

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**ANALÝZA NANOČÁSTIC PRO MEDICÍNSKÉ
ÚČELY POMOCÍ KAPILÁRNÍ
ELEKTROFORÉZY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Jana Horská

Studijní obor:

Chemie - geologie
a ochrana životního prostředí

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

OLOMOUC 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 27. 4. 2013

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, stejně tak za jeho obětavou spolupráci, trpělivost a věnovaný čas, který mi během jejího zpracování poskytoval.

Velký dík patří také mým rodičům za jejich vytrvalou pomoc a podporu, kterou mi neváhali ochotně projevovat po celou dobu mého studia.

Jana Horská

Souhrn

Předkládaná diplomová práce má za cíl poskytnout informace o chování nanočástic pomocí kapilární elektroforézy, to vše se zaměřením pro biologické účely.

Teoretická část se zabývá studiem nanočástic a kapilární elektroforézy. První kapitoly se věnují obecné charakteristice nanočástic a přináší soupis jejich různých typů. Použití nanočástic je zaměřeno na možnosti jejich uplatnění v lékařských vědách, do nichž stále více pronikají. Pomáhají zdokonalovat lékařské postupy, jak diagnostické, tak léčebné, především s ohledem na nádorová onemocnění. Samostatná kapitola se týká elektromigračních technik, zejména kapilární elektroforézy. Popisuje její základní mechanismy a využití pro analýzu nanočástic opět s přihlédnutím pro biologické vzorky.

Experimentální část shrnuje poznatky o chování dvou typů nanočástic – Ag a smAA-COOH nanočástic v různých typech elektrolytů pomocí výše zmíněné metody. Snaží se popsat jejich chování v prostředích blízkých buňkám. Hledá vhodné podmínky, za kterých by nedocházelo k ohrožení v biologickém systému, například agregací nanočástic.

Summary

This diploma thesis provides information about the behavior of nanoparticles using capillary electrophoresis, all focusing for biological purposes.

The theoretical part deals with the study of nanoparticles and capillary electrophoresis. The first chapter is devoted to the general characteristics of the nanoparticles and the following is a description of their different types. The next chapters concern the use of the nanoparticles, first of all on the possibilities of their application in medical sciences, where they found the right place. They are helped to improve medical procedures, both diagnostic and therapeutic, especially in a cancer treatment. Separate chapters concern with electromigration techniques, particularly with capillary electrophoresis. It describes the basic mechanisms and its use in the analysis of nanoparticles and biological samples.

The experimental part summarizes the finding of behavior the two types of nanoparticles - Ag and SmaA-COOH in various types of electrolytes using the above methods. It tries to describe the behavior of nanoparticles in biological media. It tries to find suitable conditions under which there would be no danger in a biological system, such as the aggregation of nanoparticles.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1	Nanotechnologie a nanočástice	2
2.2	Obecná charakteristika nanočástic.....	2
2.3	Typy nanočástic	4
2.3.1	Fullereny.....	4
2.3.2	Uhlíkové nanotrubičky (CNT)	6
2.3.3	Magnetické nanočástice	8
2.3.4	Kvantové tečky (QD)	10
2.3.5	Kovové nanočástice.....	13
2.3.6	Dendrimery.....	14
2.4	Nanočástice v medicíně	15
2.4.1	Diagnostika.....	16
2.4.1.1	Nanobiosenzory, fluorescenční sondy	16
2.4.1.2	Kontrastní látky.....	17
2.4.2	Terapie.....	19
2.4.2.1	Nanočástice jako léky a nosiče léků	19
2.4.2.2	Tkáňové inženýrství.....	22
2.4.2.3	Medicína budoucnosti	23
2.5	Kapilární elektroforéza (CE)	24
2.5.1	Charakterizace	24
2.5.2	Princip	24
2.5.3	Elektroosmotický tok	25
2.5.4	Instrumentace kapilární elektroforézy.....	27
2.5.5	Analýza nanočástic kapilární elektroforézou	28
2.5.6	Analýza biologických vzorků kapilární elektroforézou	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
3.1	Materiál.....	30
3.1.1	Chemikálie	30
3.1.2	Vzorky	30
3.2	Příprava elektrolytů	30
3.3	Instrumentace a experimentální podmínky.....	31

4	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1	Studium velikosti nanočástic	32
4.2	Měření zeta potenciálu nanočástic	36
4.3	Optimalizace experimentálních podmínek	39
4.3.1	Vliv intenzity elektrického pole	39
4.3.2	Složení elektrolytového systému.....	40
4.3.2.1	Vliv polarity	40
4.3.2.2	Vliv koncentrace PB a DDAB	41
4.4	Pilotní studium interakcí iontů s povrchem nanočástic	43
5	ZÁVĚR.....	45
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	46
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	50

1 ÚVOD

Svět objektů nacházejících se v rozměrech nanometrů dává vzniknout na poli vědeckém novému životu. Životu, kde se středem zájmu staly nanočástice a z nich vyráběné nanomateriály pomocí nanotechnologií. Vzniklé nanomateriály poté disponují zajímavými a jedinečnými vlastnostmi. „Nanoobjekty“ až teprve v posledních letech začaly vzbuzovat stále sílící zájem okolí pro své velké možnosti uplatnění. Nabízí mnoho skvělých objevů, pro oblast medicíny, farmacie, elektroniky a dalších odvětví průmyslu.

Kapilární elektroforéza je separační technika, která nám může dát mnoho odpovědí o chování nanočástic v určitých prostředích. Můžeme díky ní vybrat elektronový systém vhodný pro analýzu nanočástic v biologických prostředích.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nanotechnologie a nanočástice

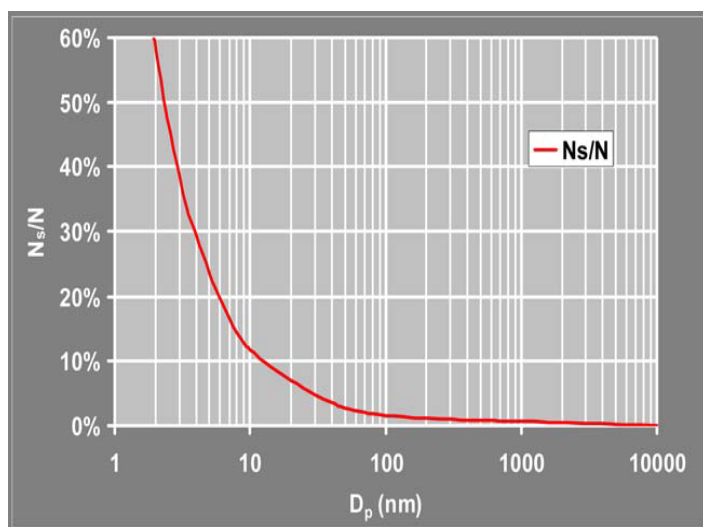
Nanotechnologie lze považovat, za jeden z nejrychleji se rozvíjejících směrů vědecké revoluce nového tisíciletí po celém světě. Objevy nepředvídatelných chemických a fyzikálních vlastností v řádech nanometrů otevřely možnosti k řadě perspektivních využití. A i když se nanotechnologie považují za výsledek dnešní doby, není tomu tak. Příroda byla spjata s jejich využíváním už od počátku svého vzniku.¹ Nacházíme v ní řadu částic i celých struktur v rozměrech nanometrů, a přesto je tak nenazýváme. Takovým příkladem jsou biomolekuly. Vlákna dvojité šroubovice molekuly DNA mají průměr asi 2,5 nm. Proteiny představují asi vůbec nejdokonalější formu nanotechnologií. Jako příklady lze uvést ribozomy, enzymy, viry, DNA polymerázy, protonové pumpy a ATP syntázy, ti všichni reprezentují složité systémy v rozměrech nanometrů.² Nanotechnologie lze definovat jako schopnost tvořit, charakterizovat a ovládat systémy na atomové a molekulární úrovni v rozmezí nanometrů za účelem využívání jejich podstatně odlišných vlastností a funkcí.³ Nanočástice jako takové představují shluky atomů či molekul o rozmezí 1 nm - 100 nm alespoň v jednom ze tří rozměrů. Dávají nám možnost vyrobit je s předem požadovanými vlastnostmi pro účely různých specifických použití například ve vědě, lékařství, průmyslu atd. Mají snadno definovatelné složení a strukturu.⁴

2.2 Obecná charakteristika nanočástic

Částice na úrovni nanometrů je možno charakterizovat dvěma výraznými vlastnostmi. Za prvé, metody klasické fyziky na studium objektů menší než 50 nm nestačí. Vykazují odlišné magnetické, elektrické a optické vlastnosti, které nejsou přítomny u částic větších rozměrů (klasické mikročástice). Chování nanočástic se řídí zákony kvantové fyziky. Druhá významná vlastnost souvisí s poměrem mezi velikostí částic nanomateriálu a velikostí plochy. Čím více klesá velikost částic, tím strměji stoupá poměr atomů nebo molekul na jednotku plochy (obr. 1). V důsledku vzniklého velmi velkého měrného povrchu silně interagují s okolním prostředím. Jejich povrchové atomy nejsou silně vázány. Příkladem jsou katalytické vlastnosti. Jakýkoliv katalytický systém v podobě nanočástic bude více reaktivnější, než systému v podobě větších částic. Chemické reakce jsou schopny katalyzovat přímo na

povrchu.⁴ S vysokou účinností a specifičností jsou schopny vázat proteiny a další objemné biomolekuly. Další určujícími parametry nanočástic, kromě velikosti jich samotných, je velikost distribuce částic v určitém médiu (voda, pufr, zkušební médium). Tyto dvě charakteristiky jsou považovány za důležité klíče k určování interakce nanočástic v živých systémech. Rozptýlením nanočástic do určitých složek biologického média může dojít ke změně v suspenzi. Změny v prostředí, iontové síle či náboji mohou vyvolat změnu stability a následnou agregaci nanočástic.⁵

Nanočástice charakterizuje i elektrokinetický potenciál označovaný též jako Zeta potenciál (ζ -potenciál), nacházející se na rovině skluzu, která je hranicí mezi Sternovou a difúzní vrstvou. Jedná se o celkový náboj, který částice získává v určitém prostředí. Slouží k určování stability částic koloidního systému. Když je negativní nebo pozitivní hodnota zeta potenciálu velká, dochází k odpuzování částic, naopak když je hodnota nízká, vznikají nežádoucí aglomeráty částic. Zajímavostí je, že ho lze použít i pro popis povrchové interakce nanočástic s buňkami v živých systémech a snímat jím reakci zdravých i rakovinných buněk na diagnostické a terapeutické metody na bázi nanočástic.⁶ Hlavní požadavky kladené na nové nanomateriály je dosažení nových vlastností, které budou mít široké uplatnění nebo zlepšení jejich dosavadních vlastností např. lepší mechanické vlastnosti, dlouhodobá stabilita bez jakékoliv agregace, antimikrobiální odolnost apod.⁷



Obr. 1: Procento povrchových molekul ve vztahu k celkovému počtu molekul kulových nanočástic v závislosti na jejich průměru. Poznámka: pod 100 nm se tento poměr prudce zvyšuje (převzato z cit. 4)

2.3 Typy nanočástic

Nanočástice lze rozdělit např. podle materiálu z jakého jsou vyrobeny. Dnes jich existuje celá řada. V následujícím textu jsou popsány ty nejperspektivnější nanočástice z hlediska použití.

2.3.1 Fullereny

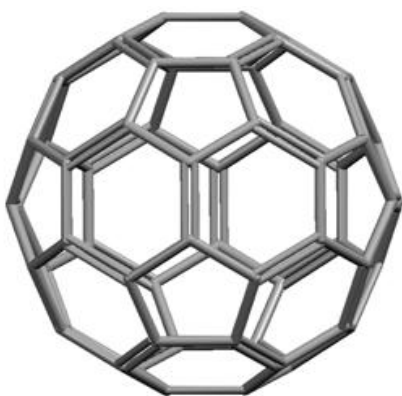
Patří mezi nanočástice tvořené výhradně uhlíkem. Vedle grafitu a diamantu lze fullereny považovat za další formu přírodního uhlíku. Z hlediska struktury mají tvar uzavřené klece tzv. klastru, kde stěny jsou tvořené pětiúhelníky nebo šestiúhelníky složených z uhlíků v sudém počtu. Jejich objev je datován do počátku 80. let minulého století a je spojený se jmény prof. H. W. Kroto, R. E. Smalley a R. F. Curl. Samotný název fullerenu je pojmenován na počest architekta R. Buckminstera Fullereny, který projektoval stavby tvaru geodetické kopule a tím předpovídal jejich strukturální podobnost s klastry uhlíku (obr. 2).

Fullerenů v současné době existuje velký počet. Od metastabilních forem jako je C_{28} , C_{36} , C_{50} přes nejznámější C_{60} (obr. 3), připomínající fotbalový míč, dále C_{70} připomínající ragbyový míč až po fullereny obsahující více než 100 atomů uhlíku. Jako nejlepší metoda jejich výroby se ukázalo spalování organického materiálu, kdy vznikají ještě polykondenzované aromatické sloučeniny. Z pohledu chemické reaktivity lze fullereny považovat za elektronově deficitní polyeny s delokalizovanými vazbami. Nejvíce experimentálně prostudovaným systémem je fullerén C_{60} , je nejstabilnější a nejdostupnější. Chvilí po rozšíření fullerenů, začaly vznikat nápady na chemickou modifikaci základního skeletu, zejména organickými molekulami.⁸

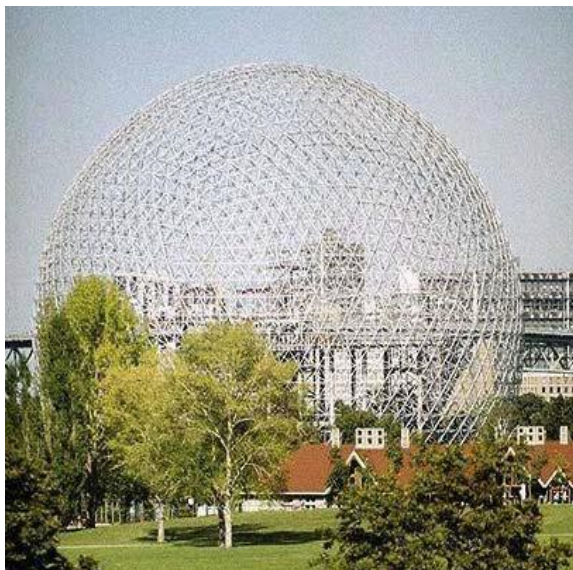
Fullereny mají silné akceptorové vlastnosti, lze je snadno podrobit redukci a adičním reakcím. Vzniklé deriváty lze rozdělit podle struktury do čtyř kategorií: čisté mnohostěnné uhlíkové klastry (klastry obsahující pouze uhlík), heterofullereny (jeden nebo více atomů uhlíku uvnitř klece nahrazen jiným atomem – např. bor, dusík), exohedrál (navázání radikálů nebo funkčních derivátů organických molekul na povrch fullerenu, patří sem soli a různé adukty, mohou mít velké množství izomerů, obecný vzorec RC_{60}), endohedrál (sloučeniny (zapouzdření jiného atomu/atomů nebo malé molekuly do vnitřní dutiny fullerenu bez vytvoření chemické vazby, např. inertní plyn, lanthanoidy, obecný vzorec $M@C_{60}$). Chemii endohedrálů lze spojit i s geologií a objasnit geologický čas. Objevení vzorků $He@C_{60}$ v meteoritech může poskytnout informace o původu těles, ve kterých byly

objeveny, stejně tak jako jejich nalezení v neobvyklých izotopových poměrech na některých geologických lokalitách. Fullereny lze redukovat pomocí elektropozitivních kovů například alkalickými kovy nebo kovy alkalických zemin za vzniku tzv. interkalačních sloučenin, kde je atom začleněn do krystalové mřížky fullerenu. Takto vzniklé sloučeniny se nazývají fulleridy a mají obecný vzorec M_xC_{60} , kde x může nabývat čísel 1 – 12. Tyto sloučeniny jsou zajímavé už z toho důvodu, že u některých se objevuje při relativně vysokých teplotách supravodivost. Jedná se zejména o sloučeniny typu M_3C_{60} např. K_3C_{60} , Cs_3C_{60} . Dalším typem reakcí jsou adice: nukleofilní, radikálové i elektrofilní. Adiční reakce lze použít i pro polymeraci na bázi fullerenu C_{60} . Například polymerové řetězce polystyrenu lze navázat na fullerén za vzniku dendritických struktur. Z hlediska elektrofilních adic lze fullereny halogenovat (nejčastěji fluorace), hydrogenovat nebo podrobit reakci s Lewisovými bázemi za vzniku komplexů. Sloučeniny fullerénů s komplexy přechodných kovů mají katalytické vlastnosti. Obecně lze říci, že deriváty fullerénů vykazují zajímavé chemické vlastnosti, pro které má opodstatnění velká snaha na vyvinutí metody pro cílenou syntézu derivátů. Mezi tyto vlastnosti patří supravodivost, ferromagnetismus, elektroluminiscence, katalytické vlastnosti aj. Jako vhodné fyzikálně – chemické metody ke studiu derivátů fullerénů se ukázaly elektrochemie a hmotnostní spektrometrie.^{8,9,10}

Využití fullerénů a jejich derivátů se ukázalo pro jejich zvláštního chování jako široké. Dají se použít v elektrotechnice, třeba aplikace v bateriích či pokročilých elektrotechnických zařízeních nebo v lékařství, kde se dají zejména uplatnit endohedrálční sloučeniny.¹⁰



Obr. 2: Molekula fullerenu C_{60} (převzato z cit. 8)



Obr. 3: Budova projektovaná R. B. Fullerem v Montrealu (převzato z cit. 8)

2.3.2 Uhlíkové nanotrubičky (CNTs)

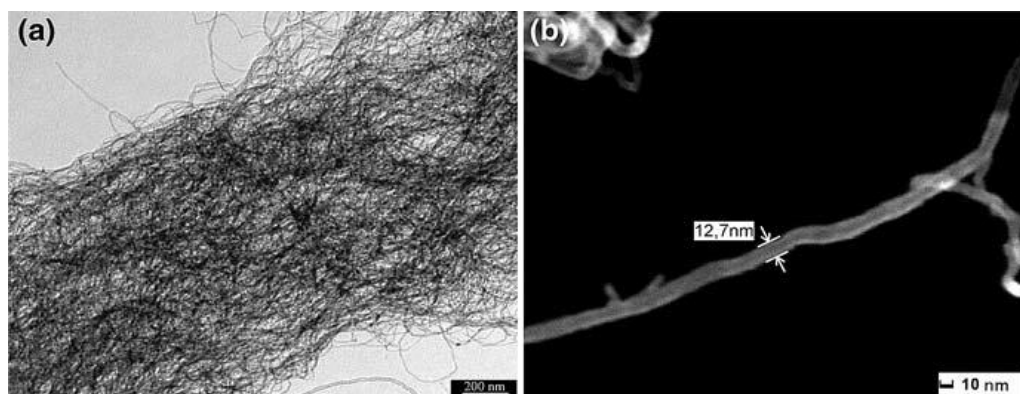
Spolu s fullereny jsou další alotropickou modifikací uhlíku. Jejich počátky lze nalézt už od 18. století, avšak v té době nebyly ještě nikterak podrobně probádány.¹¹ Byly identifikovány až v roce 1991^{12,13} a bezprostředně poté vyvolaly na dlouho dobu velký zájem u vědců pro své fascinující fyzikální a chemické vlastnosti.¹¹ Lze předpokládat, že jsou odvozeny fullerenů a jsou známy pod pojmem trubkové fullereny. Vypadají jako srolované listy grafenů ve tvaru válce, kde jsou atomy uhlíku vázány v sp^2 hybridizaci. CNTs lze je rozdělit na dva typy: jednovrstevné nanotrubičky známé pod zkratkou SWCNT (angl. single-walled carbon nanotube) a vícevrstevné, jejichž zkratka je MWCNT (angl. multi-walled carbon nanotube) a které obsahují více smotaných grafenových vrstev.^{11,12} Detailně lze tvar a velikost sledovat například pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) nebo transmisního elektronového mikroskopu (TEM) (obr. 4).¹³ Vyskytuje se u nich zajímavá kombinace struktury dutiny, malého průměru, nízké hustoty a velkého specifického povrchu, z čehož vyplývají jejich pozoruhodné vlastnosti a široké aplikace.

Nanotrubičky mají význačné elektrické, mechanické a tepelné vlastnosti v závislosti na svém průměru. Křemík je po dlouhá léta znám jako základní materiál v elektronice, v roce 1998 bylo zjištěno, že uhlíkové nanotrubičky mají ještě lepší elektrické vlastnosti a můžou křemík nahradit. S ohledem na chiralitu uhlíku mohou být SWCNTs vodiči nebo polovodiči. MWCNTs kvůli své složité struktuře můžou vykazovat v elektrických vlastnostech značné

komplikace. Co se týká mechanických vlastností, jsou CNTs tvrdší než diamant a mají velkou pevnost v tahu. Dále lze u nich očekávat, stejně jako u grafitu a diamantu, nízká tepelná kapacita a vysoká tepelná vodivost.

Mají široké spektrum použití např. elektronika, optika, zdravotnictví aj. Nanotrubice lze použít i ke zpevnění kompozitních materiálů. Přidáním CNTs do polymerní, kovového nebo keramické matrice vzniká materiál lepších vlastností.¹¹⁻¹³ Z pohledu chemické reaktivity se vyznačují chemickou inertností a nízkou rozpustností ve vodě nebo biologických tekutinách. To vyvolává značné problémy při jejich syntéze nebo při použití v biologických systémech. Tento problém lze odstranit chemickou modifikací povrchu, která se v posledních deseti letech ukázala jako velice účinná. Samotná aktivace se provádí navázáním organických molekul nebo polymerů na povrchovou stěnu nanotrubice za vzniku příslušných derivátů. Nejčastějším příkladem funkcionalizace je oxidace kyselinou dusičnou za vzniku karboxylových kyselin.¹⁴

Pro své typické vlastnosti našly zejména vícevrstevné nanotrubice uplatnění i jako absorbenty při extrakci na pevné fázi (SPE), která je jednou z nejrozšířenějších metod pro izolaci jednotlivých analytů ze vzorku, před jejich stanovením kapilární kapalinovou chromatografií. V případě, že se jako adsorbent použijí magnetické nanočástice, jedná se o extrakci na magnetickou pevnou fázi (MSPE). Tento způsob extrakce je efektivnější a rychlejší. Magnetické nanočástice s vícevrstevnými nanotubicemi byly použity při extrakci polycyklických aromatických uhlovodíků z jedlých olejů a antibiotik flourochinolonů z krevní plazmy. Dalším příkladem jsou vícevrstevné nanotrubice modifikované hydroxylovými skupinami, které byly spolu s magnetickými nanočásticemi byly využité pro extrakci estrogenů z medu a vodovodní vody. Tyto experimenty byly provedeny teprve v nedávné době.¹⁵



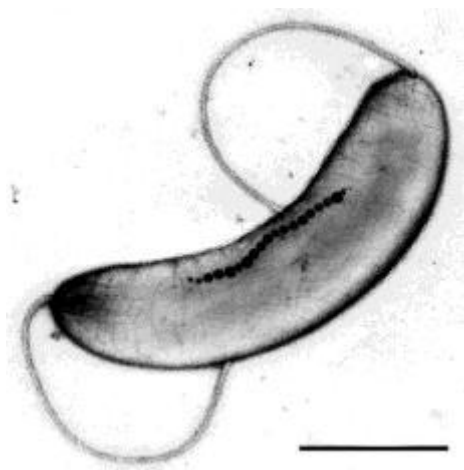
Obr. 4: Morfologie CNT pomocí a) TEM b) SEM (převzato z cit. 13)

2.3.3 Magnetické nanočástice

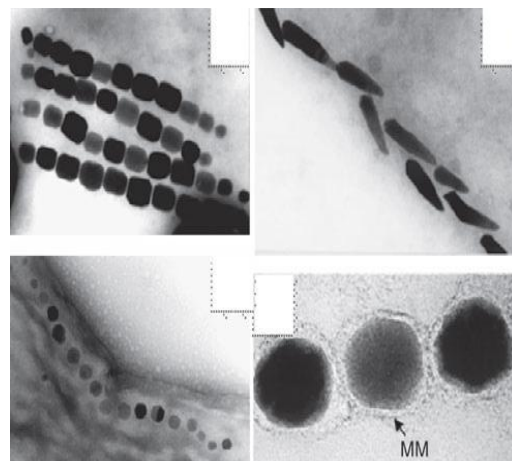
Magnetické nanočástice jsou dalším typem nanočástic, které vzbuzují velký zájem, pro své vlastnosti a široké uplatnění v různých oborech. Mají většinou strukturu kompozitů, kde jsou magnetické nanočástice, které tvoří složku magnetickou začleněny do nemagnetické matrice. Jako hostitelé magnetických nanočástic můžou vystupovat, jak pevné látky např. polymery, tak i kapaliny, které se potom označují jako magnetické. Složka magnetická je zodpovědná za interakci s vnějším magnetickým polem a složka nemagnetická za interakci s biologickými systémy.

Společným rysem je unikátní magnetické chování. Můžeme u nich najít supermagnetismus, jednodoménový režim, povrchové anizotropie, nízkou Curierovu teplotu či vysokou magnetickou vnímavost. Vystupují jako permanentní magnet. Při nízkých teplotách mají magnetické blokovací účinky. Všechny magnetické vlastnosti jsou ovlivněny jak velikostí, tvarem a koncentrací, tak pokrytím povrchu, matricí a jejím prostředím či tvorbou agregátů.¹⁶⁻¹⁹ Jsou známé magnetické nanočástice kovů nebo jako jejich oxidy. Nejčastěji jsou magnetické částice tvořeny železem a jeho oxidy a také kobaltem a niklem, jejichž možnosti jsou ale omezeny jejich toxicitou.

Mezi nejznámější magnetické oxidy železa patří magnetit, hematit a maghemit. Magnetit Fe_3O_4 patří do skupiny feritů a má silné magnetické pole. Je málo stabilní a většinou oxiduje na stabilnější modifikaci maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Oba oxidy vykazují teplotně závislé supermagnetické vlastnosti, tedy schopnost udržet nulový magnetický moment bez vlivu vnějšího pole když jsou jejich částice menší než 15 nm. Maghemit může být přeměněn na poslední formou hematit Fe_2O_3 , který už je antiferromagnetický. Oba oxidy jsou pro svou biokompatibilitu vhodné pro použití v lékařství.¹⁹⁻²⁵ Velký úspěch v oblasti magnetických nanočástic zaznamenal objev mikroorganismů schopných syntetizovat ve svých buňkách krystalky magnetitu nebo sulfidu greigitu. První magnetická bakterie *Magnetospirillum magnetotacticum* (obr. 5) byla izolovaná roku 1975 Richard P. Blakemorem z rybníční vody. Ve svých buňkách obsahují organelu nazývanou magnetosom, kde jsou krystalky magnetitu obalené organickou membránou a rozdělené podle velikosti a tvaru a uspořádané ve formě řetízků, které pracují na stejném principu jako střílka kompasu. (obr. 6). Magnetosomy jsou dostatečně citlivé na vnímání geomagnetického pole a slouží bakterii pro lepší orientaci v hlubších vodách. Je vznesena myšlenka, že při úspěšné izolaci magnetosomů z bakterií, by mohli posloužit v medicíně jako nosiče léku na požadované místo, zejména při léčbě nádoru toxickými cytostatiky.^{26,27}



Obr. 5: *Magnetospirillum magnetotacticum*
MTP – NP (převzato z cit. 26)



Obr. 6: a) – c) TEM obrazy MTP-NP s různými tvary: a) podlouhlé hranoly b) oktaedry c) kuličky d) membrána magnetosomu s velkým zvětšením (převzato z cit. 27)

Všechny magnetické nanočástice mají velkou povrchovou energii a silné magneticko - statické interakce a proto mají tendenci vytvářet agregáty, čímž se celková povrchová energie sníží, ale vzniklé produkty už postrádají magnetické vlastnosti. Aby se tomuto zabránilo, provádí se různé povrchové úpravy. Povrch nanočástic se modifikuje pomocí organických molekul např. polymery, biomolekuly nebo anorganickými sloučeninami např. oxidy křemíku nebo kovy. Vznikají stabilní a biokompatibilní magnetické částice, které už jsou vhodné i pro medicínské aplikace při diagnostice i léčbě (magnetická rezonance, hypertermie – zdroj tepla pod vlivem střídavého proudu magnetického pole, biologické štítky, nosiče léků).^{19,22,23,25}

Kromě medicíny se dají magnetické nanočástice využít v široké škále jiných disciplín: biotechnologie (biočipy), environmentální oblast (odstranění kontaminantů z podzemní vody), heterogenní katalýza, elektronika (magnetické zařízení pro ukládání dat), strojírenství atd.^{18,19,25} V posledních letech byly zkoušeny jejich aplikace v zemědělství, kde by fungovaly jako transportní systém stejně jak v lékařství. Biokompatibilní magnetické kapaliny jsou schopny pronikat přes kořeny a cévní systémy v plodinách jako je hrášek, slunečnice, pšenice a rajčata. Tento objev může otevřít možnosti pro další aplikace od agrochemické léčby ke genetickým transformacím dopravou nukleových kyselin.²⁸

2.3.4 Kvantové tečky (QDs)

Kvantové tečky jsou fluoreskující polovodičové anorganické nanokrystaly téměř kulovitého tvaru o průměru pohybujícím se v rozmezí 1-10 nm a obsahující 200 – 10 000 atomů.²⁹⁻³¹ Mohou se vyskytovat samostatně nebo v uspořádané do klastrů. Skládají se z anorganického jádra (core) tvořeného většinou polovodičem (např. CdSe, CdS nebo CdTe) a obalu (shell), který ho obklopuje (několik vrstev atomů ZnS). Jádro je odpovědné za fluorescenční vlastnosti kvantových teček a obal je chrání před chemickou a fotochemickou degradací a zvyšuje rozpustnost.^{29,30}

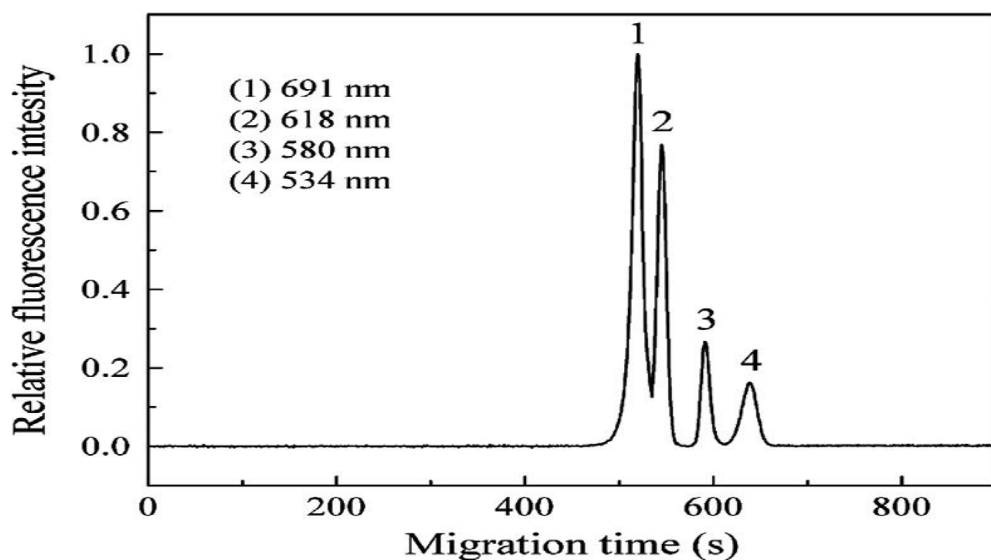
Mají výjimečné optické, elektrické a chemické vlastnosti, které jsou vhodné pro oblast biomedicínského a bioanalytického výzkumu, kde mohou najít uplatnění k označování molekul.^{29,30} Mezi jejich typické optické vlastnosti patří široká absorpční spektra, úzká emisní spektra, velké Stokesovy posuny a vysoké kvantové výtěžky (jasnost).³⁰ Kvantové tečky se ukázaly být vhodná alternativa fluorescenčních barviv, protože na rozdíl od konvenčně užívaných organických flouoroforů přinášejí několik výhod. Jejich luminiscence je závislá nejen na chemickém složení, ale i na velikosti částic, tzn. že kvantové tečky o stejném chemickém složení, ale různých velikostech mohou při vhodné vlnové délce vykazovat různé barvy (obr. 7). Jsou použitelné pro celou oblast spektra (od UV až po blízké IR). Mají charakteristické absorpční a emisní spektra, jak bylo uvedeno výše, díky širokým absorpčním spektrům je možné jedním UV zdrojem excitovat různé kvantové tečky a díky úzkým emisním spektrům fluoreskují jasněji. Další výhodou je extrémní fotochemická stabilita, nedojde tak k jejich „odbarvení“.³⁰⁻³⁴

Konkrétní využití kvantových teček určují navázané ligandy na jejich povrch. Ligandy umožňují rozpustnost v různých prostředích (voda, organické rozpouštědla) a podporují ochotu k chemickým reakcím. Nejběžněji používanými kvantovými tečkami jsou CdSe, CdS a CdTe. Pro jejich přípravu v nevodném prostředí se používá tri-n-octylphosphine oxid (TOPO) a trioctylphospine (TOP). Takto vzniklé nanočástice jsou rozpustné pouze v hydrofobních rozpouštědlech např. hexan nebo toluen. Výměnou TOP /TOPO ligandu za jiný získají rozpustnost v hydrofilních prostředích. Jako vhodné se ukázaly být thiolové ligandy, díky jejich vysoké afinitě k povrchu nanočástice. Alternativou k thiolům mohou být peptidy nebo oligomerní fosfíny. Jinou možností jak zvýšit rozpustnost je jejich zachycení např. v polymeru nebo micele. Kvantové tečky lze použít jako biosenzor nebo pro zobrazování buněk,³⁵ jako stavební součásti pro diody, fotovoltická zařízení a lasery.³⁶

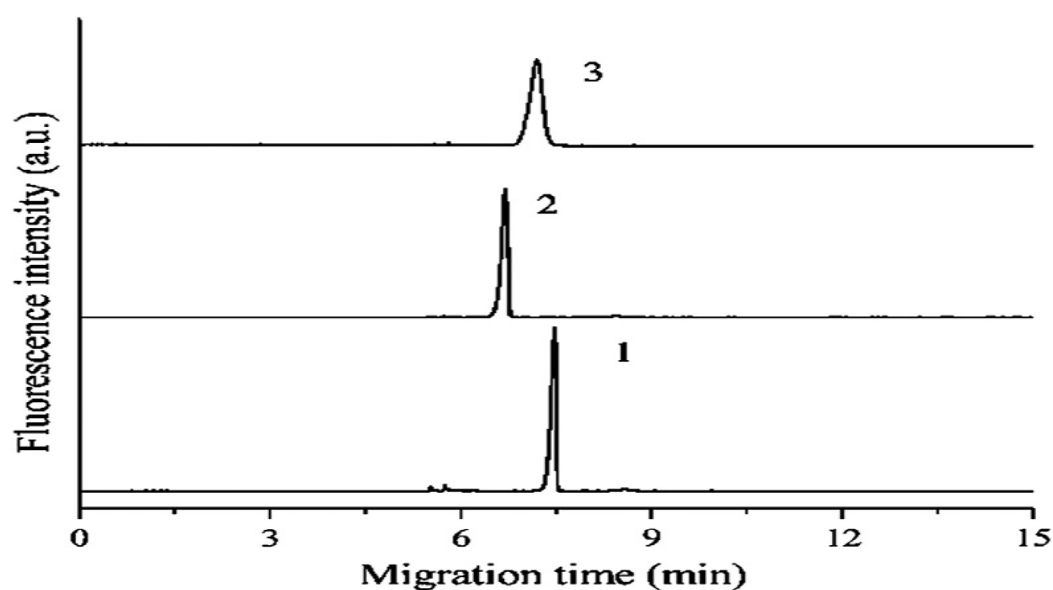


Obr. 7: 10 barev emisních spekter kvantových teček CdSe obklopených vrstvou atomů ZnS při excitaci UV lampou (převzato z cit. 41)

Jako nejčastější způsob vhodný k charakterizaci kvantových teček jsou UV/VIS absorbance a emisní spektra. Dále je možné měřit velikost částic pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). Obě metody jsou založené na interakci elektronů s jádry atomů ve vzorku, ale při přípravě vzorku může dojít k nežádoucí aglomeraci částic. Jako doplňkovou metodu lze použít mikroskopii atomárních sil (AFM), která poskytuje trojrozměrný obraz a její výhodou je snazší příprava vzorku. Kapilární elektroforéza, díky své vysoké separační účinnosti podle velikosti dokáže rychle a přesně určit velikost částic. Je jednou z nejlepších metod k detekci nanočástic. Z elektroforetické mobility lze vypočítat velikost částic. Na separaci má nejdůležitější vliv roztok základního elektrolytu (obr. 8) a uplatňuje se zde i velký vliv povrchové chemie. Ligandy, které jsou užívány ke stabilizaci, a který jsou vázány na povrch, mění jeho náboj a tím ovlivňují elektroforetickou mobilitu (obr. 9). Složení BGE ovlivňuje i intenzitu fluorescence kvantových teček.³⁷



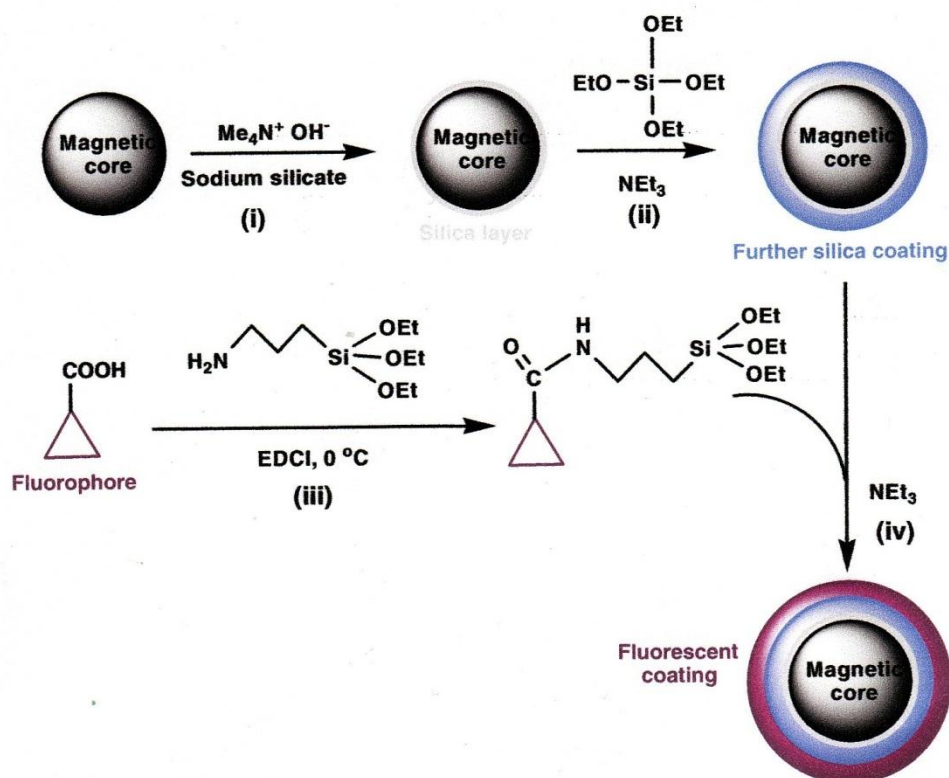
Obr. 8: Oddělení čtyř druhů QD s průměrem jader o velikosti v rozmezí 2 – 10 nm pomocí polyethylenglykolu (PGE), jako přídavku v pufru. Při vyšších koncentracích dochází k rozšíření píku, je důležité najít rovnováhu mezi dosažením účinného oddělení a rozšířením píku. (převzato z cit. 37)



Obr. 9: Elektroforegram tří CdTe QDS o stejné velikosti, ale s různými thioalkylovými ligandy: (1) thioglykolová kyseliny, (2), L-cystein, (3), glutathion, ligandy mění celkový náboj v důsledku čehož dochází ke změně migračního času (převzato z cit. 37)

2.3.5 Kovové nanočástice

Nejstudovanějšími v posledních letech jsou nanočástice ušlechtilých kovů stříbra a zlata včetně jejich aglomerátů. Pro svou velikost, chemické a fyzikální vlastnosti, se staly velice atraktivními.³⁸ Nanočástice stříbra vynikají svou biokompatibilitou. Jejich antibakteriální účinky jsou známy staletí. Na rozdíl od jiných nanočástic (např. TiO_2 , ZnO , CdSe , ZnS atd.) nepotřebují přítomnost fotokatalyzátoru. Bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita stříbra souvisí s velikostí stříbrných částic. Čím menší velikost, tím větší účinky.³⁹ Kovové nanočástice mohou obalovat i jiné nanočástice za vzniku kompozitů. Příkladem jsou silikátové nanočástice. Oblast, která je nyní v rozvoji je příprava flouorescenčních - silikátových magnetických nanokompozitů. Jedná se o kombinaci nanočástice polymerního oxidu křemičitého obsahující flouorescenční molekuly, v němž je uzavřený např. oxid železa. Vzniklý nanomateriál má široké potenciální využití, zejména ve flouorescenční mikroskopii. Oxid křemičitý zvyšují stabilitu částice v roztoku, zabraňuje agregaci, je biokompatibilní a dá se chemicky modifikovat různými biomolekulami.⁴⁰



Obr. 10: Popis přípravy flouorescenčního silikátového magnetického nanokompozitu (převzato z cit. 40)

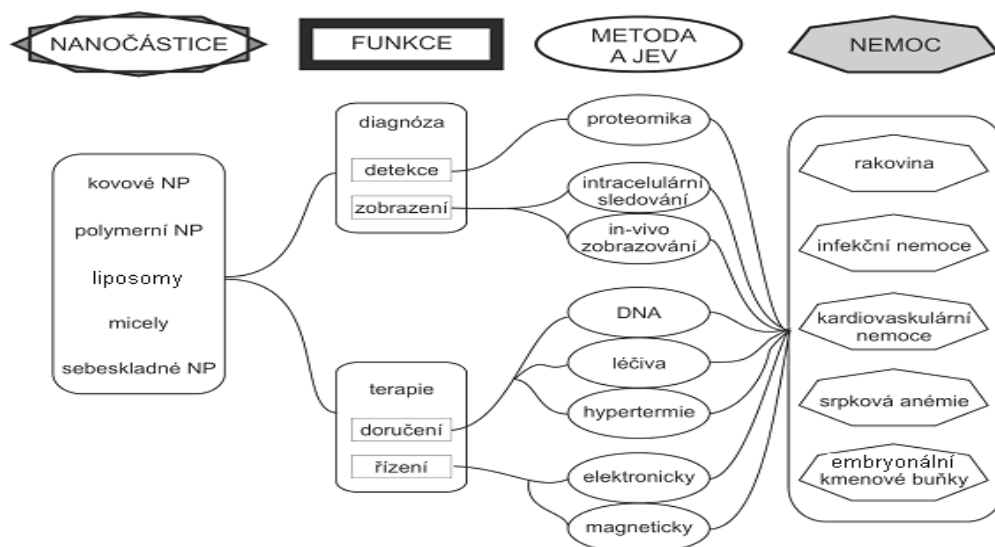
2.3.6 Dendrimery

Patří mezi rozvětvené makromolekulární nanomateriály disponující trojrozměrnou předem definovanou strukturou a složením. Obsahují jádro, vnitřní prostor skládající se z mnoha větví (dendronů) a vnější oblast (povrch s funkčními skupinami).^{41,42}

Specifickou vlastností dendrimerů je vysoká absorpční kapacita nanočástic kovů nebo oxidů do své struktury za vzniku kovových dendrimerních nanokompozitů.⁴² Ty mají předpoklad využití v medicíně, katalýze či jako molekulární senzory.⁴¹ Vzniklé nanokompozity se dělí se do čtyř skupin, z hlediska toho, kde je kov umístěn. Kov může tvořit jádro, být zapouzdřen uvnitř dendrimeru jako v „doupěti“, nebo se může nacházet na povrchu. Pak se jedná o typ, kde je kov koordinačně vázán po obvodu dendrimeru nebo v místech větvení. Dendrimer funguje jako stabilizátor nanokompozitu a ovlivňuje reaktivitu. Na druhou stranu můžou dendrony stabilizovat kovové nanočástice hned při přípravě nebo sekundární funkcionalizací tj. nahrazením původních povrchových atomů dedronem. Nejčastějším typem dendrimerů je PAMAM (polyamidoamin) s jádrem tvořeným ethylendiaminem.⁴¹ PAMAM dendrimery konjugované magnetickými nanočásticemi mohou být použity v oblasti životního prostředí jako absorbenty těžkých kovů ve vodě a půdě.⁴² Další širokou možností použití jsou biomedicínské aplikace. V oblasti lékařství mohou sloužit v diagnostice v metodách při zobrazování orgánů nebo v léčbě jako nosiče léku. Dendrimery snadno pronikají buňkami a migrují tkáněmi. Jedněmi z prvních nanočástic studovanými pro tyto účely byly PAMAM dendrimery s nanočásticemi zlata.⁴¹

2.4 Nanočástice v medicíně

Použití nanočástic v medicíně je jednou asi z jejich nejslibnějších aplikací a nejdiskutovanějším trendem současnosti. Nanočástice se zdají být vhodným kandidátem k boji proti nemoci, která neustále zabírá první příčky ve statistice nejčastějších onemocnění, rakovině. Protože manipulace na úrovni nanometrů zaznamenala velký zásah do aplikací na klinické úrovni v lékařských vědách, postupem času se vyčlenil nový obor zvaný „nanomedicína,“⁴³ Lze ji chápat jako aplikaci nanotechnologií pro sledování, opravy a regulaci lidských biologických systémů na buněčné úrovni s využitím materiálu na molekulární úrovni, tedy nanozařízení a nanostruktur.^{43,44} Snaží se porozumět základním mechanismům konkrétních onemocnění. Uplatnit se může v prevenci, diagnostice i samotné léčbě. Nanomateriály jsou dostatečně malé na to, aby velice citlivým způsobem pomohly dopravit diagnostické a terapeutické prostředky proniknutím přes biologické bariéry přímo k molekulám, následně zprostředkovaly molekulární interakce a odhalily molekulární změny. Zároveň mají velký povrch, natolik, že dokáží navázat velké množství potřebné látky. Některé nanočástice jsou v medicíně již užívány, u jiných se teprve využití hledá. Antibakteriální povlaky obsahující nanočástice stříbra se užívají jako prevence proti napadení bakteriemi u katetrů či zubních materiálů. Také u náhrad jako jsou cévní štěpy nebo endoprotézy. Stejně tak mohou eliminovat infekci při popáleninové léčbě a podpořit hojení vzniklých ran.⁴⁴ Použití jednotlivých typů nanočástic v konkrétních metodách je shrnuto na obr. 10.⁴⁵



Obr. 10: Základní jevy a principy aplikace nanotechnologie v medicíně (převzato z cit. 45)

2.4.1 Diagnostika

Nanotechnologie lze uplatnit v *in vitro* i *in vivo* diagnostice. Flourescenční mikroskopie a magnetická rezonance jsou zobrazovací techniky, do kterých stále více pronikají nanotechnologie a mají velký vliv na biomedicínskou vědu v posledních letech. Kvantové tečky a zlaté nanočástice mohou vystupovat jako senzory či biologické štítky v buněčném zobrazování, magnetické nanočástice zase jako kontrastní látky k detekci nádorů. Flourescenční – magnetické nanokompozity můžou být použity v obou technikách současně.⁴⁰ Nanočástice jsou vhodné pro diagnostiku z důvodu jejich vyšší citlivosti a selektivnosti. Jejich začleněním do klasických diagnostických metod se zvýší efektivnost vyšetření a zkrátí doba potřebná k vyšetření.^{46,47}

2.4.1.1 Nanobiosenzory, flourescenční sondy

Příprava senzorů na molekulární úrovni založených na vysokém rozlišení skenovacích mikroskopů použitelných pro živý organismus je jedním z hlavních úkolů pro nanotechnologie v lékařství. Nanomateriály jsou vhodnými kandidáty na biosenzory pro *in vitro* diagnostiku. Poskytují unikátní možnost detekovat a sledovat mírně změny frekvence signálu v komplexních biologických prostředích.⁴⁵ Jejich hlavní snahou je neinvazní, rychlá a přesná detekce biologických markerů určitých typů závažných onemocnění (např. infekční onemocnění, rakovina, kardiovaskulární choroby aj.)⁴⁶ Sledování molekulárních mechanismů je důležité k pochopení průběhu nemoci. Zařazením nanotechnologií do proteomiky a genomiky je možno zaměřit těžko dosažitelní cíle. Detekovat peptidy, proteiny, sledovat jednotlivé buňky, studovat sekvence RNA nebo DNA a rozpoznat rakovinné mutace.^{46,47} Nanobiosenzory, založené především na bázi kvantových teček, poskytují citlivější výsledky než používané metody RIA a ELISA. Biokonjugáty QDs potažené streptavidinem se v biologických studiích využívají pro zvláštní barvení buněk a tkání. Další možností uplatnění biosenzorů je klinická diagnostika. Kombinace optického biosenzoru s čipem povrchem imobilizovaným několika tisíci protilátek (anti - HBsAg) byla použita k detekci markerů hepatitidy typu B z krevního séra pacienta. Oproti nejčastěji používané imunologické metodě ELISA, se kterou byly výsledky shodné, má biosensor s čipem výhodu v tom, že snímání senzorem je rychlejší (výsledek během 5 – 8 minut) a čip je opakovatelně použitelný (100 – 150krát). Navíc nevyžaduje zaměstnání biologických štítků, pro detekci těchto markerů. Jiným příkladem je nanosenzor pro stanovení hladiny koncentrace glukózy a inzulínu v krvi. Mikročip (5 x 8 mm), vložený v těle pacienta zaregistruje změnu

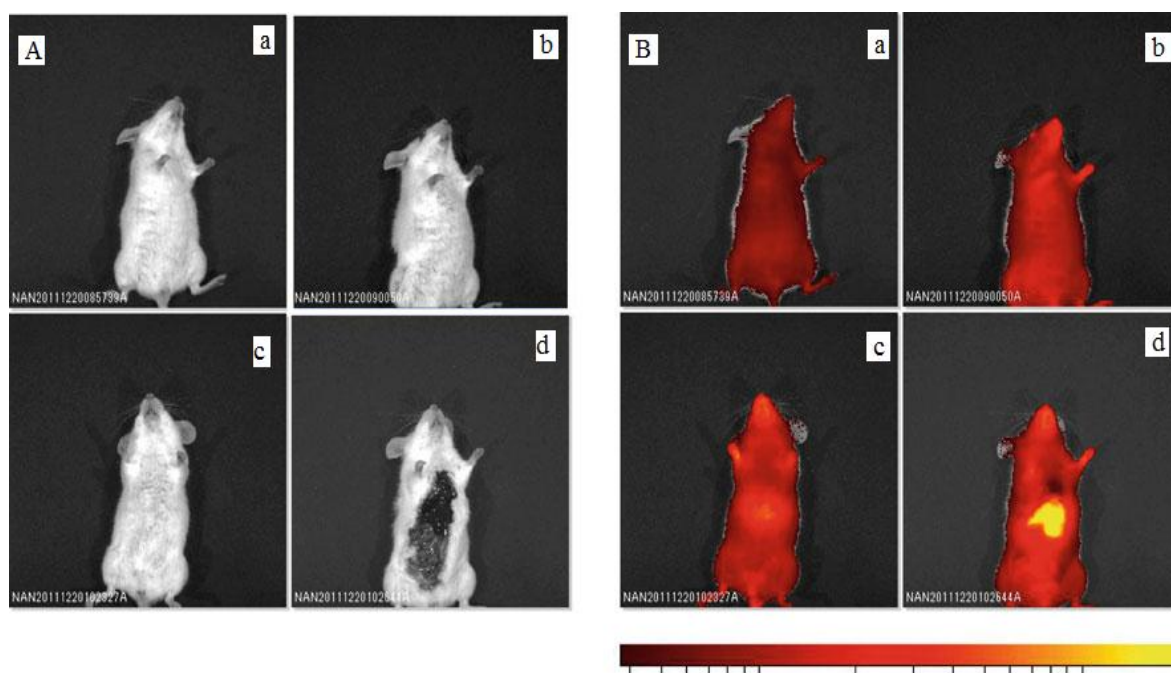
hladiny glukózy přeměnou biochemické reakce na elektrický signál. Včasná detekce rakoviny je jedním z hlavních směrů nanodiagnostiky. Dendrimery jsou vhodným materiálem pro tvorbu nanosenzorů k detekci rakoviny. Do jedné z nových metod k detekci rakovinných buněk se řadí imunitní testy. Zavedením nanosenzorů s fluorescenční vrstvou do buněk imunitního systému lymfocytů se získá odpověď jejich imunitní reakce v závislosti na změně intenzity fluorescence.⁴⁶

2.4.1.2 Kontrastní látky

Mezi populární a velice efektivní zobrazovací metody patří magnetické rezonanční zobrazování (MRI). Jde o neinvazní techniku pro zobrazování *in vivo* a klinickou diagnózu. Poskytuje 3D tomografické informace v celém vzorku tkáně s vysokým rozlišením. Obraz vzniká na základě relaxačních procesů protonů v jádře umístěných v externím magnetickém poli a vystavených radiovému vlnění. Jedná se o podélné relaxační procesy T1 (spin- mřížová relaxace), která dává světlý kontrast a příčné T2 (spin- spinová relaxace), ty dávají tmavý kontrast. Ke zvýšení citlivosti vnímání se užívají kontrastní látky, obsahující paramagnetické kovové ionty, které svým působením ovlivňují výši relaxačních procesů, podle čehož jsou děleny na skupinu T1 (pozitivní) a T2 (negativní). Kontrastní látky T1 působí zvýšení intenzity signálu a objeví se jako světlý rozdíl na snímcích, kdežto látky T2 působí snížení intenzity signálu a projeví se jako tmavší rozdíl na snímcích.

Dnes užívané cheláty toxického gadolinia by mohly být nahrazeny nanočásticemi.⁴⁸ Nadějní kandidáti jsou magnetické nanočástice oxidů železa, které mohou poskytnout detekci nádorových buněk.^{48,49} Pomocí magnetického pole jsou dopraveny do postižené oblasti, kde jsou udrženy po dobu nezbytnou ke komplexní diagnóze. Pro biomedicínské aplikace jsou vhodné nejen pro své snadné rozptýlení, jedinečné magnetické vlastnosti a svou mikrostrukturu. Ale obzvlášť pro větší nasycené magnetizace, než u gadolinia, čímž silněji zasahují do T2 relaxace a zvyšují kontrast MRI. Velkou roli v jejich kontrastních vlastnostech také hraje povrchová chemie a velikost. Nejznámější je úprava povrchu dextranem, který zaručí delší dobu trvání v organismu.⁴⁷ Pro klinické aplikace ke zobrazování karcinomu jater byly schváleny supermagnetické nanočástice $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nebo Fe_3O_4 (SPIO) o velikosti 120 – 180 nm, modifikované dextranem známé pod obchodním názvem Feridex, nebo karboxydextranem (Resovist), o velikost asi 60 nm. Tyto roztoky jsou podávány intravenózně.^{47,48,50} Po intracelulárním vyloučení RES jsou metabolizovány do rozpustné superparamagnetické formy „běžného“ železa, které se stane součástí např. hemoglobinu.⁵⁰

Stejný typ magnetických nanočástic označených specifickou protilátkou Herceptin (Trastuzumab), která zaručí doputování kontrastní látky k nádorové buňce, byl použit v preklinických testech k identifikaci receptoru 2 pro lidský epidermální růstový faktor (HER 2), který je výrazem zhoubného bujení. Tento způsob podání specifické kontrastní látky funguje na interakci protilátka – receptor.⁵¹ Jiným příkladem jsou kvantové tečky, které jsou vhodné jako kontrastní látky pro *in vivo* fluorescence zobrazování. Možnosti proniknutí světelných emisí do živé tkáně byla zkoušena v preklinických testech. Koloidní roztok QDs s jádrem z CdSe a obalem z SiO₂ a povrchovou úpravou pro zlepšení zobrazovací schopnosti v živém organismu, byl použit k fluorescence zobrazování myši pomocí *in vivo* zobrazovacího systému (IVIS). Fluorescence tkáně byla jasně viditelná po uplynutí delší doby od počátku vstříknutí do ocasní žíly. (obr. 11).⁵²



Obr. 11: A) fotografie a B) IVIS obrázky myši a) před, b) 5 min. c) 1 hod. po aplikaci injekce QD/SiO₂/PEG částic koloidního roztoku, d) po vstříknuté roztoku byla provedena laparotomie. (převzato z cit. 52)

2.4.2 Terapie

2.4.2.1 Nanočástice jako léky a nosiče léků

Myšlenka využití nanočástic jako léčiv nepatří k nejnovějším konceptům. Farmaka nanočástic se již běžně používají. Nanomateriály mohou být použity k syntéze nových léčivých přípravků, nebo ke zvýšení účinnosti původních.⁵³ Poskytují několik evidentních výhod, mezi které lze zahrnout zvýšenou rozpustnost hydrofobních léků v krvi a vysokou míru solubilizace, dále zlepšení farmakokinetiky (mnoho léků získá schopnost pronikat přes membránu a hematoencefalytickou bariéru), rychlý terapeutický efekt a snížení rizika vedlejších účinků.^{53,54} Mohou být buď aktivním lékem nebo jeho nosičem. Příkladem léčivého přípravku je lék Phosphogliv vyvinutý v Rusku. Jedná se o léčivo, které je tvořeno částicemi v průměru do 50 nm a obsahuje sójový fosfatidylcholin a kyselinu glycyrrhizovou. Tento certifikovaný lék patří do skupiny látek ochraňující játra a užívá se k léčbě hepatitidy (A, B, C a D), při poškození jater alkoholem, drogami nebo pro léčbu bronchiálního astma.⁵⁴ Velkou pozornost vzbuzují fullereny a jejich deriváty, fullerén C60 především, pro své biologicko - lékařské účinky. Z preklinických testů bylo zjištěno, že by mohly být schopny opravit škody vzešlé z oxidativního stresu v buňkách. Velkou předností je schopnost pronikat hematoencefalytickou bariérou, proto mají předpoklad k léčení např. Parkinsonovy nemoci a jiných neurodegenerativních chorob. Při pokusech na potkanech adukty fullerenu C 60 s PVPP bylo zjištěno, že jsou schopni zabránit znehodnocení dlouhodobé paměti. Deriváty fullerenu by mohly mít i antivirové účinky.⁴⁶

Vývoj systémů s nosiči léku pokrývá téměř všechna pole medicíny např. endokrinologii, kardiologii, nejvíce však onkologii.⁴⁶ Vývoj nanosystémů pro aplikaci léku využívá skoro všech typů nanočástic a jejich kompozitů (dendrimery, polymerní micely, fosfolipidní nanočástice – lipozomy, supermagnetická jádra oxidu železitého, zlaté nanočástice i fullereny). Všichni splňují kladené požadavky, tj. žádná toxicita, imunogenita, karcinogenita a schopnost přenášet a uvolnit dostatečné množství léku přímo na místě.^{54,55} Lék může být absorbován na povrchu, kovalentně navázán nebo zapouzdřen v matrici. Stabilita a distribuce nanočástic uvnitř mikrobiologického prostředí závisí na jejich chemické povaze a velikosti. Povrchová úprava syntetickými polymery zvyšuje stabilitu systému tím, že prodlouží dobu oběhu v krevním řečišti. Jako povlak nanočástic se často užívá PEG, který vytváří efekt sterické stabilizace a tím snižuje imunogenitu systému.⁵⁵ Stabilizační molekula je s povrchem nanočástice spojena tzv. spojkou (linker), která je vybrána tím způsobem, že

jakmile systém dorazí k cílovému místu je vazba zrušena a lék je uvolněn (může být vyvoláno změnou pH, chemickou reakcí apod.).⁵⁴

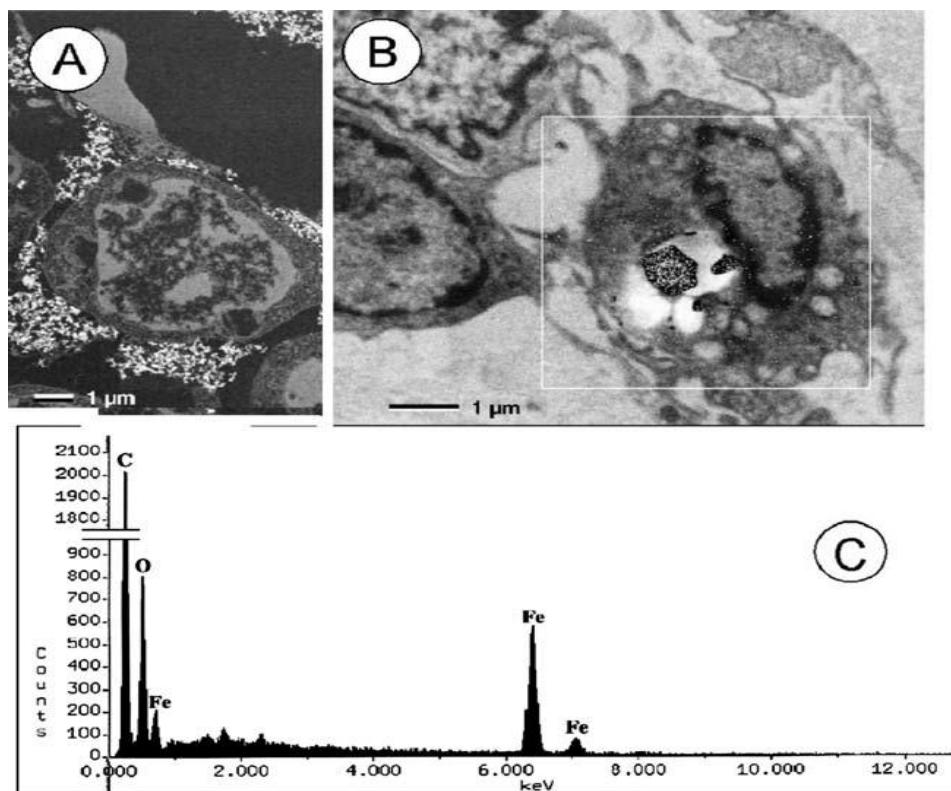
Nejčastěji se do nosiče léků včleňují protinádorové léky. Konvenčně užívaná chemoterapeutika se ukazují jako nedostatečná. Důvodem je nízká selektivita a nespecifický účinek, čímž způsobují svou toxicitou řadu vedlejších příznaků a ničí zdravé buňky. Protože leckdy se stane, že než jsou doručena k nádorovému místu, dojde k uvolnění toxických účinků do okolí zdravé tkáně. Systém cíleného doručení má předpoklady překonat omezení chemoterapeutik za současného posílení terapeutického účinku.⁵⁶ Cílení nádorové tkáně, nebo i nádorové buňky lze dosáhnout pasivním nebo aktivním směřováním léku. Pasivní směřování je založeno na EPR efektu v cévním systému nádoru, který propouští i velké molekuly a nedostatečné funkce lymfatického systému,⁵⁶ který je odpovědný za odvod molekul.⁵⁴ Díky tomu dochází k hromadění nanočástic dostatečně dlouho na to, aby došlo k uvolnění léku a vyvinutí terapeutické účinnosti. Úspěšné cílení závisí na velikosti nanočástic. Aktivní směřování dodávky cytostatika k nádoru vyžaduje navázání specifických ligandů na povrch nanočástic. Jedná se o molekuly s vysokou afinitou. Obecně lze říct, že „zaměřující“ ligandy jsou protilátky či jejich fragmenty komplementární k receptorům (např. HER2 či kys. listová), které produkují nádorové buňky v důsledku jejich metabolické poptávky a které se běžně nevyskytují v normálních buňkách.⁵⁶ Již jsou některé léky na bázi nanočástic, které jsou schváleny po celém světě. Jako první komerčně dostupný lék byl lipozomální protinádorový lék Doxorubicin. Další příklady shrnuje Tabulka I.⁵³

Tabulka I.: Příklady schválených léčiv velikosti nanometrů (převzato z cit 53)

Nanočástice	Název léku	Indikace
Liposom	Doxorubicin HCl	cytostatikum
	Amphotericin B	antifungicid
	Daunorubicin citrate	cytostatikum
Nanokrystal	Verteporfin	makulární degenerace
	Sirolimus	imunosupresant
	Aprepitant	antiemetikum
	Megestrol acetate	anorexie
	Fenofibrate	hypercholesterolémie
Ostatní	Paclitaxel	cytostatikum
	Pegaspargase	cytostatikum

Uhlíkové nanotrubice by také mohly být použité k cílenému transportu léčiv. Ukázaly některé výhody oproti protinádorovým přípravkům využívající liposomy a dendrimery (např. doxorubicinu). Jejich biologická bezpečnost je v současné době v centru zkoumání. Z dostupného vědeckého bádání bylo zjištěno, že by mohly mít aplikovány zejména v léčbě nádorů CNS, protože jsou schopny proniknout hematoencefalytickou bariérou, která omezuje výměnu látek mezi krví a mozkem. Snížená hladina neurotransmiteru acetylcholinu při Alzheimerově nemoci způsobuje zhoršení paměti a kognitivních funkcí. Protože je acetylcholin silně polární, neprojde skrz hematoencefalytickou bariérou k neuronům do mozku. V případě, že se absorpuje na SWNTs je do mozku dopraven. Tento poznatek otevřel dveře pro využití uhlíkových trubic jako nosičů léků při léčbě nádorů mozku.⁵⁷

Jiným příkladem je vytvoření magnetických nosičů, které je možno aktivně cílit např. rychle se měnícím magnetickým polem, elektrickým polem, X – paprsky nebo světlem. Magnetické nanočástice podobně jako všechny ostatní nanočástice musí být modifikované biokompatibilním materiálem (např. škrobem), na jehož funkční skupiny se naváže chemoterapeutikum a externím magnetickým polem jsou dopraveny k nádorové buňce (obr. 12). I tady je zaručená účinná léčba cytostatikem bez poškození zdravé tkáně. K desorpci dojde až v místě nádoru.⁵⁸ Uvolňování léčiv z magnetických nanočástic může být ovládané nefyziologickým zvýšením teploty. Léčebná metoda se nazývá hypertermie. Připraví se magnetická lipidová nanočástice (magnetoliposom). V lipidové matici jsou zapouzdřené léky a integrovaný magnetický topný prvek ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ částice). Na povrchu je navázán polymerní stabilizátor a pro cílené doručení specifické ligandy. Tento systém se při tělesné teplotě nerozpouští. V případě zvýšení teploty v rozmezí 45 °C až 55 °C se pevná lipidová matrice taví a zapouzdřené molekuly léků propouští v pravidelných intervalech. Hypertermii lze provádět mikrovlnným zářením, vířivými proudy nebo topením. Musí být přísně řízena, protože topný systém může představovat vážné ohrožení přilehlých zdravých tkání. Ohřev topných magnetických částic ve střídavém magnetickém poli lze přisoudit různým mechanismům a závisí na velikosti jejich magnetických vlastností. Vytápění pravidelných multi-doménových feromagnetických částic je způsobeno zejména hysterezními ztrátami. U jednodoménových částic, kde je hysterze zanedbatelná je topení způsobeno rotací zúčastněných magnetických momentů a fyzickým pohybem částic ve střídavém magnetickém poli.⁵⁹



Obr. 12: Detekce distribuce Fe v nádorové tkáni pomocí SEM po magnetickém cílení léku A) dopravní systém mimo nádorové buňky B) značné množství dopravního systému v nádorových buňkách c) XPS spektrum Fe v nádorových buňkách, sloužící k důkazu, že signál zpětně odražených elektronů pochází z Fe. (převzato z cit.58)

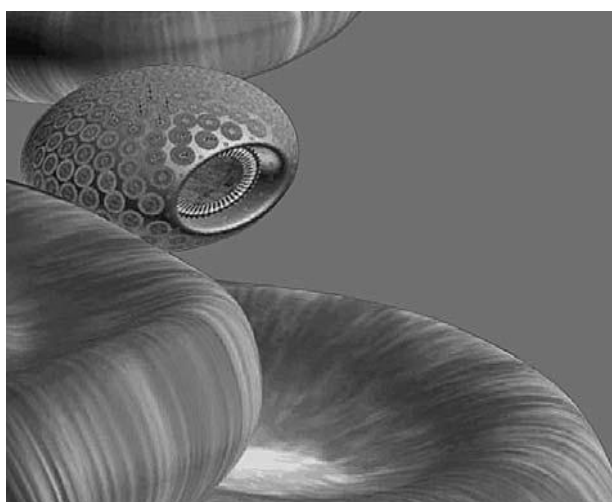
2.4.2.2 Tkáňové inženýrství

„Nanomedicína“ se snaží vyvinout lepší implantáty pro regeneraci nejčastěji postižených tkání kostí, zubů, ale také nervové soustavy, srdce, apod. Nanomateriály lze použít pro pěstování umělých tkání a orgánů⁵⁴ nebo mohou sloužit k povrchové úpravě implantátů.⁶⁰ Příkladem jsou konstrukční matrice z přírodních nebo syntetických polymerních materiálů pro pěstování např. chondrocytů, osteoblastů, nebo myoblastů. Výhodou přírodních polymerů je podobnost s makromolekulami obsaženými v organismu. Nejčastěji se užívají nanovlákná kolagenu nebo chitosinu.⁵⁴ Pro úpravu stávajících implantátů se užívají nanovlákná Ti, TiO₂, hydroxyapatitu, ZnO₂, i uhlíkové nanotrubičky. Ortopedické náhrady jsou po chirurgickém výkonu zatíženy vznikem zánětu na rozhraní implantát - hostitelská tkáň. Navině jsou zánětlivé buňky (například makrofágy). Četné pokusy ukazují, že v případě kdy byly na povrch náhradního materiálu absorbované uhlíkové nanotrubičky, byla snížena

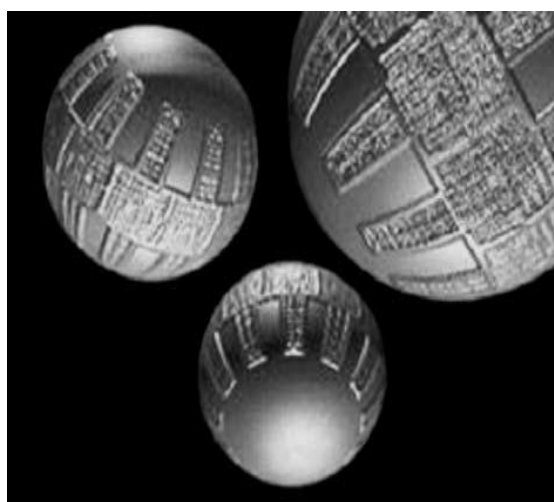
přilnavost makrofágů. Důvodem je zvýšená drsnost povrchu a větší povrchová energie. Mezi další problém, kterým trpí ortopedický materiál je infekce na biomateriálovém povrchu. I tady je možno využitím nanomateriálů infekci zabránit. Nanočástice ZnO_2 a TiO_2 ukazují slibné antibakteriální účinky. Ortopedické implantáty nejsou jediné, kdo může výhody „nanomedicíny“ využívat. Dalším příkladem je regenerace nervových tkání zahrnující diferenciaci kmenových buněk do neuronů. Velký potenciál ukázaly uhlíkové nanotrubičky, opět díky své jedinečné povrchové energii, kdy podporují adsorpci bílkoviny lamininu, která je klíčovým proteinem zvyšujícím diferenciaci kmenových buněk do neuronů.⁶⁰

2.4.2.3 Medicína budoucnosti

Chirurgie, je obor medicíny, který by se mohl dostat díky nanotechnologiím do zcela jiného úhlu pohledu. Předpoklad je takový, že by operační zákrok neprováděly ruce chirurga, ale nanorobot jim externě řízen (obr. 13). Sestrojení biosenzoru nanorobota lze považovat ze jeden z velkých úkolů nanotechnologií v medicíně.⁵⁴ Objevit by mohly být přibližně za 10 – 20 let.⁴⁶ Lékařský nanorobot by představoval kybernetické zařízení velikosti nanometrů vytvořené s atomovou přesností. Byl by schopen provádět kontrolované buněčné opravy na molekulární úrovni. Po zavedení do krevního oběhu by našel nemocnou buňku a prostřednictvím mikro - skalpelu provedl požadovanou „operaci“.⁵⁴ Nicméně metody molekulárního modelování jdou ještě dále. Prokázaly schopnost sestavit mnohem složitější systém, nanorobota, který představuje umělé červené krvinky tzv. respirocyty (obr. 14).⁵⁴



Obr. 13: Nanorobot v krevním řečišti
(převzato z cit. 54)



Obr. 14: Respirocyty (převzato z cit. 54)

2.5 Kapilární elektroforéza (CE)

2.5.1 Charakterizace

Během posledních let se kapilární elektroforéza stala velice populární analytickou metodou. Má široké pole působnosti. Poskytuje analýzy od anorganických iontů až po velké fragmenty DNA. Její velkou předností je rychlost, vysoká separační účinnost (až miliony teoretických pater) a hmotnostní citlivost (od 10^{-15} po 10^{-21}), to vše za minimální spotřeby vzorku (nl až pl). Může být použita s různými detekčními systémy (včetně hmotnostní spektrometrie).⁶⁴ Je komplementární k vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC).⁶¹

2.5.2 Princip

Kapilární elektroforézu řadíme mezi elektromigrační separační metody, které jsou stále častěji souhrnně označovány jako vysoko účinná elektroforéza – HPCE („high-performance capillary electrophoresis“). Je schopna separovat ionty na základě jejich různé pohyblivosti ve stejnoměrném elektrickém poli. Separace probíhá v kapiláře úzkého průměru.^{61,62} Pohyblivost iontu, neboli mobilita, o kterou se elektroforéza opírá, je definována:

$$v = \mu_e \cdot E \quad (1)$$

kde μ_e je elektroforetická mobilita a E je intenzita elektrického pole

Mobilita je pro daný ion a médium charakteristickou konstantou pro tento ion.

Na nabitý ion působí síla elektrického pole F_E , která ho uvádí do pohybu a je dána vztahem:

$$F_E = q \cdot E \quad (2)$$

kde q je náboj iontu.

proti ní působí tzv. frikční síla, která iont brzdí a je dána Stokesovým zákonem:

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (3)$$

kde r je hydrodynamický poloměr iontu a η je viskozita prostředí.

V případě vyrovnání obou sil nastane stacionární stav, kde jsou si síly rovny, definovaný rovnováhou těchto sil:

$$q \cdot E = 6\pi\eta r v \quad (4)$$

pro elektroforetickou mobilitu částice vychází vztah:

$$\mu_e = v/E = q/6\pi\eta r v \quad (5)$$

Z rovnice je zřejmé, že malé a vysoce nabité částice mají vysoké mobility, zatímco velké, minimálně nabité částice mají mobility nízké. Elektroforetická pohyblivost je fyzikální konstanta, nalézáme ji v chemicko-fyzikálních tabulkách^{63,64}.

2.5.3 Elektroosmotický tok

Základní hybnou silou kapilární elektroforézy je elektroosmotický tok (EOF), který je důsledkem povrchového náboje na vnitřní stěně kapiláry, který je určen ζ – potenciálem. EOF vyplývá z účinků elektrického pole na difúzní vrstvu elektrické dvojvrstvy, která obklopuje nabitě částice v roztoku elektrolytu.^{64,65}

Běžně používané jsou křemenné kapiláry, jejichž povrch je tvořen silanolovými skupinami (-SiOH), které mohou existovat v aniontové formě (SiO⁻) (obr. 15 A). Protiionty elektrolytu, aby zachovaly rovnováhu náboje, se začnou hromadit u povrchu a vytvoří difúzní dvojvrstvu. Kde vnitřní část je vázána silně k povrchu a vnější je vázána slaběji a je proto mobilní. Na pohybovém rozhraní, tzv. smykové ploše difúzní dvojvrstvy, existuje ζ – potenciál (obr. 15 B). To znamená, že částice migruje jako kinetická jednotka, vždy spolu s určitým množstvím kapaliny. Proto v případě vloženého napětí, kdy jsou kapilární kationty difúzní dvojvrstvy přitahovány ke katodě, díky jejich solvatačním obalům jejich pohyb sebou strhává celý dávkovaný roztok v kapiláře (obr. 15 C). Tím je EOF vysvětlován.⁶³⁻⁶⁶

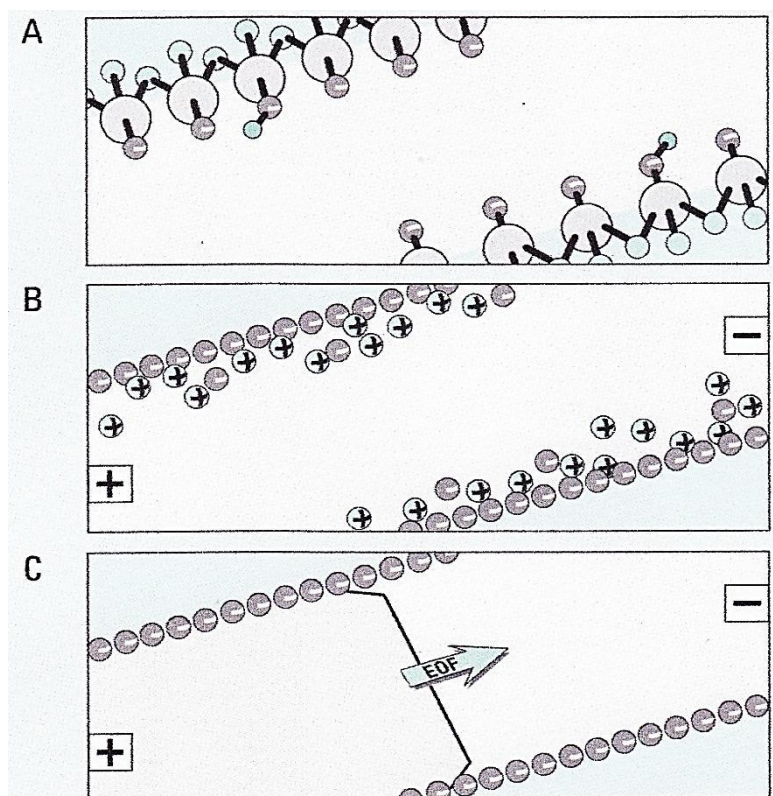
EOF může být vyjádřen rychlostí:

$$v_{eo} = (\epsilon\zeta / \eta) \cdot E \quad (6)$$

nebo mobilitou:

$$\mu_{eo} = \epsilon\zeta / \eta \quad (7)$$

kde ϵ je dielektrická konstanta, ζ , je elektrokinetický potenciál a η je viskozita roztoku



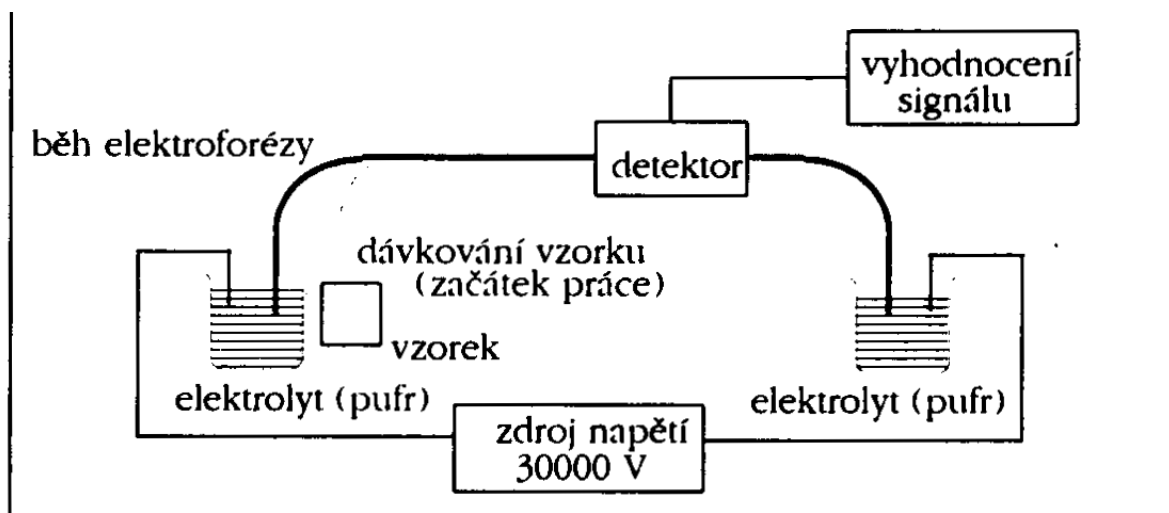
Obr. 15: Vznik elektroosmotického toku A) záporně nabitý silanový povrch (SiO^-) B) hydratované kationty hromadící se u povrchu C) objemový tok směrem ke katodě při aplikaci elektrického pole (převzato z cit. 63)

Protože je zeta potenciál závislý na pH, bude se i velikost EOF měnit s pH. Při vysokém pH je EOF podstatně vyšší než při nízkých hodnotách pH, protože jsou silanové skupiny deprotonizovány.

Unikátní vlastností EOF je plochý rychlostní profil proudění, který přispívá ke vzniku ostrých zón. Další významnou vlastností EOF je to, že způsobuje pohyb téměř všech částic ve stejném směru bez ohledu na jejich náboj. Kationty migrují nejrychleji, pak migrují neutrální částice, které nejsou odděleny a nejpomalejší jsou anionty, protože jsou částečně přitahovány k anodě. Modifikací stěny kapiláry lze změnit či zvrátit EOF. V tomto případě budou kationty a anionty migrovat v opačných směrech.^{63,65}

2.5.4 Instrumentace kapilární elektroforézy

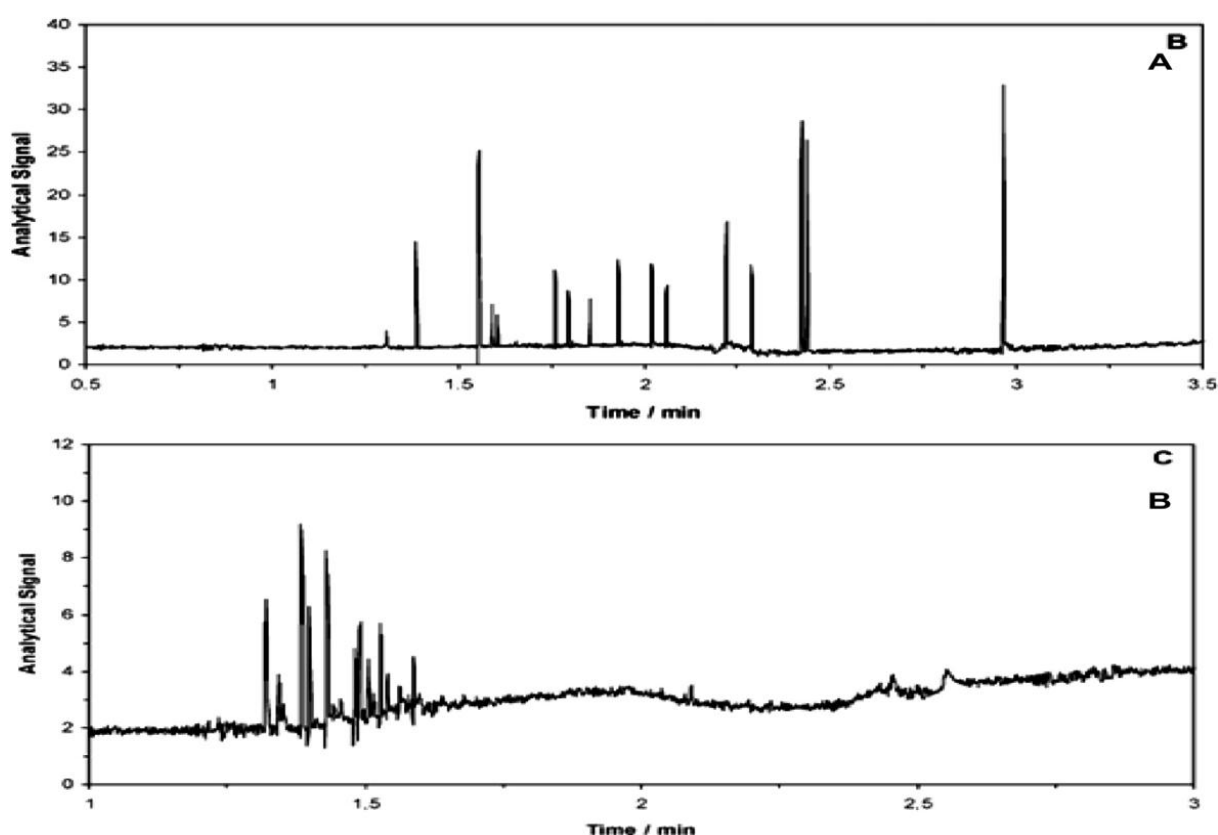
Kapilární elektroforéza je vyznačuje poměrně jednoduchou instrumentací, jak je vidět na obr. 16 a také jednoduchým a levným provozem.⁶²⁻⁶⁴ Skládá se ze zdroje vysokého napětí, systému elektrod, separační kapiláry, vstupní a výstupní elektrolytové nádoby, zásobníku vzorku, detektoru signálu a počítače k jeho vyhodnocení.



Obr. 16: Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu (převzato z cit. 64)

2.5.5 Analýza nanočástic kapilární elektroforézou

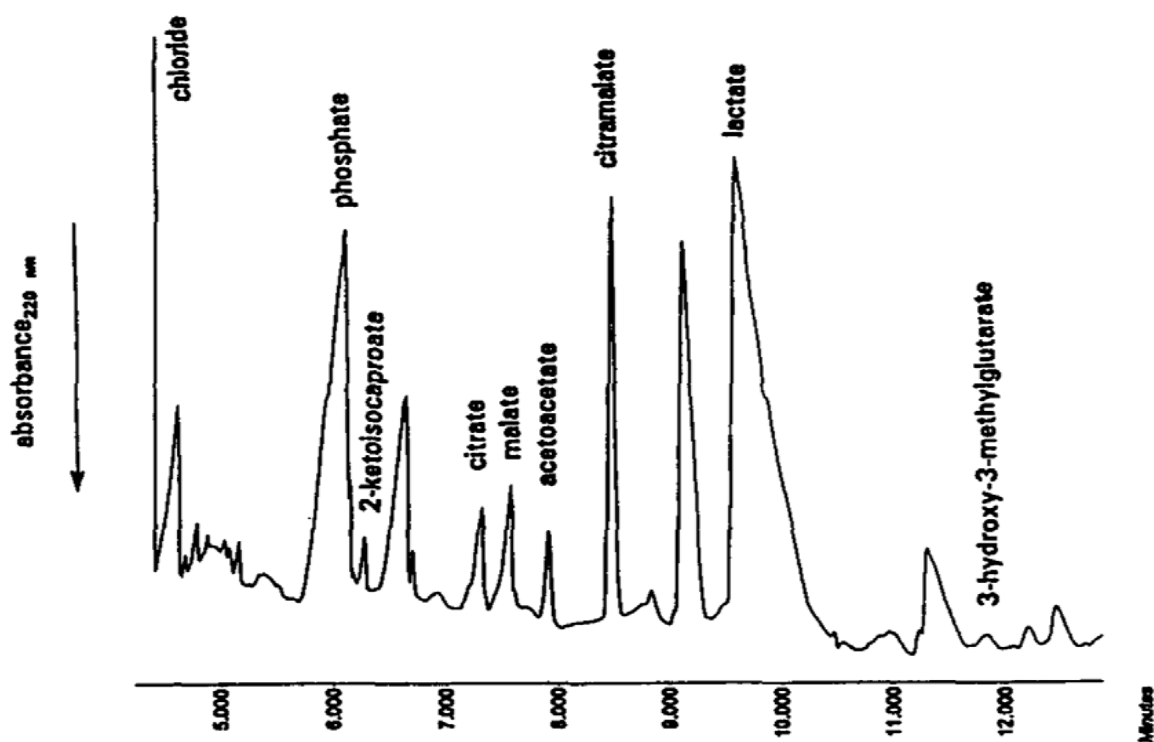
Kapilární elektroforéza je velice vhodnou technikou k charakterizaci nanočástic. Ukázala se jako vhodná alternativa ke konvenčně užívaným metodám. Poskytuje informace o velikosti částic, povrchovém náboji a dokáže oddělit jednotlivé populace nanočástic. Jako příklad je uvedena separace uhlíkových nanotrubeček (obr. 17) s pomocí iontové kapaliny a ultrazvuku (zeta potenciál - 10 kW, jako BGE byla použita kyselina mravenčí, jejíž pH = 2 bylo získáno přidáním kyseliny chlorovodíkové). Při rychlém a vysokém rozlišení separace je CE schopná oddělit vzorek nanotrubeček do jednotlivých frakcí stejně velkých trubeček.⁶⁶



Obr. 17: Rozdělení velikosti byl následující: (A) průměry 2,1-5,1 nm a (B) délky 2-20 nm (převzato z cit. 66)

2.5.6 Analýza biologických vzorků kapilární elektroforézou

Kapilární elektroforéza je díky svým vysokým separačním schopnostem, nízké spotřebě vzorku a univerzálnosti aplikace (např. anorganické ionty, organické molekuly, biomolekuly) za pomoci většinou jedné kapiláry a pouhé výměny složení pufrů, vhodná k analýze biologických vzorků. Skvěle se hodí i do forenzních laboratoří (např. soudní lékařství, toxikologie). V rukou forenzních chemiků představuje silný a poměrně nový analytický nástroj vhodný k vyšetřování většiny forenzních vzorků.⁶⁷ Lze využít pro sledování antibiotik v plazmě nebo vzorcích tkání,⁶⁸ či analýzu endogenních nízkomolekulárních metabolitů v lidském séru.⁶⁹ Jako příklad přímé analýzy lidského séra pomocí CE lze uvést stanovení organických látek (obr. 18). Bylo analyzováno neředěné sérum. Je však nutno vzít v úvahu, že obsah soli v lidském séru je vysoký a může způsobit změnu v migračním čase a maximálním rozšíření, což vede k nižší účinnosti separace.⁶⁹



Obr. 18: Elektroforegram organických kyselin v séru z pediatrických pacientů s respirační insuficiencí. (detekce, absorpce při 220 nm, vzorek neředěného séra, tlak 100 mbar/6 s (převzato z cit. 69))

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Na přípravu základních pufrů a promývacích roztoků byly použity: hydroxid sodný dodaný firmou Merck (Darmstadt, Německo), kyselina boritá, polybrene (PB), didodecyldimethylamoniumbromid (DDAB), chlorid sodný (NaCl), kyselina citrónová a 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina (MOPS) dodány společností Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA). Všechny chemikálie byly analytické čistoty (p.a.). Ke všem analýzám se používala voda deionizovaná získána přístrojem Direct-Q 3 od firmy Millipore (Billerica, MA, USA).

3.1.2 Vzorky

K analýze byly použity vzorky Ag nanočástic 10 nm a 20 nm zakoupené od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) a magnetické nanočástice smAA-COOH získané od Centra výzkumu nanomateriálů, RCPTM (skupina prof. Zbořila).

3.2 Příprava elektrolytů

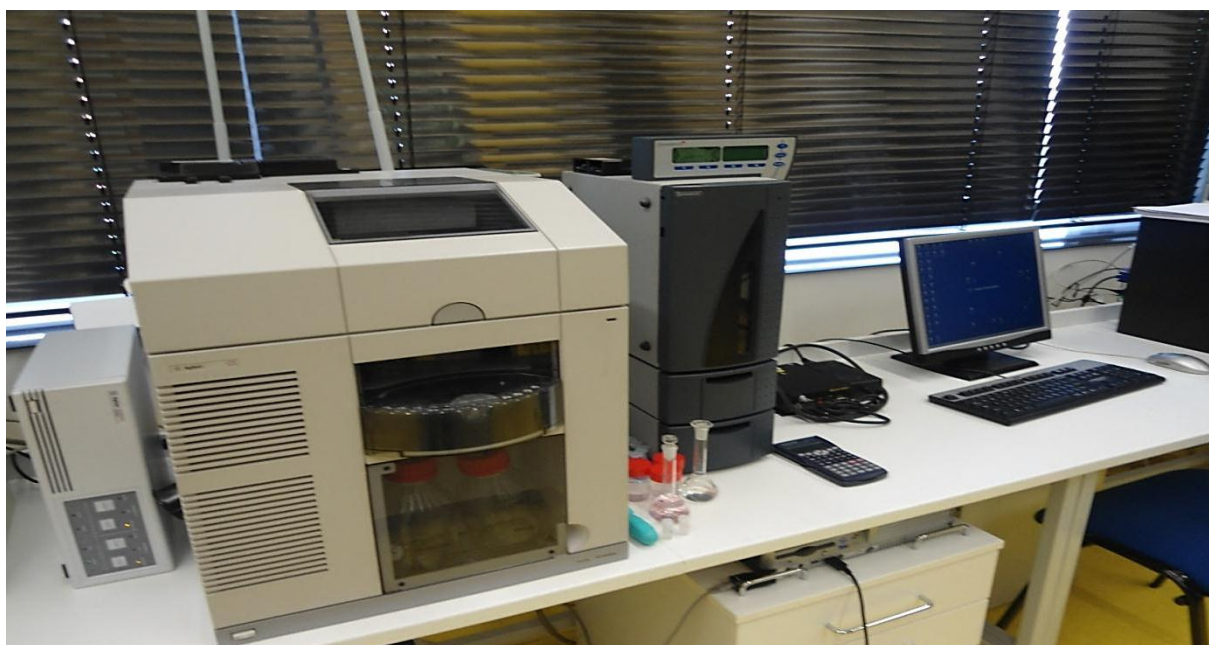
Bylo testováno několik typů pufrů. Nejprve byl připraven zásobní roztok 50 mM borátu rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny borité v 50 ml deionizované vody a jejím titrováním 50% a 10 % (w/w) hydroxidem sodným na požadované pH = 9,5. Průběžná hodnota pH byla kontrolována pH metrem. Následovalo připravení aditiv 1 mM DDAB a 1 mM PB rozpuštěním jejich vypočítaného množství v 5 ml výše popsaného 50 mM borátu. Z takto připravených roztoků byly ředěním připraveny pufrы o nižší koncentraci. Jako poslední byly připraveny pufrы citrát, borát a MOPS, které sloužily jako aditivum k pufru 10 mM NaCl. Sestávaly z kyseliny citronové, kyseliny borité a soli MOPS, navážením jejich příslušného množství a následným rozpuštěním ve 2 ml předem připraveného zásobního roztoku 10 mM NaCl. Ten byl získán rozpuštěním odpovídajícího množství NaCl v 50 ml deionizované vody.

3.3 Instrumentace a experimentální podmínky

Všechny vzorky byly analyzovány přístrojem kapilární elektroforéza HP 3D-CEs detekcí s diodovým polem DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), obr. 18. UV detektor byl nastaven pro všechny analýzy na vlnovou délku 200 nm. Separace probíhala s využitím nepokryté křemenné kapiláry o celkové délce 33 cm s vnitřním průměrem 50 μm a vnějším průměrem 365 μm (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA). Efektivní délka kapiláry činila 24,5 cm. Kazeta s kapilárou byla temperována na 25 °C.

Vzorek byl do kapiláry dávkován po dobu 5 s pod tlakem 50 mbar. Všechna měření byla prováděna třikrát, není-li uvedeno jinak.

Před každým měřením byla kapilára propláchnuta 0,5 M roztokem hydroxidu sodného po dobu 5 minut, poté deionizovanou vodou po dobu 10 minut a nakonec připraveným elektrolytem po dobu 2 minut. Všechna proplachování kapiláry probíhala pod tlakem 925 mbar.



Obr. 19: Fotografie používaného přístroje HP 3DCE Agilent Technologies.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Studium velikosti nanočástic

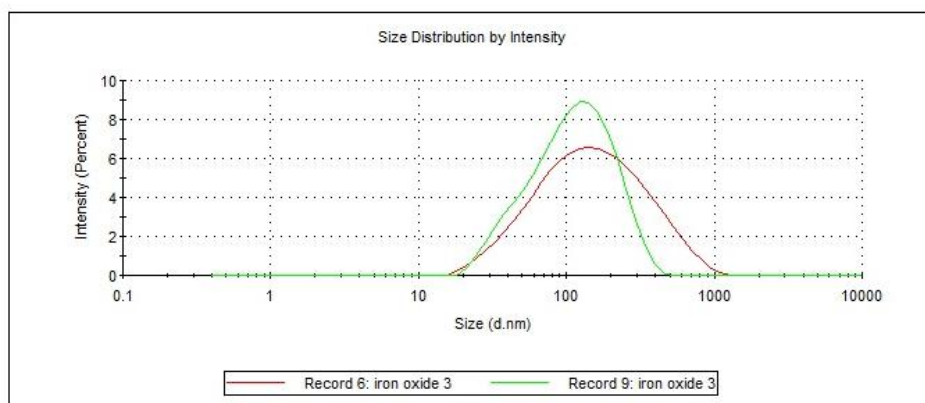
Magnetické nanočástice (smAA, -COOH) byly postupně dispergovány v různých prostředích používaných pro jejich analýzu pomocí kapilární elektroforézy. V těchto prostředích pak byla měřena jejich hydrodynamická velikost pomocí instrumentu na měření velikosti rozptylu světla (DLS). Vstupní parametry: „refractive index“: 2,42; „material absorbance“: 0,01; „medium“: voda; „refractive index of medium“: 1,330; „viscosity“: 0,8872 cP. Měření bylo prováděno 3x, byl vypočten aritmetický průměr hodnot a relativní směrodatná odchylka. Výsledky jsou uvedeny v následující Tab. II.

Tabulka II: Měření velikosti nanočástic

prostředí	Z-Av, nm	RSD, %	polydis.	RSD, %	pozn.
voda, 10x zředěno	85,71	0,27	0,261	2,61	
50 mM acetát pH 4,0	112,03	0,67	0,411	1,84	
50 mM citrát pH 4,0	89,46	1,06	0,271	1,61	
25 mM citrát pH 4,0	101,57	0,82	0,440	1,20	sedim.
50 mM citrát pH 4,5	113,50	1,97	0,438	3,80	sedim.
50 mM MES pH 6,0	112,23	2,46	0,433	3,05	
50 mM MOPS pH 7,5	83,43	0,74	0,277	1,46	
50 mM borát pH 9,5	88,40	1,46	0,344	10,50	
50 mM fosfát pH 2,5	3473,33	6,55	0,409	12,82	sedim.
50 mM fosfát pH 7,5	87,84	0,37	0,282	1,55	
50 mM borát pH 9,5 + 100 mM SDS	100,17	1,10	0,282	0,54	
50 mM borát pH 9,5 + 50 mM SDS	87,28	0,30	0,273	2,02	
50 mM borát pH 9,5 + 5 mM SDS	90,84	0,86	0,389	3,09	
50 mM borát pH 9,5 + 1 mM PB	175,07	14,48	0,226	7,99	sedim.
50 mM borát pH 9,5 + 1 mM DDAB	129,70	1,92	0,282	2,95	sedim.
50 mM MOPS pH 7,5 + 1 mM DDAB	209,70	1,32	0,294	5,20	sedim.
50 mM MOPS pH 7,5 + 1 mM PB	442,47	18,22	0,495	5,39	sedim.
10 mM borát pH 9,5	105,33	3,52	0,395	2,63	
2,5 mM borát pH 9,5	73,51	0,49	0,213	2,82	
25 mM citrát pH 4,5	133,90	1,23	0,466	5,66	
10 mM citrát pH 4,5	74,78	0,37	0,243	2,48	
2,5 mM citrát pH 4,5	99,67	0,93	0,410	3,66	
voda, 100x zředěno	76,02	0,71	0,221	2,87	
voda, nové NPs	107,43	0,28	0,278	1,26	
voda, nezředěno	77,47	0,27	0,240	1,27	

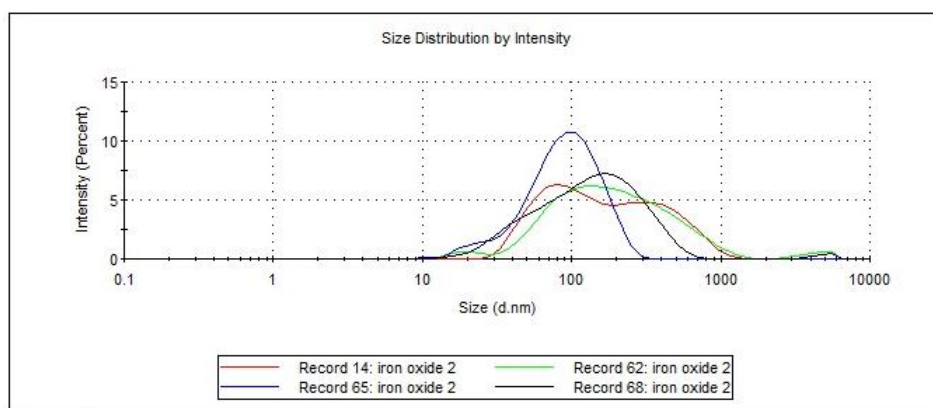
*Z-Av = efektivní průměr nanočástic, polydis. = polydisperzita nanočástic, sedim. = dochází k sedimentaci nanočástic; hodnoty průměru nanočástic nad 1000 nm nelze považovat z pohledu teorie měření za správné (jsou příliš ovlivněné agregací)

Kromě výsledků v podobě tabulky jsou pro demonstraci distribuce velikosti částic přiloženy následující obrázky 20 – 27.



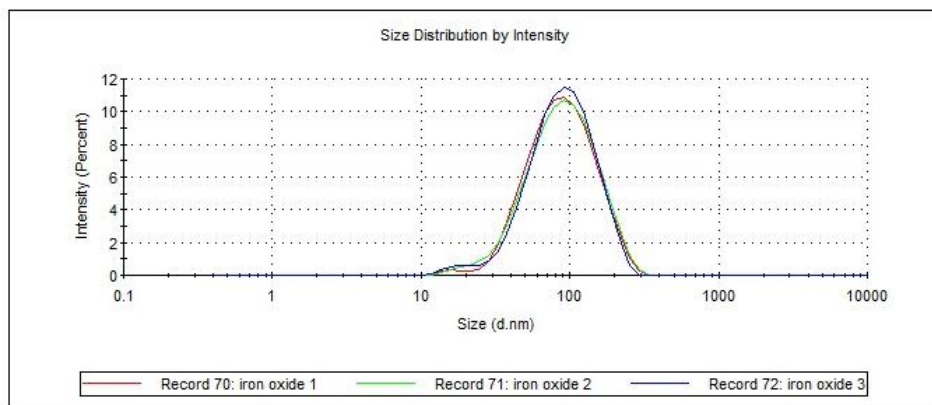
Obrázek 20: Srovnání distribuce velikosti částic v acetátu pH 4,0 („record 6“) a citrátu pH 4,0 („record 9“)

Na distribuci velikosti částic má vliv prostředí v jakém se nanočástice nachází. V případě citrátu dochází k „rozšíření“ píku (zvětšení disperze nanočástic).

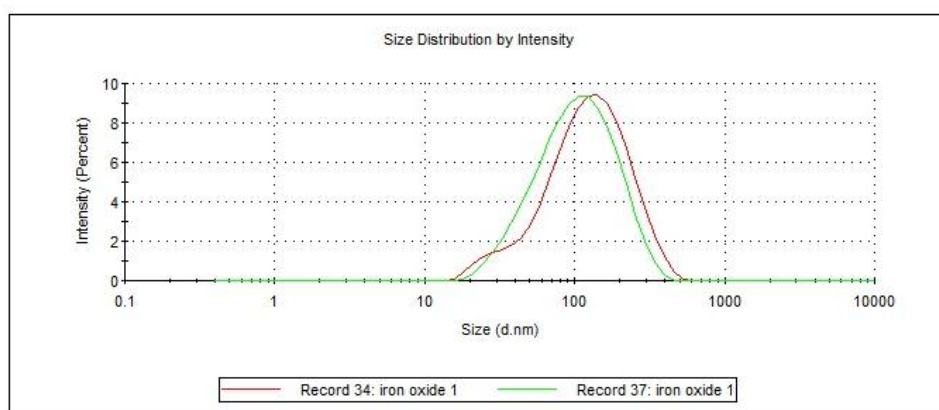


Obrázek 21: Srovnání distribuce velikosti částic v citrátu pH 4,5, koncentrace 50 mM („record 14“), 25 mM („record 62“), 10 mM („record 65“), 2,5 mM („record 68“).

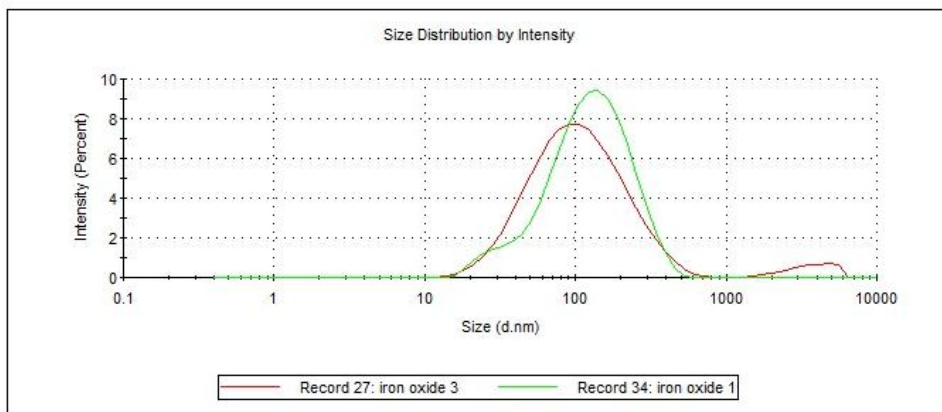
Zde je vidět vliv koncentrace použitého iontu, teoreticky by se měla zvyšující se iontovou silou (koncentrací) zmenšovat tloušťka elektrické dvojvrstvy. Nicméně zároveň může dojít k začátku agregace a tím i k zvýšení disperze nanočástic.



Obrázek 22: Srovnání distribuce velikosti nanočástic ve vodě ve třech po sobě jdoucích měřeních

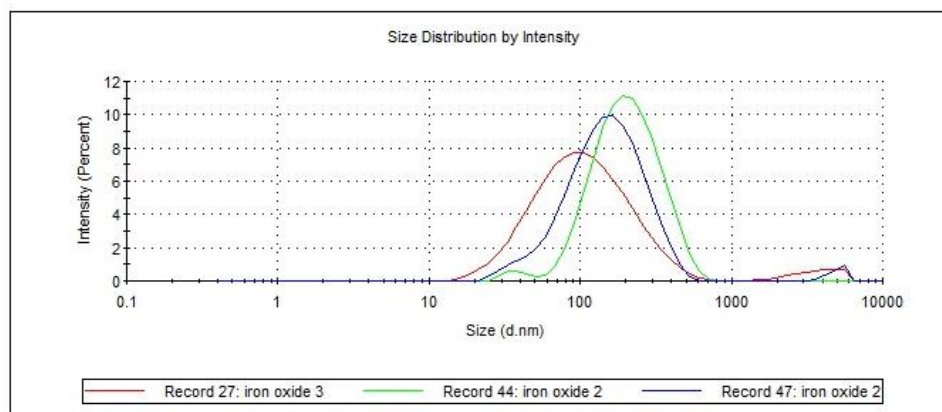


Obrázek 23: Srovnání distribuce velikosti nanočástic v 50 mM borátu pH 9,5 s 50 mM SDS („record 37“) a 100 mM SDS („record 34“)



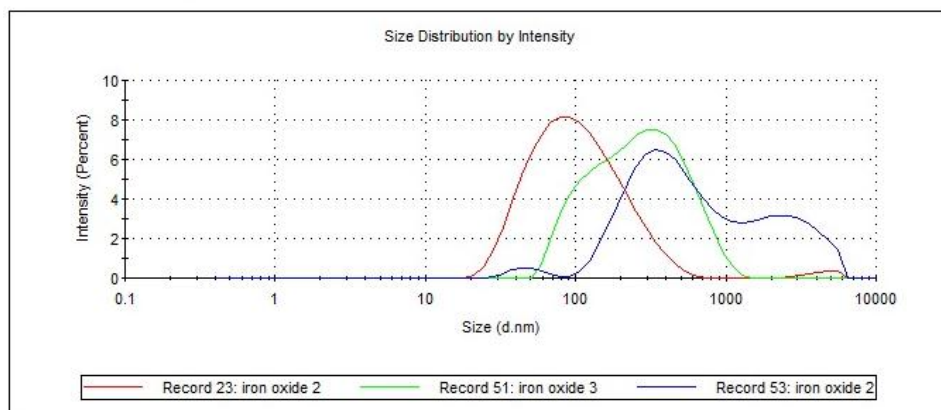
Obrázek 24: Srovnání distribuce velikosti nanočástic v 50 mM borátu pH 9,5 („record 27“) a v 50 mM borátu pH 9,5 se 100 mM SDS („record 34“)

Na obou grafech se projevuje vliv povrchové chemie (borát vs. SDS), proto s rostoucí iontovou silou neklesá průměr distribuce nanočástic.



Obrázek 25: Srovnání distribuce velikosti nanočástic v 50 mM borátu pH 9,5 („record 27“), v 50 mM borátu pH 9,5 s 1 mM polybrenem („record 44“) a v 50 mM borátu pH 9,5 s 1 mM DDAB („record 47“)

Použitím polybrenu a DDAB jako přídavných látek k borátu dojde pravděpodobně k vysycení nezreagovaných míst (vznik kationtu), což se projeví zvýšením zeta potenciálu (viz. Tab. III.). Opět vliv povrchové chemie.



Obrázek 26: Srovnání distribuce velikosti nanočástic v 50 mM MOPS pH 7,5 („record 23“), v 50 mM MOPS pH 7,5 s 1 mM polybrenem („record 53“) a v 50 mM MOPS pH 7,5 s 1 mM DDAB („record 51“)

Přidáním polybrenu a DDAB k MOPS dochází k sedimentaci.

4.2 Měření zeta potenciálu nanočástic

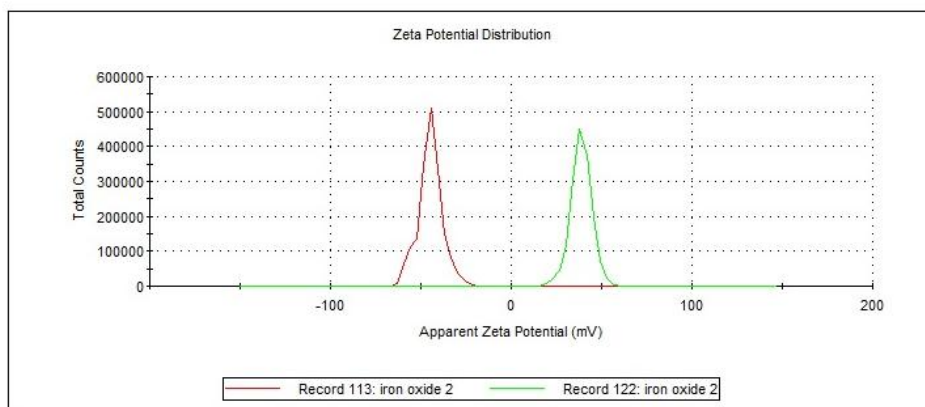
Magnetické nanočástice (smAA, -COOH) byly postupně dispergovány v různých prostředích používaných pro jejich analýzu pomocí kapilární elektroforézy. V těchto prostředích pak byl měřen jejich zeta potenciál a mobilita pomocí zetametru. Vstupní parametry byly stejné jako v případě měření velikosti nanočástic. Měření bylo prováděno 3x, byl vypočten aritmetický průměr hodnot a relativní směrodatná odchylka. Výsledky jsou uvedeny v následující Tab. III.

Tabulka III: Měření zeta potenciálu nanočástic

prostředí	ZP, mV	RSD, %	mobilita, μmcm/Vs	RSD, %	DEV, mV
voda, 10x zředěno	-59,23	1,46	-4,644	1,41	10,20
50 mM acetát pH 4,0	-27,80	2,00	-2,180	2,05	7,48
50 mM citrát pH 4,0	-33,50	6,94	-2,624	6,92	>30
50 mM citrát pH 4,5	-30,27	6,25	-2,374	6,22	>30
25 mM citrát pH 4,5	-39,87	7,81	-3,124	7,74	12,00
5 mM citrát pH 4,5	-40,03	1,66	-3,139	1,62	9,8
50 mM MES pH 6,0	-35,77	7,29	-2,803	7,28	7,16
20 mM MOPS pH 7,5	-39,97	7,11	-3,131	7,10	10,3
5 mM borát pH 9,5	-37,97	1,79	-2,978	1,78	9,6
25 mM borát pH 9,5	-42,47	4,71	-3,328	4,66	9,2
50 mM borát pH 9,5	-43,27	7,40	-3,391	7,30	7
50 mM borát pH 9,5 + 50 mM SDS	-55,70	5,30	-4,370	5,28	22
50 mM borát pH 9,5 + 100 mM SDS	-64,10	3,11	-5,024	3,14	>30
50 mM borát pH 9,5 + 1 mM PB	37,27	5,76	2,922	5,73	12
50 mM borát pH 9,5 + 1 mM DDAB	55,30	6,19	4,336	6,14	24

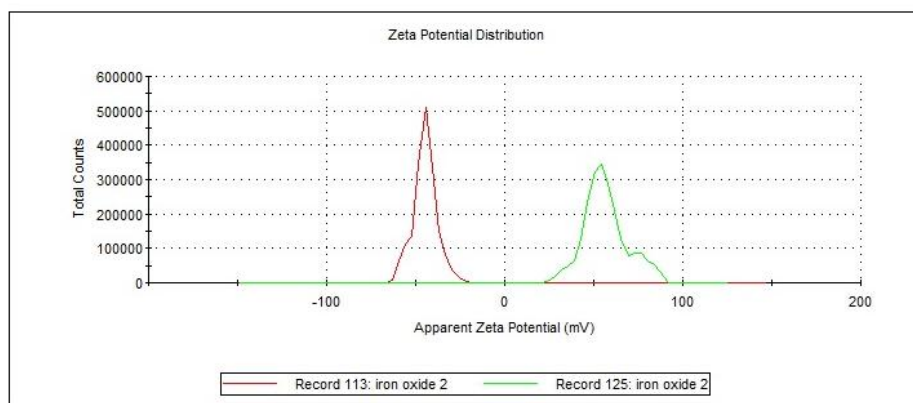
*ZP = zeta potenciál, DEV = hodnota disperze zeta potenciálu

Kromě výsledků v podobě tabulky jsou pro demonstraci distribuce zeta potenciálu částic přiloženy následující obrázky 27 - 29



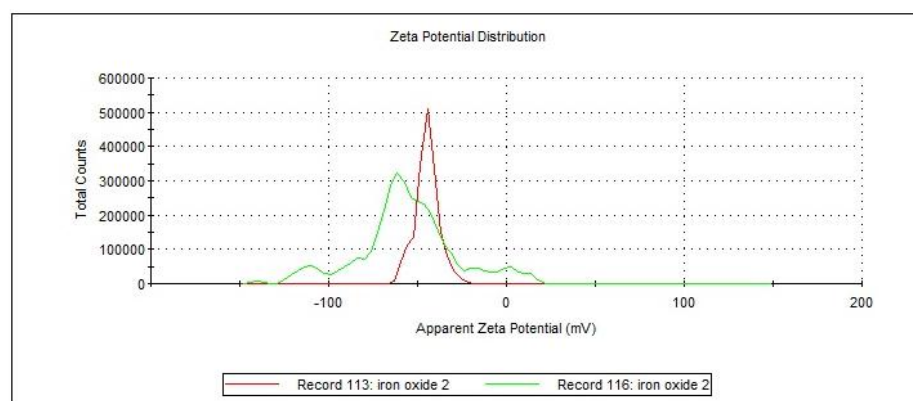
Obr. 27: Srovnání distribuce zeta potenciálu nanočástic v 50 mM borátu pH 9,5 („record 113“) a v 50 mM borátu pH 9,5 s 1 mM polybrenem („record 122“)

Přidavkem polybrenu dojde k vysycení COOH skupin a vzniku kationtového obalu nanočástic, hodnota zeta potenciálu je kladná.



Obrázek 28: Srovnání distribuce zeta potenciálu nanočástic v 50 mM borátu pH 9,5 („record 113“) a v 50 mM borátu pH 9,5 s 1 mM DDAB („record 125“)

Opět dochází ke změně povrchu nanočástic z karboxylovaných a ke vzniku kationtu. Navíc dochází k rozšíření disperze píku.



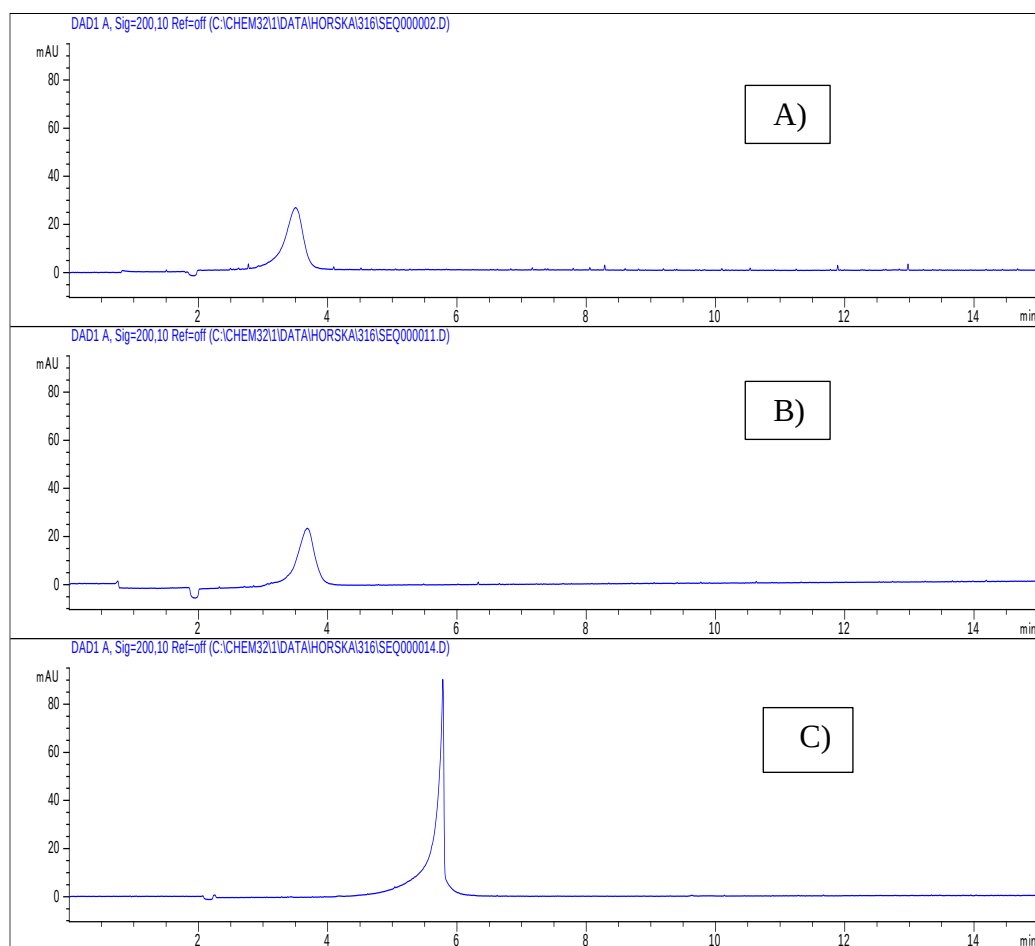
Obrázek 29: Srovnání distribuce zeta potenciálu nanočástic v 50 mM borátu pH 9,5 („record 113“) a v 50 mM borátu pH 9,5 s 50 mM SDS („record 116“)

Zde je ukázáno, že vlivem SDS dojde nejen k vysycení nezragerovaných míst, ale navíc ještě k indukci agregace.

4.3 Optimalizace experimentálních podmínek

4.3.1 Vliv intenzity elektrického pole

Pro efektivní popsání chování nanočástic kapilární elektroforézou je nutné zvolit vhodné podmínky experimentu. Za tímto účelem byl sledován vliv podmínek na elektroforetickou pohyblivost obou typů částic (smAA-COOH a Ag). Bylo zjištěno, že smAA-COOH částice se v kapilární elektroforéze projevují stabilním elektrickým proudem a výjimečnou opakovatelností záznamů. Proto byly tyto částice testovány i v dalších experimentech. Nejprve bylo studováno napětí u vybraného vhodného elektrolytového systému 50 mM borát o pH = 9,5, který opět poskytoval nejlepší výsledky.



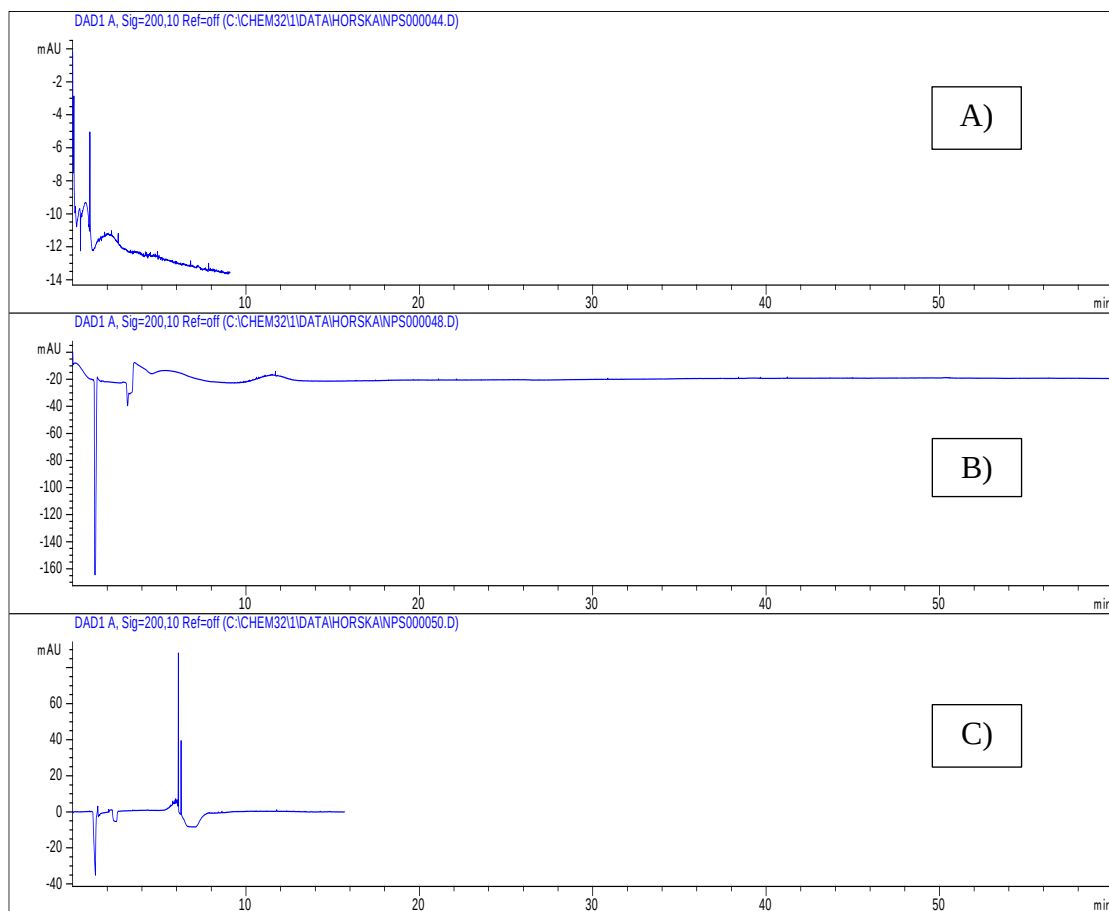
Obr. 30: Elektroforegramy Ag nanočástic v borátovém pufru při napětí A) 10 kV, B) 20kV
a C) 30 kV

Byly postupně voleny hodnoty 10 kV, 20 kV a 30 kV (obr. 30). Z elektroforegramů je patrné, že v případě napětí 30 kV docházelo k změnám v tvarech píku Ag nanočástic. Tuto změnu si dosud neumíme vysvětlit. Pravděpodobně dochází k indukci agregace. Naopak smAA-COOH nanočástice poskytly opakovatelné profily při všech hodnotách napětí.

4.3.2 Složení elektrolytového systému

4.3.2.1 Vliv polarity

Na separaci má také vliv složení a koncentrace použitého základního elektrolytu (BGE). Jako pracovní elektrolyt byl zvolen výše popsany borát z důvodu jeho předchozího použití a testování pro analýzy smAA-COOH nanočástic a jako přídavné látky PB a DDAB. PB a DDAB byly vybrány, protože poskytly velmi významné rozdíly v měřených zeta potenciálech (viz 4.1 a 4.2).

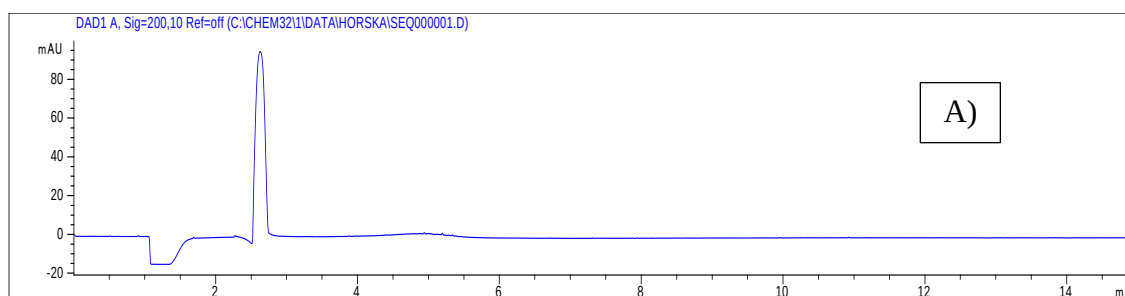


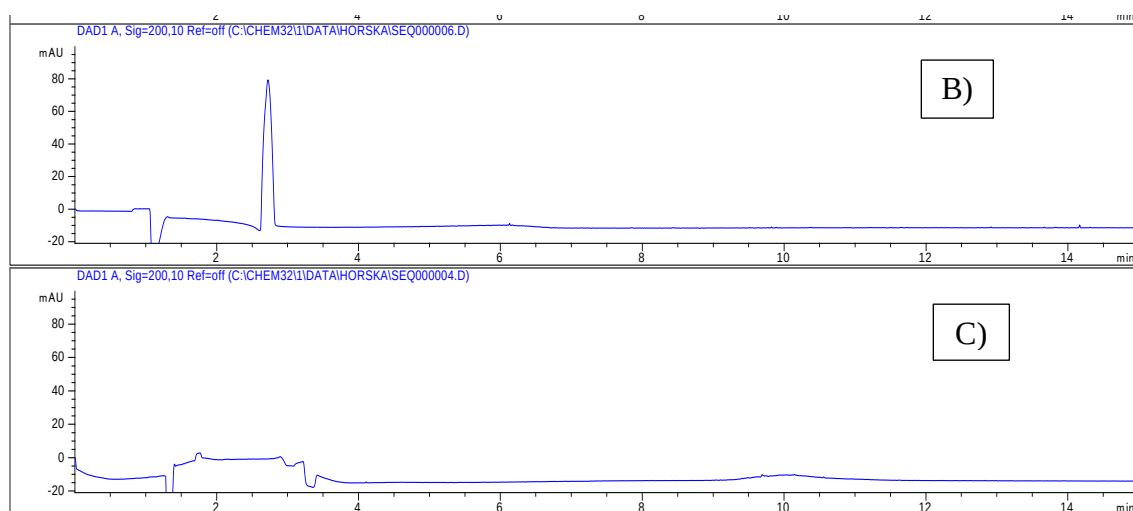
Obr. 31: Vliv polarity na chování nanočástic A) 1 mM DDAB, +10 kV, B) 1 mM DDAB, -10 kV, C) 1 mM PB, +10 kV, všechny v základním borátovém elektrolytu

Analyzované nanočástice na svém povrchu obsahují primárně záporné COOH skupiny, které jsou ale modifikovány pomocí DDAB nebo PB, čímž původně záporně nabitá nanočástice získá kladný náboj. Díky kladnému náboji nanočástic dochází k jejich navázání na záporné silanové skupiny křemenné kapiláry. To může být ale zároveň potlačeno tím, že se povrch kapiláry dynamicky pokryje pomocí PB anebo DDAB. Tím dojde k obrácení elektroosmotického toku (od „-“ k „+“) a pak kladně nabitě nanočástice migrují proti směru EOF, ale zároveň jsou jím unášeny díky jeho větší rychlosti než je vlastní rychlost nanočástic. To dokazují záznamy na obr. 31., kde v případě A) a C) byla použita kladná polarita a dochází sice ke vzniku agregátů, což se projevuje např. tvorbou „spiků“, ovšem v případě B) za použití záporné polaritě jsou výsledky téměř jednoznačné, kolem 10. minuty migrují nanočástice smAA-COOH jako kationty. Je tedy zřejmé, že i v případě použití kationtových modifikátorů základního elektrolytu může dojít k ovlivnění migrace nanočástic.

4.3.2.2 Vliv koncentrace PB a DDAB

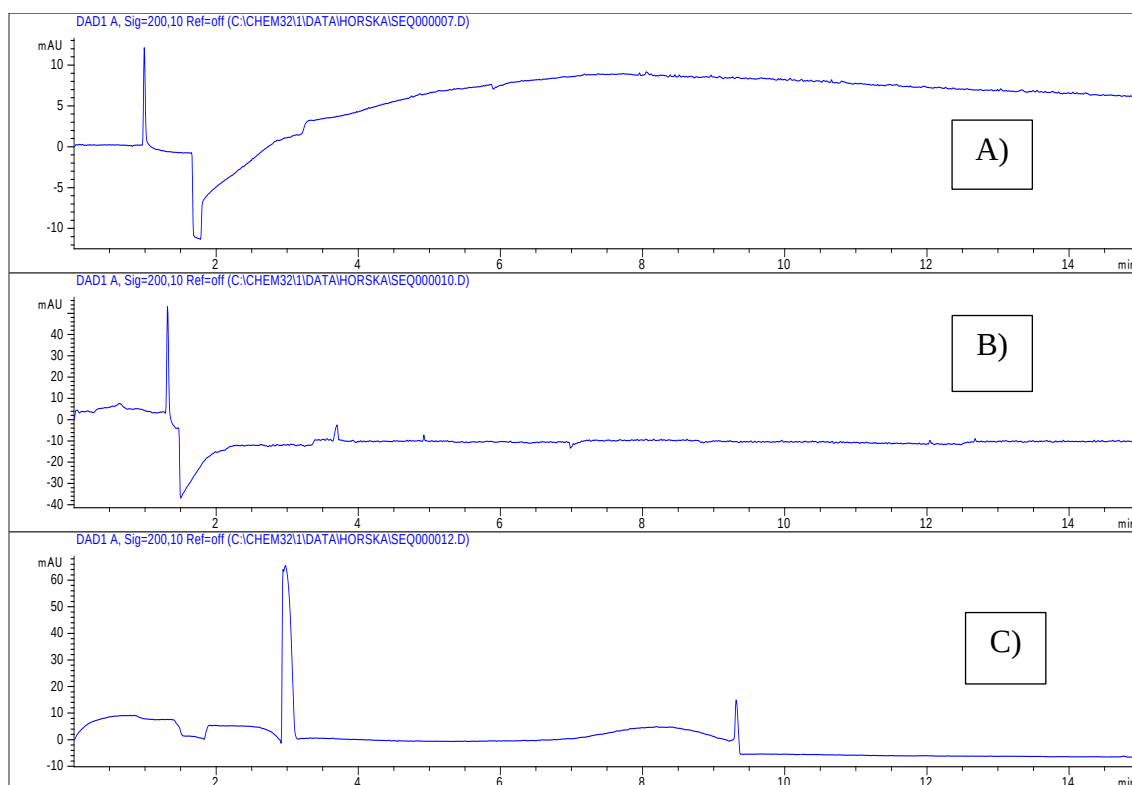
Dalším určujícím parametrem v chování nanočástic je vliv koncentrace zvoleného aditiva, v tomto případě PB a DDAB. V obou případech byly zkoumány koncentrace od 10 $\mu\text{mol/l}$ po 1000 $\mu\text{mol/l}$. Na obr. 32 jsou zobrazeny analýzy smAA-COOH nanočástic při změně koncentrace PB v borátovém pufru. Obr. 33 pak ukazuje analýzy při změně koncentrace DDAB v borátovém pufru.





Obr. 32: Eletroforegramy smAA-COOH nanočástic při změně koncentrace PB základním elektrolytu A) 1000 $\mu\text{mol/l}$ PB, B) 100 $\mu\text{mol/l}$ C) 10 $\mu\text{mol/l}$

S rostoucí koncentrací dochází ke změně iontové síly a také může docházet k interakci nanočástic s PB. V 1000 μM PB a 100 μM PB se nanočástice chovají stejně, nepozorujeme zde výraznou změnu ve tvaru píku ani v posunu začátku zóny analytu. Migrační čas se pohybuje asi mezi 2,5 – 3 min. Ani nepozorujeme prodlužování zóny. V případě největší koncentrace PB dochází pravděpodobně k agregaci částic. Lze konstatovat, že s rostoucí iontovou silou dochází k potlačení rychlosti migrace nanočástic, ale zároveň zřejmě dochází k prohloubení míry agregace nanočástic s PB.



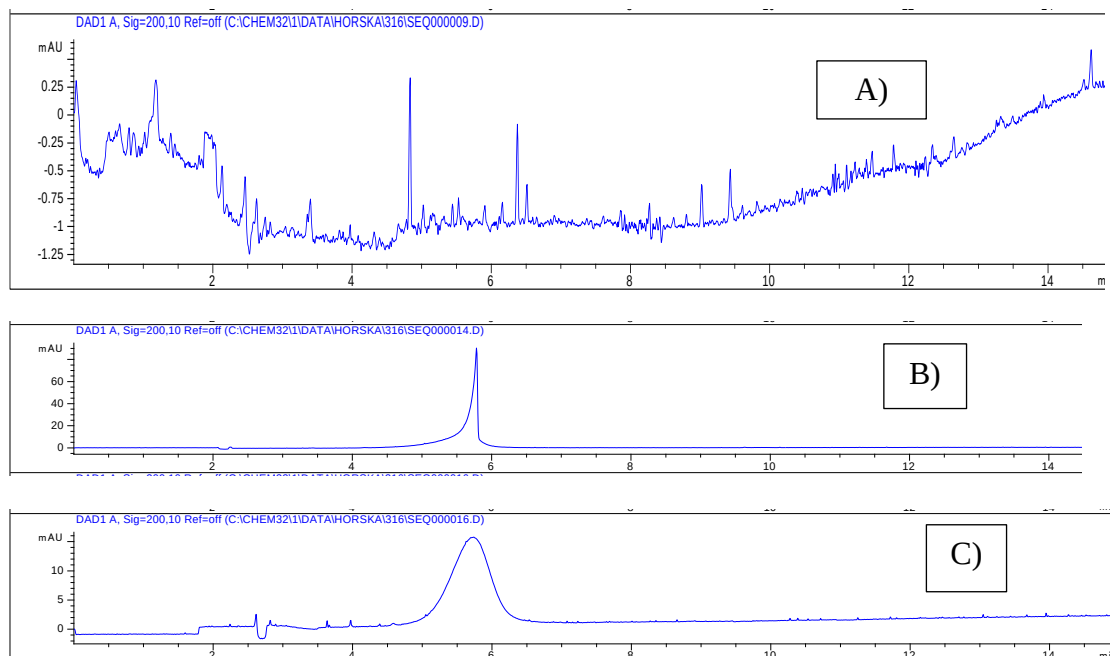
Obr. 33: Elektroforegramy smAA-COOH nanočástic při změně koncentrace DDAB základním elektrolytu A) 1000 $\mu\text{mol/l}$ PB, B) 100 $\mu\text{mol/l}$ C) 10 $\mu\text{mol/l}$

V DDAB se nanočástice chovají jinak než v případě PB, dochází ke změně tvaru píku. Opět dochází s rostoucí koncentrací k ovlivňování rychlosti migrace nanočástic a migračního času. Nicméně ze záznamů je patrná pravděpodobně velká interakce nanočástic s DDAB a zároveň i paměťové a adsorpční efekty kapiláry.

4.4 Pilotní studium interakcí iontů s povrchem nanočástic

Jak bylo ukázáno v předchozí části práce, nanočástice jsou schopné interagovat s mnoha ionty a tím naprosto ovlivnit svoje elektroforetické chování. Pro studium interakcí nanočástic v biologických systémech (buňkách, tkáních, biologických tekutinách) je naprosto zásadní mít informace o interakci nanočástic s ionty, které mohou být přítomny v těchto tekutinách. V našem případě jsme studovali interakce tří vybraných iontů (borát, citrát, MOPS) s nanočásticemi smAA-COOH, tj. karboxylovanými nanočásticemi. Je zřejmé, že jsme zde studovali vliv ko-iontu, nicméně DLS měření a určování zeta potenciálu ukázalo rovněž velký vliv těchto iontů. Vliv iontů byl studován v prostředí 10 mM NaCl, který se běžně vyskytuje v biologických vzorcích, ale zároveň jsou ionty Na^+ a Cl^- malé, takže by

neměly ovlivňovat chemické okolí nanočástic. Ukázky výsledků jsou na následujícím obrázku 34.



Obr. 34: Elektroforegramy vlivu iontů, BGE: 10 mM NaCl, A) citrát, B) borát, C) MOPS

Z obrázků vyplývá, že největší vliv na migraci smAA-COOH má citrát, kde dochází ke vzniku agregátů. V případě borátu dochází k zúžení zóny nanočástic, takže opět dochází k interakci, a v případě případku MOPS dochází k rozšíření zóny nanočástic a ke zvýšení migračního času, tj. opět je i zde důkaz interakce nanočástic s MOPS ionty, jak vypovídá i DLS měření. K popsaným změnám došlo při použití koncentrace citrátu, borátu a MOPS 10^{-4} mol/l. Dále byla testována koncentrace 10^{-3} mol/l a 10^{-4} mol/l, kde nebylo možno dále interpretovat získané analýzy, protože docházelo k agregacím.

5 ZÁVĚR

Tato práce měla za cíl ukázat kapilární elektroforézu jako vhodnou metodu pro studium chování nanočástic pro biologické aplikace, především pro prostředí podobná buňkám.

Byla studována velikost nanočástic, měřen jejich zeta potenciál a poté studováno chování nanočástic kapilární elektroforézou v různých prostředích, které odpovídají nejčastěji používaným elektrolytům v kapilární elektroforéze. Byly testovány dva typy nanočástic – Ag a smAA-COOH nanočástice (nanočástice maghemitu modifikované polyakrylovou kyselinou), z nichž byly vybrány smAA-COOH nanočástice pro další studium. Kromě toho bylo provedeno pilotní studium interakce smAA-COOH nanočástic s ko-ionty, borátem, citrátem a MOPS pomocí kapilární elektroforézy, které umožní popsání povrchových vlastností těchto částic.

Obecně lze říct, že tato práce přispěla k popisu elektroforetického chování nanočástic pro biologické aplikace a její pokračování pomůže obecnému popisu interakce nanočástic s buňkami.

6 POUŽITÁ LITERATURA

1. D. Narducci: Veterinary Research Communications **31** (Suppl. 1), 131–137 (2007).
2. http://www.nanobio.cz/articles.php?article_id=6; staženo 15.9. 2012
3. M. C. Roco: J Nanopart Res **13**, 427–445 (2011).
4. W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke and W. Moller: Journal of Nanoparticle Research **8**, 543–562 (2006).
5. I. Montes-Burgos, D. Walczyk, P. Hole, J. Smith, I. Lynch, K. Dawson: J Nanopart Res **12**, 47–53 (2010).
6. Y. Zhang , M. Yang, N. G. Portney, D. Cui, G. Budak, E. Ozbay, M. Ozkan, C. S. Ozkan: Biomed Microdevices **10**, 321–328 (2008).
7. http://www.nanocon.eu/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/078.pdf, staženo 15.9.2013
8. http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/7_Lhotak.pdf, staženo 15.9.2012
9. I. V. Stankevich and V. I. Sokolov: Russian Chemical Bulletin **53**, 1824—1845 (2004).
10. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/221916/fullerene>, staženo 15.9.2012
11. W. Zhao, B. Basnet, I. J. Kim: Journal of Advanced Ceramics **1(3)**, 179-193 (2012).
12. J. Zhang, Ch. Jia. Z. Jia, J. Ladegard, Y. Gu, J. Nie: Front. Chem. Sci. Eng. **6(2)**, 126–131 (2012).
13. J.-P. Piret, S. Detriche, R. Vigneron, S. Vankoningsloo, S. Rolin, J. H. Mejia Mendoza, B. Masereel, S. Lucas, J. Delhalle, F. Luizi, C. Saout, O. Toussaint: J Nanopart Res **12**, 75–82 (2010).
14. H. Li, Ch.-S. Ha, I. Kim: Nanoscale Res Lett **4**, 1384–1388 (2009).
15. S. Xu, Ch. Jiang, Y. Lin, L. Jia: M. Acta **179**, 257–264 (2012).
16. M. Pečová, L. Zajoncová, K. Poláková, J. Čuda, M. Šafaříková, M. Šebela, I. Šafařík: Chem. Listy **105**, (2011) 524-530.
17. P. Allia, P. Tiberto: J Nanopart Res **13**, 7277–7293 (2011).
18. A. Espinosa, A. Munoz-Noval, M. Garcia-Hernandez, A. Serrano, J. Jimenez de la Morena, A. Figuerola, A. Quarta, T. Pellegrino, C. Wilhelm, M. A. Garcia: J Nanopart Res **15**, 1514 (2013).
19. W. Wu, Q. He, Ch. Jiang: Nanoscale Res Lett **3**, 397–415 (2008).

20. J. Mejia-Lopez, J. Mazo-Zuluaga: *J Nanopart Res* **13**, 7115–7125 (2011).
21. M. Starowicz, P. Starowicz, J. Zukrowski, J. Przewoznik, A. Lemanski, C. Kapusta, J. Banas: *J Nanopart Res* **13**, 7167–7176 (2011).
22. B. Zhao, Z. Nan: *Nanoscale Research Letters* **6**, 230 (2011).
23. A. Akbarzadeh, M. Samiei, S Davaran: *Nanoscale Research Letters* **7**, 144 (2012).
24. R. Topkaya, O. Akman, S. Kazan, B. Aktas, Z. Durmus, A. Baykal: *J Nanopart Res* **14**, 1156 (2012).
25. A. Taylor, Y. Krupskaya, S. Costa, S. Oswald, K. Kramer, S. Fussel, R. Klingeler, B. Buchner, E. Borowiak-Palen, M. P. Wirth: *J Nanopart Res* **12**, 513–519 (2010).
26. <http://www.osel.cz/index.php?clanek=930>, staženo 3.11.2012.
27. J. Xie, K. Chen, X. Chen: *Nano Res* **2**, 261–278 (2009).
28. Z. Cifuentes, L. Custardoy, J. M. de la Fuente, C. Marquina, M. R. Ibarra, D. Rubiales, A. Pérez-de-Luque: *Journal of Nanobiotechnology*, **8**, 26 (2010).
29. A. Hlaváček, P. Skládal: *Chem. Listy* **105**, 611–615 (2011).
30. M. Pereira, E. PC Lai: *Journal of Nanobiotechnology* **6**, 1477–3155 (2008).
31. W. Yu-Hong, Ch. Rui, L. Ding: *Nanoscale Research Letters* **6**, 461(2011).
32. A. Jaiswal, P. Sanpui, A. Chattopadhyay, S. S. Ghosh: *Plasmonics* **6**, 125–132 (2011).
33. M. G. Spirin, S. B. Brichkin, and V. F. Razumov: *Rossiiskie Nanotekhnologii* **7**, 5–6 (2012).
34. F. Müller, A. Houben, P. E. Barker, Y. Xiao, J. A. Käs, M. Melzer: *Journal of Nanobiotechnology* **4**, 1477–3155 (2006).
35. N. I. Hammer, T. Emric, M. D. Barnes: *Nanoscale Res Lett* **2**, 282–290 (2007).
36. H. Yang, W. Luan, R. Cheng, H. Chu, S. T. Tu: *J Nanopart Res* **13**, 3335–3344 (2011).
37. D. T.R. Stewart, M. D. Celiz, G. Vicente, L. A. Colon, D. S. Aga: *Trends in Analytical Chemistry* **30**, (2011).
38. S. R. Boddu, V. R. Gutti, T. K. Ghosh, R. V. Tompson, S. K. Loyalka: *J Nanopart Res* **13**, 6591–6601 (2011).
39. B. Chudasama, A. K. Vala, N. Andhariya, R. V. Mehta, R. V. Upadhyay: *J Nanopart Res* **12**, 1677–1685 (2010).
40. S. A. Corr, Y. P. Rakovich, Y. K. Gunko: *Nanoscale Res Lett* **3**, 87–104 (2008).

41. L. M. Bronsteina and Z. B. Shifrina: Nanotechnologies in Russia **4**, 9-10 (2009).
42. Ch. - M. Chou, H. - L. Lien: J Nanopart Res **13**, 2099–2107 (2011).
43. S. Mali: J. Maxillofac. Oral Surg **8**, 12663 (2012).
44. A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Večeřová, N. Pizúrová, V. K. Sharma, T. Nevěčná a R. Zbořil: J. Phys. Chem. **110**, 16248 – 16253 (2006).
45. V. Král, J. Otolá, P. Neuwirth, Z. Kejík, K. Záruba, P. Martásek: Chem. Listy **100**, 4–9 (2006).
46. N. V. Medvedeva, O. M. Ipatova, Yu. D. Ivanov, A. I. Drozhzhin and A. I. Archakov: Biomedical Chemistry **1**, 114–124 (2007).
47. K. K. Y. Wong, X. L. Liu: Pediatr Surg Int **28**, 943–951 (2012).
48. H. M. Joshi: J Nanopart Res **15**, 1235 (2013).
49. H. Khurshid, C. G. Hadjipanayis, H. Chen, W. Li, H. Mao, R. Machaidze, V. Tzitzios, G. C. Hadjipanayis: Journal of Magnetism and Magnetic Materials **331** 17–20 (2013).
50. Yi-Xiang J. Wang: Quant Imaging Med Surg **1**, 35-40 (2011).
51. S. Rasaneh, H. Rajabi, M. H. Babaei, S. Akhlaghpour: J Nanopart Res **13**, 2285–2293 (2011).
52. Y. Kobayashi., H. Matsudo, T. Nakagawa, Y. Kubota, K. Gonda, N. Ohuchi: s. J Sol-Gel Sci Technol **4**, 2962 (2013).
53. I. Szelenyi: Inflamm. Res. **61**, 1–9 (2012).
54. A. I. Archakov: Biomedical Chemistry **4**, 2–14 (2010).
55. M. A. Paltsev, V. I. Kiselev, and P. G. Sveshnikov: Herald of the Russian Academy of Sciences **79**, 369–377 (2009).
56. A. S. Goncalves, A. S. Macedo, E. B. Souto: Clin Transl Oncol **14**, 883–890 (2012).
57. W. Zhang, Z. Zhang a Y. Zhang: Nanoscale Research Letters **6**, 555 (2011).
58. Ch. Alexiou, R. J. Schmid, R. Jurgons, M. Kremer, G. Wanner, Ch. Bergemann, E. H. T. Nawroth, W. A. F. G. Parak: Eur Biophys J **35**, 446–450 (2006).
59. M. - H. Hsu a Y. – Ch. Su: Biomed Microdevices **10**, 785–793 (2008).
60. YOUNG WOOK CHUN and THOMAS J. WEBSTER: Annals of Biomedical Engineering **37**, 2034–2047 (2009).
61. F. Tagliaro, F. P. Smith: Trends in analytical chemistry **15**, 513 (1996).

62. J. Pauwels, A. V. Schepdael: *Cent. Eur. J. Chem.* **10**, 785-801 (2012).
63. Lauer H. H., Rozing G. P.: *High Performance Capillary Electrophoresis, A Primer*. Agilent Technologies, Germany 2009.
64. http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf
65. S. P. Radko, A. Chrambach: *Electrophoresis* **23**, 1957–1972 (2002).
66. A.I. Lopez-Lorente, B.M. Simonet, M. Valcárcel: *Trends in Analytical Chemistry* **30**, 65 (2011).
67. C. Cruces-Blanco, L. Gamiz-Gracia, A.M. Garcia-Campana: *Trends in Analytical Chemistry* **26**, 215 – 226 (2007).
68. M. Hernandez, F. Borrull, M. Calull: *Trends in Analytical Chemistry* **22**, 416 – 427 (2003).
69. R. Ramautar, A. Demirci, G. J. de Jong: *Trends in Analytical Chemistry* **25**, 455 - 466 (2006).

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFM	mikroskopie atomárních sil
ATP	adenosintrifosfát
BGE	základní (nosný) elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CNS	centrální nervový systém
CNTs	uhlíkové nanotrubice
DAD	detektor s diodovým polem
DDAB	didodecyldimethylamoniumbromid
DLS	dynamický rozptyl světla
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzymaticky řízená
EOF	elektroosmotický tok
EPR	zvýšená propustnost a zádrž
HER2	receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPCL	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR	infračervený
IVIS	<i>in vivo</i> zobrazovací systém
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MOPS	3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina
MRI	magnetická rezonance
MSPE	magnetická extrakce na pevnou fázi
MTP – NP	Magnetospirillum magnetotacticum
MWCNTs	vícevrstevné uhlíkové nanotrubice
PAMAM	polyamidoamin
PB	polybrene
PGE	polyethylenglykol
PVPP	polyvinylpyrolidon
QDs	kvantové tečky
RES	retikuloendoteliální systém
RIA	radioimounizotopová metoda
RNA	ribonukleová kyselina

SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SPE	extrakce na pevnou fázi
SPIO	supermagnetické nanočástice γ -Fe ₂ O ₃ nebo Fe ₃ O ₄
SDS	dodecylsírán sodný
SWCNTs	jednostenné uhlíkové nanotrubičky
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TOP	trioktylfosfin
TOPO	trioktylfosfinoxid
UV	ultrafialový
VIS	viditelný
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie