	0,2481	0,2646	0,2773	0,2645	0,3125
16:32:33	0,2454	0,0716	0,3052	0,2712	0,2622	0,261	0,2801	0,2904	0,2772	0,3229
17:02:37	0,2601	0,0757	0,3192	0,2878	0,2791	0,2774	0,2941	0,3033	0,2938	0,3397
17:32:41	0,2742	0,0802	0,3358	0,3007	0,2943	0,2955	0,3108	0,3185	0,3097	0,3548
18:02:45	0,2927	0,0844	0,3522	0,3186	0,3101	0,3133	0,3244	0,3349	0,3261	0,3712
18:32:48	0,3107	0,0903	0,3677	0,3371	0,3278	0,3322	0,3437	0,3564	0,344	0,3889
19:02:50	0,3309	0,0955	0,3883	0,3551	0,3482	0,3492	0,3628	0,3773	0,3608	0,408
19:32:53	0,3513	0,0995	0,4096	0,3745	0,3708	0,3692	0,3823	0,396	0,381	0,4291
20:02:58	0,3725	0,1042	0,4296	0,3944	0,3916	0,3936	0,4077	0,4169	0,4017	0,4496
20:33:01	0,3961	0,1108	0,4528	0,4172	0,4156	0,4176	0,4308	0,4408	0,4232	0,4729
21:03:04	0,4208	0,1167	0,4738	0,4413	0,4362	0,4412	0,4549	0,4657	0,4448	0,4939
21:33:07	0,4469	0,1232	0,4988	0,4658	0,4608	0,4666	0,4812	0,4888	0,4678	0,5193
22:03:08	0,4729	0,1309	0,5232	0,493	0,4868	0,4925	0,5095	0,512	0,4935	0,5442
22:33:12	0,5029	0,1382	0,5488	0,5218	0,5144	0,5181	0,5363	0,5398	0,5193	0,572
23:03:15	0,531	0,1461	0,5756	0,5498	0,5446	0,5479	0,5635	0,5661	0,5473	0,5966
23:33:08	0,5629	0,1548	0,6042	0,5772	0,5733	0,5801	0,5933	0,5956	0,5775	0,6213
24:03:07	0,5898	0,1629	0,6342	0,6083	0,6048	0,6141	0,6238	0,6232	0,6062	0,6497
24:33:09	0,6227	0,1721	0,664	0,6392	0,639	0,6488	0,6556	0,6553	0,6379	0,6774
25:03:12	0,6548	0,1819	0,6954	0,6698	0,6753	0,684	0,6885	0,6878	0,6697	0,7072
25:33:15	0,6931	0,191	0,7289	0,7031	0,71	0,7239	0,7253	0,7242	0,7003	0,7391
26:03:18	0,7278	0,1996	0,7619	0,7373	0,7469	0,7628	0,7593	0,7595	0,7321	0,7687
26:33:21	0,7651	0,2103	0,7999	0,7742	0,7855	0,8022	0,7993	0,7953	0,7645	0,8011
27:03:25	0,8023	0,2217	0,8357	0,8113	0,8252	0,8435	0,8392	0,8341	0,7981	0,833

27:33:28	0,8441	0,2339	0,873	0,8527	0,8669	0,885	0,8855	0,8736	0,8338	0,8645
28:03:30	0,8871	0,2462	0,9092	0,8947	0,9109	0,9264	0,9285	0,9151	0,8686	0,8978
28:33:34	0,934	0,2583	0,9465	0,9372	0,9538	0,9709	0,9722	0,9562	0,9064	0,932
29:14:10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29:44:11	1,0321	0,2718	1,0062	1,0048	1,0174	1,0492	1,0486	1,0117	1,0161	1,0041
30:14:16	1,077	0,2102	1,0355	1,0343	1,0486	1,0962	1,0954	1,0341	1,0037	1,0279
30:44:19	1,122	0,1812	1,0754	1,0764	1,0958	1,1437	1,1427	1,0717	1,0153	1,0336
31:14:23	1,1677	0,163	1,1103	1,1153	1,1331	1,196	1,1863	1,1095	1,0418	1,04
31:44:25	1,2108	0,1496	1,1371	1,1468	1,1684	1,2361	1,2218	1,1478	1,0731	1,0566
32:14:29	1,2522	0,1386	1,1705	1,1801	1,2057	1,2736	1,2531	1,1726	1,1025	1,0821
32:44:32	1,3014	0,1293	1,2055	1,2137	1,24	1,317	1,2835	1,1928	1,1244	1,1043
33:14:34	1,3417	0,1223	1,238	1,2513	1,2779	1,3587	1,3131	1,1977	1,1375	1,1243
33:44:36	1,3801	0,1167	1,2727	1,2853	1,3157	1,4027	1,3166	1,2026	1,1505	1,1433
34:14:41	1,4208	0,1114	1,2986	1,3154	1,3485	1,4505	1,3345	1,2134	1,1585	1,1566
34:44:44	1,4607	0,1072	1,3249	1,3463	1,3845	1,492	1,3542	1,2282	1,1649	1,1685
35:14:48	1,5014	0,1037	1,3527	1,3813	1,4173	1,5322	1,363	1,241	1,1739	1,1765
35:44:53	1,5364	0,1003	1,3774	1,4168	1,4516	1,547	1,3747	1,2538	1,1822	1,1824
36:14:57	1,5746	0,0975	1,406	1,4404	1,4822	1,5873	1,3885	1,2614	1,185	1,1882
36:45:01	1,6122	0,0945	1,431	1,4618	1,5079	1,6313	1,3937	1,269	1,1928	1,1894
37:15:03	1,6478	0,0918	1,4543	1,4922	1,5294	1,6544	1,3924	1,2692	1,1916	1,1928
37:45:05	1,6821	0,0895	1,4766	1,5151	1,5465	1,6747	1,3949	1,2666	1,191	1,1907
38:15:09	1,7138	0,0879	1,4947	1,5297	1,5687	1,6922	1,3982	1,2628	1,1899	1,1887
38:45:12	1,7425	0,0859	1,5114	1,5472	1,5889	1,7155	1,3967	1,2554	1,1864	1,1809
39:15:17	1,7728	0,0838	1,525	1,5629	1,6082	1,731	1,3844	1,2506	1,1803	1,1735
39:45:20	1,795	0,0822	1,5387	1,5857	1,6227	1,7456	1,3771	1,2431	1,1703	1,1653
40:15:25	1,8174	0,0807	1,5487	1,6059	1,6342	1,7546	1,3739	1,2355	1,1608	1,1523
40:45:29	1,8304	0,0797	1,5613	1,6145	1,6415	1,7603	1,3674	1,2236	1,148	1,141
41:15:31	1,8508	0,0785	1,5687	1,6269	1,6519	1,7658	1,3611	1,2097	1,1354	1,1259
41:45:35	1,8622	0,0771	1,5828	1,6375	1,6565	1,7664	1,357	1,1939	1,1247	1,1117
42:15:39	1,8775	0,0763	1,5928	1,6431	1,6592	1,7737	1,3481	1,1851	1,1097	1,0972
42:45:42	1,8853	0,0754	1,6	1,6499	1,6633	1,7755	1,337	1,1716	1,0968	1,0848
43:15:45	1,8923	0,0744	1,6053	1,656	1,6642	1,7762	1,3294	1,1614	1,082	1,0737
43:45:49	1,9012	0,0735	1,6083	1,6535	1,6646	1,7728	1,3173	1,1481	1,0733	1,0619
44:15:52	1,9034	0,0724	1,6122	1,6538	1,6645	1,7654	1,3051	1,1362	1,0577	1,0474
44:45:56	1,8884	0,0717	1,6142	1,6572	1,6657	1,7669	1,2924	1,1202	1,0439	1,0324
45:16:00	1,8807	0,0709	1,6131	1,6566	1,6605	1,7646	1,2781	1,1058	1,0298	1,0211
45:46:03	1,8792	0,0701	1,6164	1,657	1,6607	1,7588	1,2646	1,0958	1,0162	1,0089
46:16:06	1,8753	0,0694	1,6183	1,6591	1,6573	1,7439	1,2509	1,0783	1,0032	1,0009
46:46:09	1,8631	0,0688	1,6239	1,661	1,6504	1,7418	1,2399	1,0624	0,987	0,9895
47:16:12	1,8554	0,068	1,6265	1,6592	1,6461	1,7363	1,2292	1,0475	0,9708	0,9802
47:46:14	1,8392	0,0667	1,6345	1,6541	1,6416	1,7334	1,218	1,0316	0,9577	0,9688
48:16:16	1,8347	0,0659	1,6397	1,6492	1,6348	1,7322	1,2107	1,0164	0,9451	0,9619
48:46:20	1,8322	0,0653	1,6407	1,645	1,635	1,7351	1,2015	0,9994	0,9314	0,9521
49:16:23	1,8172	0,0648	1,6424	1,6449	1,6344	1,7308	1,1932	0,9876	0,9225	0,9445
49:46:25	1,8063	0,0644	1,6483	1,6428	1,6309	1,7242	1,1845	0,9753	0,911	0,9349
50:16:29	1,7734	0,0638	1,6474	1,6409	1,6224	1,7208	1,1734	0,9617	0,9001	0,9264
50:46:30	1,7653	0,063	1,6449	1,6438	1,6184	1,7151	1,1633	0,95	0,8894	0,9179
51:16:31	1,739	0,0628	1,6465	1,6439	1,6196	1,7141	1,1586	0,9363	0,8763	0,9106
51:46:34	1,7257	0,0625	1,6531	1,6426	1,6223	1,7127	1,1552	0,9248	0,8618	0,9046
52:16:37	1,7093	0,0616	1,6578	1,6502	1,6239	1,7182	1,155	0,9161	0,8532	0,8975
52:46:40	1,6966	0,0611	1,663	1,6471	1,631	1,7214	1,1503	0,9051	0,8464	0,892
53:16:42	1,6919	0,0607	1,6719	1,6513	1,6367	1,7179	1,1484	0,8982	0,8406	0,8859
53:46:44	1,6897	0,0601	1,6722	1,653	1,637	1,7181	1,1433	0,8898	0,8347	0,8832
54:16:47	1,6884	0,0599	1,6798	1,6554	1,6399	1,7195	1,1437	0,8783	0,824	0,8783