



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC A JEJICH VYUŽITÍ JAKO KONTRASTNÍCH LÁTEK PRO IN VIVO ZOBRAZOVÁNÍ.

PREPARATION OF NANOPARTICLES AND THEIR USE AS CONTRAST AGENTS FOR IN VIVO IMAGING.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nikola Odehnalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Jaroslav Turánek, CSc., DSc.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1405/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Nikola Odehnalová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Jaroslav Turánek, CSc., DSc.**

Název diplomové práce:

Příprava nanočástic a jejich využití jako kontrastních látek pro in vivo zobrazování.

Zadání diplomové práce:

1. Příprava nanočástic zlata a jejich modifikace polymery (např. PEG, kys. hyaluronová, manan, hydroxymetylmetakrylát, peptidy) s využitím klik–chemie
2. Charakterizace nanočástic zlata pomocí moderních fyzikálně chemických metod (DLS, NTA, FFF a MALS, fluorescenční spektroskopie) a mikroskopických metod (SEM, TEM)
3. Ověření aplikačního potenciálu připravených nanočástic zlata pro in vivo zobrazování (μ CT, celotělní optické fluorescenční zobrazování)

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Nikola Odehnalová
student(ka)

doc. RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.,
DSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací syntézy nanočástic zlata a následnou povrchovou modifikací umožňující jejich využití jakožto kontrastních látek pro *in vivo* zobrazování pomocí μ CT. Zlaté nanočástice byly připraveny Turkevichovou metodou a charakterizovány metodami TEM, DLS, MADLS a UV-Vis. Jejich povrch byl funkcionalizován polyethylenglykolem obsahujícím na jednom ze svých konců thiolovou skupinu, díky které se na povrch zlatých nanočástic vázal. Terminální konec řetězce daného polymeru byl pak methylovaný nebo zakončený aminoxy skupinou umožňující vznik oximové vazby s kyselinou hyaluronovou prostřednictvím klik-chemie. Způsobilstv připravených nanočástic pro *in vivo* aplikaci byla ověřena na základě testů stability a cytotoxicity. Aplikační potenciál nanočástic zlata modifikovaných methylovaným polyethylenglykolem byl ověřen pomocí μ CT na myším modelu po intravenózním podání.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the optimization of synthesis of gold nanoparticles and their surface modification allowing their use as contrast agents for *in vivo* imaging by μ CT. Gold nanoparticles were prepared by the Turkevich method and characterized by TEM, DLS, MADLS and UV-Vis. Their surface was functionalized with polyethylene glycol containing a thiol group forming a bond with the Au atoms in the surface of gold nanoparticles. The terminal end of the polymer was methylated or containing an aminoxy group forming an orthogonal bond with hyaluronic acid using click-chemistry. The eligibility for *in vivo* application of the prepared nanoparticles was verified with stability and cytotoxicity tests. The nanoparticles modified by methylated polyethyleneglycol were injected intravenously into a mouse and their application potential as contrast agents were verified by μ CT.

KLÍČOVÁ SLOVA

nanočástice zlata, povrchová modifikace, polyethylenglykol, kyselina hyaluronová, koloidní stabilita, μ CT, *in vivo* zobrazování, klik-chemie, oximová ligace

KEY WORDS

gold nanoparticles, surface modification, polyethyleneglycol, hyaluronic acid, colloidal stability, μ CT, *in vivo* imaging, click-chemistry, oxime ligation

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

ODEHNALOVÁ, Nikola. *Příprava nanočástic a jejich využití jako kontrastních látek pro in vivo zobrazování*. [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124050>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. RNDr. Jaroslav Turánek, CSc., DSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce byla vykonána samostatně a že všechny použité zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce panu doc. RNDr. Jaroslavu Turánkovi, CSc., DSc. za vedení, pomoc a věnovaný čas při zpracování diplomové práce a za možnost ji vykonávat na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně. Také bych chtěla poděkovat MVDr. Pavlíně Turánek Knötigové, Ph.D. za pomoc při provádění a vyhodnocování testů cytotoxicity a měření na μ CT, Ing. Janu Kotoučkovi za pomoc a cenné rady při zpracování této práce a celému kolektivu oddělení Farmakologie a imunoterapie za spolupráci. Především bych pak chtěla poděkovat Mgr. Františkovi Hubatkovi za čas, který mi při práci v laboratoři věnoval, a dovednosti, kterým jsem se pod jeho vedením naučila. Dále bych chtěla také poděkovat své rodině a přátelům, kteří mi byli po celou dobu studia důležitou oporou.

Obsah

1	Úvod.....	4
2	Teoretická část.....	5
2.1	<i>In vivo</i> zobrazování malých zvířat.....	5
2.2	μCT.....	6
2.2.1	Princip μCT.....	6
2.2.2	Aplikace μCT.....	7
2.3	Kontrastní látky.....	8
2.3.1	Kontrastní látky na bázi jódu.....	8
2.3.2	Kontrastní látky s delším poločasem cirkulace.....	9
2.4	AuNPs.....	10
2.4.1	Příprava AuNPs.....	10
2.4.2	Charakterizace AuNPs.....	13
2.4.3	Povrchová modifikace AuNPs.....	19
2.4.4	Využití AuNPs.....	25
3	Experimentální část.....	28
3.1	Příprava AuNPs a jejich optimalizace.....	28
3.1.1	Materiál.....	28
3.1.2	Metody.....	28
3.1.3	Výsledky.....	30
3.2	Povrchová modifikace připravených AuNPs pomocí mPEG-SH.....	38
3.2.1	Materiál.....	38
3.2.2	Metody.....	38
3.2.3	Výsledky.....	40
3.2.8	Testy stability.....	47
3.2.9	Testy cytotoxicity.....	51
3.2.10	Aplikace <i>in vivo</i>	53
3.3	Povrchová modifikace připravených AuNPs kys. hyaluronovou.....	57
3.3.1	Materiál.....	57
3.3.2	Metody.....	57
3.3.3	Výsledky.....	59

3.3.4	Testy stability	64
3.3.5	Testy cytotoxicity	67
4	Závěr.....	69
5	Zdroje	70
6	Seznam zkratek	74
7	Přílohy	75
7.1	Příloha 1.....	75
7.2	Příloha 2.....	75
7.3	Příloha 3.....	76
7.4	Příloha 4.....	76
7.5	Příloha 5.....	77

1 ÚVOD

V posledních letech jsou nanočástice zlata předmětem intenzivního výzkumu a to především díky nesčetnému množství různorodých vlastností umožňujících jejich využití v celé řadě biomedicínských aplikací. Těmito vlastnostmi jsou především vlastnosti optoelektronické, díky kterým lze zlaté nanočástice nejen charakterizovat, ale také využít jakožto kontrastní látky, v senzorech či fototermální nebo fotodynamické terapii při léčbě nádorových onemocnění. Neopominutelnou výhodou zlatých nanočástic je také jejich bioinertní povaha, díky které jsou vhodným kandidátem jak pro *in vitro*, tak i pro *in vivo* aplikace. Vysoké míry biokompatibility je dosaženo především díky možnosti poměrně jednoduché modifikace jejich povrchu vhodnými polymery. Navíc na jejich povrch lze vázat specifické ligandy umožňující jejich využití jako cílených nosičů léčiv. Syntéza zlatých nanočástic je poměrně snadná a finančně i časově nenáročná, přičemž připravené nanočástice vykazují vysokou stabilitu.

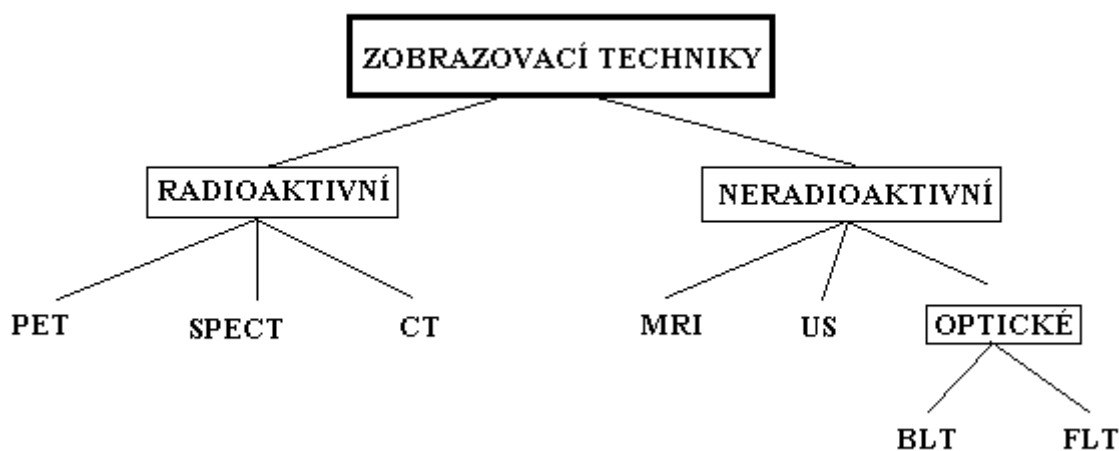
Cíle diplomové práce:

1. Příprava homogenního preparátu nanočástic zlata stabilizovaných povrchovou modifikací a jejich charakterizace pomocí elektronové mikroskopie (TEM), DLS, MADLS a UV-Vis.
2. Využití oximové ligace pro modifikaci nanočástic zlata kyselinou hyaluronovou a charakterizace preparátu fyzikálně-chemickými metodami.
3. Ověření biokompatibility preparátu v *in vitro* testech na buněčných liniích
4. Prokázání využitelnosti modifikovaných nanočástic zlata pro *in vivo* zobrazování pomocí μ CT na myším modelu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *In vivo* zobrazování malých zvířat

In vivo zobrazovací metody v preklinickém výzkumu na malých zvířatech se staly nezbytným nástrojem v onkologickém výzkumu a mají rozhodující roli při objevování nových léků a porozumění mechanismu řady nemocí. Zatímco dříve byly vědecké studie omezeny na vyšetřování zvířecích tkání *ex vivo* nebo buněčných procesů *in vitro*, pokroky v zobrazovacích technikách výrazně zlepšily možnosti dostupné pro *in vivo* zobrazování. Největší výhodou zobrazování *in vivo* je možnost neinvazivní (nebo mikroinvazivní) vizualizace a sledování molekul, nano a mikrostruktur v buňkách, tkáních a orgánech za téměř fyziologických podmínek [1],[2],[3].



Obr. 1: Zobrazovací techniky *in vivo* [2]

Podle použitých detekčních systémů lze klasifikovat různé zobrazovací techniky *in vivo* (viz Obr. 1). Jedna skupina metod zahrnuje ty, které využívají ionizující záření. Jednou z těchto metod je pozitronová emisní tomografie (PET). PET je založená na detekci γ paprsků vzniklých zánikem pozitronu, kde pozitrony pocházejí z β^+ rozpadu radionuklidu (např. ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C , ^{18}F , ^{124}I). Další metodou je jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT), jejímž principem je detekce fotonů γ , které jsou emitovány v důsledku γ rozpadu radioaktivních značek ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{125}I). Ačkoli jsou PET a SPECT velmi citlivé, jsou omezeny nízkým rozlišením (>1 mm), které se stává problémem při zobrazování na malých hlodavcích. Do skupiny technik využívajících ionizujícího záření patří také počítačová tomografie (CT) založená na rozdílné absorpci rentgenových paprsků složkami tkáně. Skupina neradioaktivních metod zahrnuje zobrazování magnetickou rezonancí (MRI), ultrazvukem (US) a optické zobrazování. Techniku optického zobrazování pak lze podle mechanismu generování fotonů rozdělit na bioluminiscenční a fluorescenční zobrazovací metody: bioluminiscenční tomografie (BLT) a fluorescenční tomografie (FLT). Optické metody také mohou být kombinovány s radioaktivními metodami při detekci Čerenkovova záření s využitím izotopů emitujících záření β [2],[3].

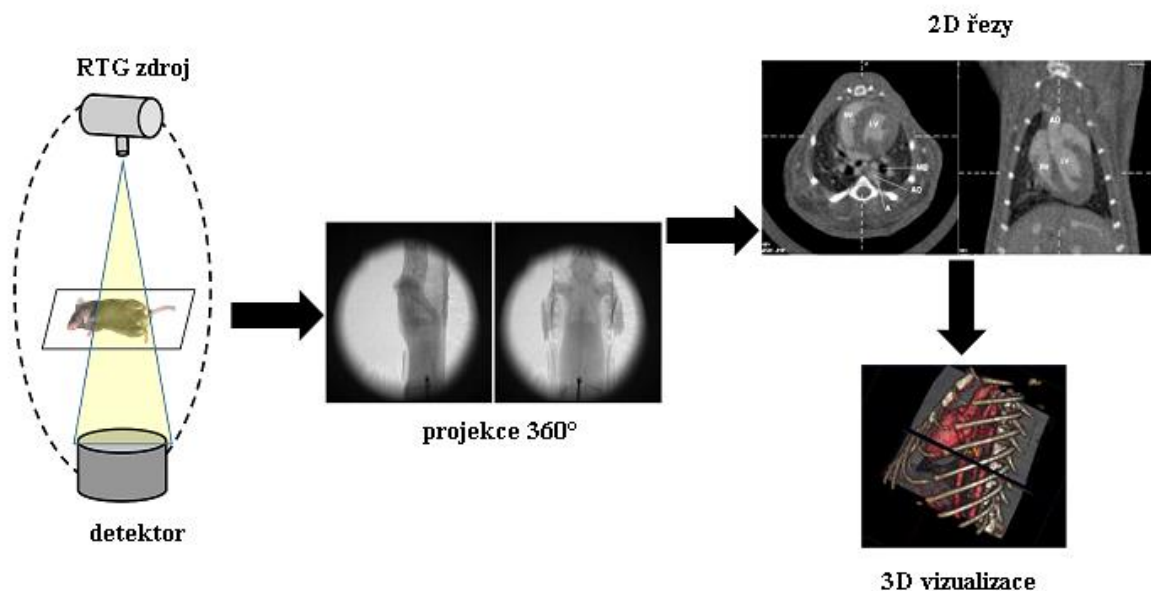
Různé stávající zobrazovací metody nabízejí různá prostorová a časová rozlišení, hloubkové průniky, detekční prahy a v neposlední řadě hraje roli také ekonomický aspekt daných metod. Jednotlivé metody mohou být navzájem kombinovány, což umožňuje nastavit optimální zobrazovací podmínky pro biologické experimenty. Ve srovnání s ostatními technikami je μ CT obvykle považována za schopnou poskytovat vyšší výkon při nižších nákladech a vyšším rozlišení. μ CT se však oproti ostatním technikám vyznačuje nižší citlivostí na přítomnost specializovaných sond [2],[3].

2.2 μ CT

Mikropočítačová tomografie neboli μ CT je nedestruktivní zobrazovací metoda se stejným principem jako klinická CT, ale s daleko vyšším rozlišením. Pomocí této metody využívající rentgenového záření dochází k vytvoření 3D projekce snímaného objektu [4],[5].

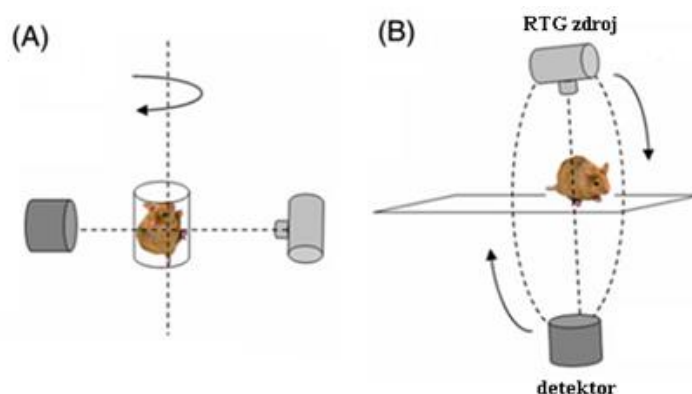
2.2.1 Princip μ CT

Princip metody (viz Obr. 2) je obecně založen na absorpci rentgenových paprsků procházejících zobrazovaným objektem nebo vzorkem. Rentgenové záření, emitované nejčastěji rentgenkou, prostupuje objektem a dochází k jeho zeslabení. Míra zeslabení je pak dána typem tkáně, kdy nejvíce záření je absorbováno v kostech, méně v měkkých tkáních, jako např. v játrech nebo ledvinách, a nejméně v tukových vrstvách a plicích. Zeslabené záření následně dopadá na detektor nacházející se naproti rentgence. Během skenování dochází k tvorbě několika stovek po sobě následujících 2D řezů, které jsou pořízeny snímáním objektu z různých úhlů. Vytvořené 2D snímky jsou následně pomocí výpočetní techniky poskládány do 3D obrazu objektu [5],[6].



Obr. 2: Schéma μ CT systému [8]

Existují dvě konstrukční geometrie umožňující skenování objektu z různých úhlů, jak zachycuje následující Obr. 3.



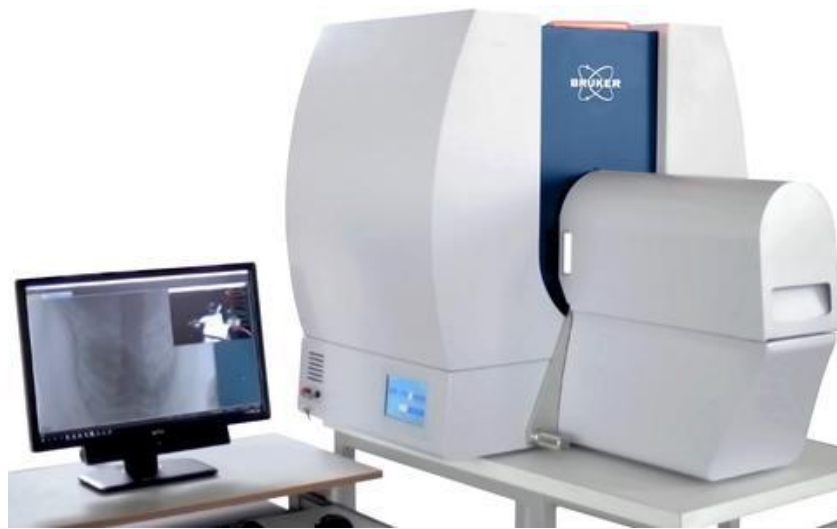
Obr. 3: Konstrukční možnosti uspořádání geometrie μ CT [3]

Jednou z možností je konstrukce (A), kdy zdroj záření a detektor jsou stacionární a po každém 2D skenu dochází k pootočení podložky se vzorkem o určitý úhel. Všechny současné komerční systémy pro *in vivo* zobrazování však používají druhou možnost konstrukce (B). Zde je zdroj a detektor nainstalován na portále otáčejícím se kolem centrální osy. Zvíře je pak umístěno na podložce, která je nehybná a nachází se v této ose. Aby se zabránilo pohybovým artefaktům v obraze, musí zvíře ležet nehybně, tedy být anestetizováno [3],[7].

2.2.2 Aplikace μ CT

Díky vysokému kontrastu mezi absorpcí rentgenového záření kostmi a okolními tkáněmi je metoda vhodná především pro zobrazování kostí. Není tedy překvapivé, že první aplikace této techniky se týkala studia osteoporózy a osteoartrózy na vhodných zvířecích modelech. V současné době se využití techniky zaměřuje hlavně na hodnocení kvality kostí, účinky mechanických podnětů na jejich regeneraci, mechanickou regulaci tkáňové diferenciaci a remodelaci kostí. Vysokého kontrastu se dosahuje také mezi měkkými tkáněmi a plícemi zaplněnými vzduchem, což vede k použití této techniky také při studiu plic [4],[5],[8].

Přestože existuje celá řada zajímavých aplikací μ CT, je nutné mít na paměti některá základní omezení. Především se jedná o neodmyslitelné použití rentgenového záření, což vede k potencionálním rizikům pro obsluhu i experimentální zvířata. Zatímco konstrukce přístroje μ CT (viz Obr. 4) umožňuje dostatečnou ochranu obsluhy před zářením, expozice zvířete rentgenovým paprskům je nevyhnutelná. Je tedy nutné zvážit radiační dávku, kterou zvíře při skenování obdrží. Aby se tato dávka záření a také doba trvání anestezie minimalizovala, skenuje se většinou pouze část těla nebo orgán, který je předmětem zájmu. Jedním z hlavních problémů využití μ CT při zobrazování *in vivo* je nízký kontrast mezi měkkými tkáněmi. Aby bylo dosaženo požadovaného kontrastu, je nezbytné použití kontrastních látek [3],[4],[7].



Obr. 4: μ CT skener od firmy Bruker [7]

2.3 Kontrastní látky

Kontrastní látky zvyšují kontrast mezi měkkými tkáněmi díky tomu, že obsahují prvek s vysokým atomovým číslem. Co se týče doby cirkulace v krvi, jsou pro *in vivo* zobrazování obecně k dispozici dva typy kontrastních látek: a) konvenční kontrastní médium na bázi jódu, b) kontrastní agens s vyšším poločasem cirkulace v krvi [3],[6].

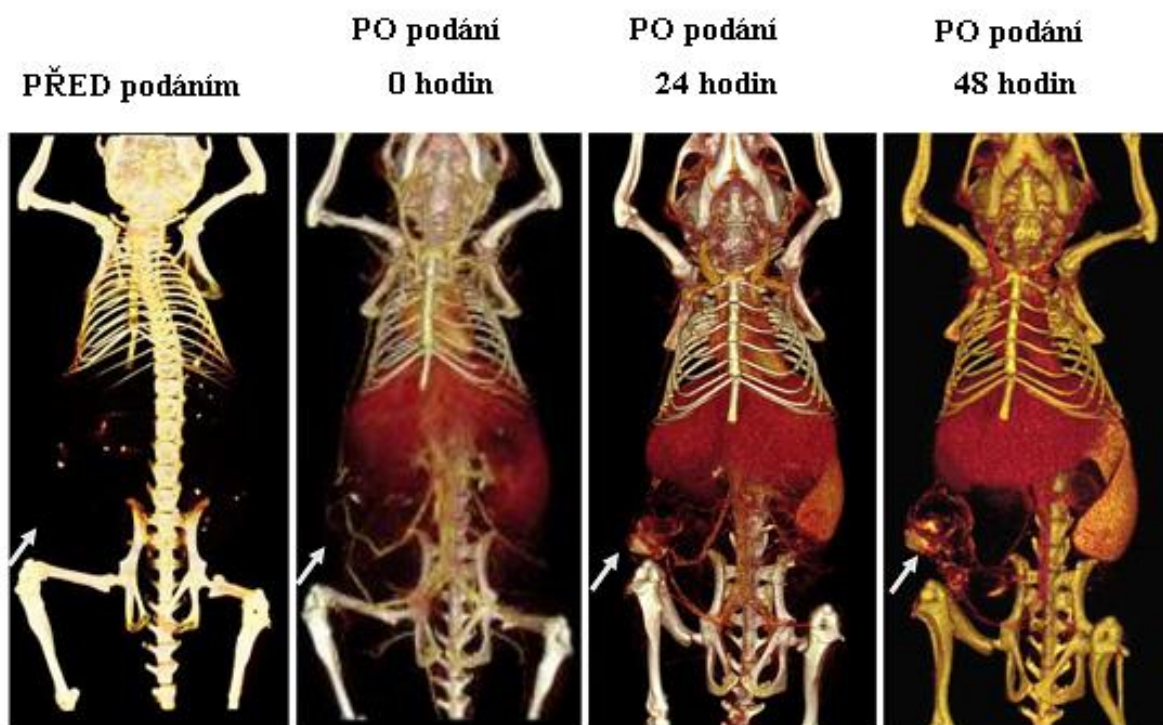
2.3.1 Kontrastní látky na bázi jódu

Ve vodě rozpustné aromatické sloučeniny jódu se obecně používají v humánní medicíně a po intravenózní aplikaci se z krve okamžitě vylučují. Klinické CT systémy jsou dostatečně rychlé na to, aby provedly zobrazení během prvního průchodu kontrastní látky krví, než dojde k její eliminaci z krevního řečiště ledvinami. Tento jediný průchod kontrastní látky je uskutečněn pouze v několika srdečních rytmech. Srdeční frekvence hlodavců je však daleko rychlejší, konkrétně u myši minimálně desetkrát, než u lidí. Z tohoto důvodu není tedy většina μ CT systémů schopna pořídít dostatečný počet snímků během tak rychlého průchodu kontrastní látky. Jedinou možností je kontinuální podávání látky infuzí po celou dobu skenování. Přesto, že jsou kontrastní látky na bázi jódu používány v klinické praxi nejčastěji, u μ CT se téměř neaplikují. Závažným problémem omezujícím použití těchto kontrastních látek v klinické praxi však je vyvolání anafylaktické reakce u pacientů [3],[6],[8].

2.3.2 Kontrastní látky s delším poločasem cirkulace

Tento typ kontrastních látek se oproti konvenčnímu výrazně liší dobou retence. Dlouhé retence těchto látek ve vaskulární cirkulaci je dosaženo především jejich velikostí a také chemickým designem, který omezuje fagocytózu retikuloendoteliálním systémem. Díky tomu je umožněno zvíře skenovat nejen delší dobu, ale také opakovaně a to po podání jediné dávky kontrastní látky (viz Obr. 5) [3],[8].

Do této skupiny patří látky, které také obsahují jód jako např. polymery, micely či liposomy na bázi jódu. Dříve byly tyto nanočástice nejčastěji používanými kontrastními látkami. V posledních letech se ovšem stále více pozornosti věnuje kovovým nanočásticím. Doposud byly připraveny nanočástice kovů Bi, Ba, Ta, Ag, Gd, Yb či Th. Nejběžněji používanými kovovými nanočásticemi jsou však nanočástice zlata (dále jen AuNPs). Vzhledem k vyššímu atomovému číslu zlata oproti jódu poskytují AuNPs vyšší kontrast, a protože je zlato extrémně inertní a AuNPs lze snadno modifikovat biokompatibilními polymery, je použití AuNPs jakožto kontrastních látek pro *in vivo* zobrazování velice slibné [3],[6],[8].



Obr. 5: μ CT zobrazení biodistribuce liposomálního jódu. Liposomy se pomalu hromadí v podkožním nádoru, játrech a slezině v průběhu 48 hodin. Bílá šipka znázorňuje umístění nádoru [8]

2.4 AuNPs

Rozsáhlý výzkum AuNPs v posledních několika desetiletích ukázal nesčetné množství jejich vlastností umožňující celou řadu biomedicínských aplikací. Mezi hlavní výhody AuNPs patří jejich jedinečné optoelektronické vlastnosti, kterých se využívá nejen při jejich charakterizaci, ale také při využití AuNPs jakožto kontrastních látek v zobrazovacích technikách či biosenzorech. Nereaktivní a tedy bioinertní povaha zlata činí AuNPs vynikajícím kandidátem pro aplikace jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Nízká akutní toxicita nanomateriálů na bázi zlata byla dokumentována řadou studií *in vitro* a předběžné zprávy rovněž prokázaly příznivé výsledky i pro *in vivo* a klinickou biokompatibilitu. Výborné biokompatibilitu je dosaženo především možnostmi modifikace povrchu AuNPs vhodnými polymery. AuNPs poskytují vysoký poměr povrchu ke svému objemu umožňující jejich funkcionalizaci značným množstvím molekul. Další výhodou AuNPs je také jejich relativně snadná příprava doplněná vysokou mírou stability vzniklých nanočástic [9],[10].

2.4.1 Příprava AuNPs

Kromě již zavedených metod uvedených níže zájem o zkoumání syntézy AuNPs stále více roste a to především se zaměřením na kontrolu jejich velikosti, tvaru, rozpustnosti, stability a funkčnosti [10],[11].

2.4.1.1 Elektrochemická metoda

Elektrochemická příprava nanočástic byla poprvé publikována roku 1994 Reetzem a Helbigem, kteří využívali jednoduché dvouelektrodové zapojení. V tomto způsobu přípravy je anoda tvořena kovem, který je přeměněn na kovové klastry, tj. nanočástice menší než 10 nm. Konkrétně dochází k oxidaci tohoto kovu a tvorbě kationtů, které migrují ke katodě, kde dochází k jejich redukci na kov. Při přípravě jsou použita rozpouštědla neobsahující kyslík a nosný elektrolyt je tvořený tetraalkylamoniovými solemi sloužícími také jako stabilizátory kovových klastrů. Aglomeraci pak brání přítomnost amonných stabilizátorů. Kromě kovových elektrod lze použít například i skleněné, jak v roce 2013 dokázali Song a kol., kterým se podařilo připravit AuNPs na povrchu vícevrstevných uhlíkových nanotrubiček s využitím elektrod ze skelného uhlíku. Mezi hlavní výhody elektrochemických metod patří jednoduché vybavení, nízké náklady, vysoká kvalita připravených AuNPs a snadné řízení výtěžku [11],[13],[15].

2.4.1.2 Burst-Schiffrinova metoda

Jedná se o metodu objevenou Brustem a Schiffrinem v roce 1994 umožňující snadnou syntézu tepelně a na vzduchu stabilních AuNPs s nízkou polydisperzitou a řízenou velikostí. V této metodě přípravy jsou použity thiolové ligandy, které silně váží zlato. Tetrachlorzlatité ionty jsou z vodné fáze převedeny do toluenové fáze za použití tetraoktylamoniumbromidu (TOAB), který slouží jako činidlo pro přenos fází, a redukovány NaBH_4 v přítomnosti dodekathiolu. Touto metodou lze připravit nanočástice o velikosti 1–3 nm [10],[11],[17].

2.4.1.3 *Biologická metoda*

Biologická syntéza nanočástic je ekologickou metodou, která se v posledních letech dostává do popředí. Dochází při ní k tvorbě nanočástic pomocí mikroorganismů, enzymů, rostlin nebo rostlinných extraktů. Řada látek přítomných v rostlinách, jako jsou flavonoidy, fytoosteroly, chinony atd., obsahují funkční skupiny schopné redukce zlatitých iontů a následné stabilizace AuNPs. Požadovaného tvaru a velikosti AuNPs je možné dosáhnout reakcí HAuCl_4 s rostlinnými extrakty za určitých reakčních podmínek jako je pH, teplota a doba inkubace. Princip syntézy AuNPs činností mikroorganismů je založen na jejich detoxifikačním mechanismu a AuNPs mohou být produkovány extracelulárně nebo intracelulárně. Při extracelulárním vzniku dochází k zachycení zlatitých iontů na povrchu buňky, kde také dochází k jejich redukci. Během intracelulární tvorby AuNPs jsou ionty transportovány a redukovány uvnitř buňky. V obou případech jsou za redukci zodpovědné enzymy produkované buněčným metabolismem. Vzniklé nanočástice jsou pak stabilizovány proteiny mikroorganismů. AuNPs připravené touto metodou vykazují oproti ostatním způsobům syntézy vyšší polydisperzitu a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 5–100 nm v závislosti na druhu použitého mikroorganismu [11],[13],[14].

2.4.1.4 *Turkevichova metoda*

Metoda založená na redukci HAuCl_4 citrátem ve vodě byla poprvé navržena Turkevichem v roce 1951 a je považována za jednu z nejznámějších technik syntézy AuNPs. V této metodě je roztok HAuCl_4 přiveden k varu a za stálého míchání je přidán roztok citrátu trisodného. Citrátové ionty zde hrají dvojí roli a to jak roli stabilizační, tak roli redukčního činidla (viz Obr. 6) [11],[18].

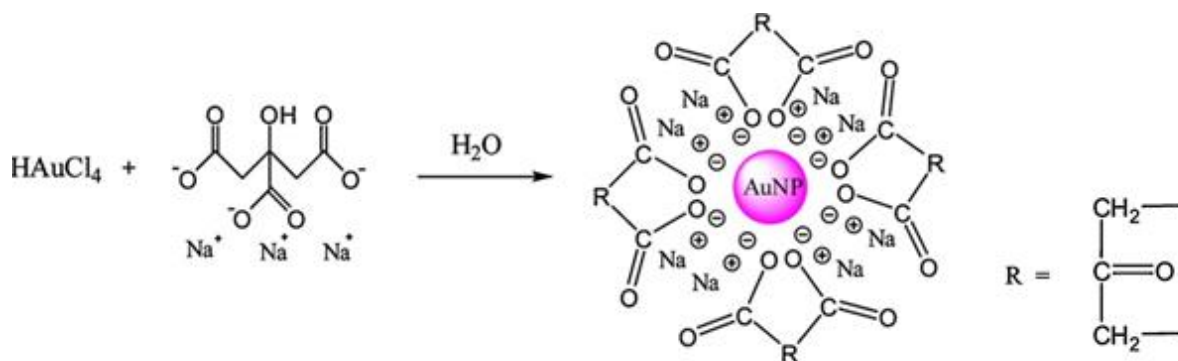
Roku 1973 byla Turkevichova metoda upravena Frensem tak, že bylo možné připravit AuNPs o velikostech mezi 16 a 147 nm. Velikost AuNPs byla regulována poměrem látkového množství citrát/zlato, kdy s rostoucím poměrem velikost klesala [11],[19].

To také potvrdili Kimling a kol., kteří ukázali, že vysoká koncentrace citrátu rychleji stabilizuje AuNPs, zatímco malá koncentrace citrátu vede k agregaci malých částic do částic větších [11].

Že citrát hraje velmi významnou roli v řízení velikosti AuNPs a pH roztoku bylo dokázáno na základě teoretického modelu a experimentálních výsledků mnoha dalších vědeckých skupin (Li a kol. 2011, Ji a kol. 2007, Yang a kol. 2007., Kumar a kol. 2007) [11].

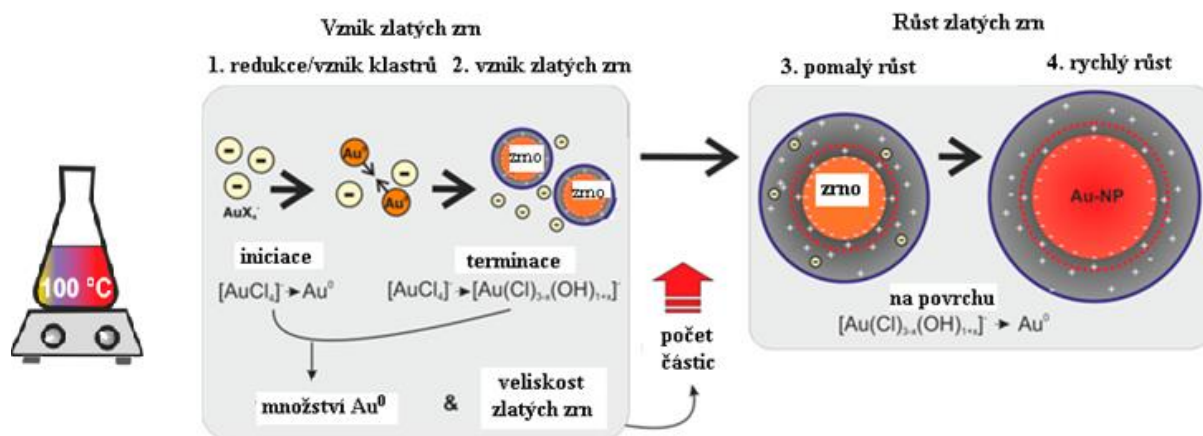
Puntes a kol. uvedli, že přidání činidel v opačném pořadí, tedy přidání HAuCl_4 do vroucího roztoku citrátu sodného, vede k tvorbě AuNPs s malou velikostí a úzkou distribucí velikosti [11].

Na základě výhod, mezi něž patří zejména jednoduchost, nízké náklady, vysoká reprodukovatelnost a možnost řízení velikosti, je dále v práci použita a rozpracována tato metoda. Nevýhodou pak je snížení stability AuNPs v koncentraci nad 2 mM [20].



Obr. 6: AuNPs připravené Turkevichovou metodou [11]

Mechanismus Turkevichovy metody (viz Obr. 7) zahrnuje čtyři základní kroky. Prvním krokem je částečná redukce prekursoru zlata a formace zlatých klastrů. Počáteční hodnota pH použitého roztoku HAuCl_4 je přibližně mezi 3 a 3,6, kdy při těchto hodnotách pH je v roztoku přítomno značné množství prekursoru $[\text{AuCl}_4]^-$. Během několika sekund po přidání roztoku citrátu dochází k redukci přibližně 1–2 % $[\text{AuCl}_4]^-$ na monomery Au^0 formující zlaté klastry (krok 1), které díky koalescenci dále rostou, až dojde k vytvoření stabilních částic tzv. zlatých zrn („seed particles“) o velikosti zhruba 1,5 nm (krok 2). Přidáním Na_3Cit se hodnota pH reakční směsi změní na zhruba 5,4–6,8 v důsledku protonace citrátu, vlivem které dojde k vytvoření určitého množství HCit^{2-} a transformaci $[\text{AuCl}_4]^-$ na více hydroxylované a méně reaktivní $[\text{AuCl}_{4-x}(\text{OH})_x]^-$, (kde $x \in \langle 1,3 \rangle$). Bylo zjištěno, že monomery Au^0 vznikají reakcí více reaktivního prekursoru $[\text{AuCl}_4]^-$ s HCit^{2-} , a tak krok 2 končí, jakmile dojde k jeho přeměně na méně reaktivní formu $[\text{AuCl}_{4-x}(\text{OH})_x]^-$. Tato méně reaktivní forma je využita v následujících krocích, kdy nejprve dochází k její pomalé (krok 3) a poté rychlé redukci (krok 4) v elektrické dvojvrstvě zlatých zrn. Připojení $[\text{AuCl}_{4-x}(\text{OH})_x]^-$ do elektrické dvojvrstvy zlatých zrn je pak považováno za nejpravděpodobnější důvod zbarvení reakčního roztoku na počátku syntézy do modré barvy, jelikož je obecně známo že změna náboje výrazně ovlivňuje optické vlastnosti AuNPs. Přestože zlatá zrna jsou polydisperzní, dochází ke vzniku monodisperzních AuNPs vlivem toho, že větší zrna rostou pomaleji, zatímco menší rostou rychleji. Během 3. a 4. kroku tedy nedochází již k tvorbě nových částic a konečný celkový počet AuNPs je ekvivalentní počtu zlatých zrn vytvořených v kroku 2 [21],[22].

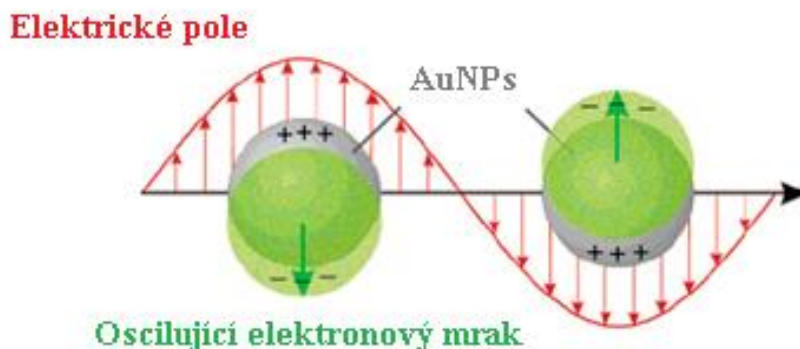


Obr. 7: Změna barvy roztoku a mechanismus vzniku AuNP Turkevichovou metodou [21]

2.4.2 Charakterizace AuNPs

Základními znaky, které se při charakterizaci AuNPs sledují a souvisí s jejich stabilitou, jsou velikost, ζ -potenciál, distribuce velikosti a pozice píku povrchové plasmonové rezonance (SPR). Tyto vlastnosti se měří pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) a UV-Vis spektrofotometrie. Velikost lze také stanovit pomocí metody TEM [10],[23].

SPR je jev vyskytující se v jakémkoli materiálu s dostatečně vysokou hustotou volných elektronů. Do této skupiny materiálů se řadí i AuNPs. SPR vzniká interakcí volných elektronů kovu s dopadajícím světelným zářením. Světelné záření je elektromagnetické vlnění vytvářející oscilující elektromagnetické pole a právě na elektrickou složku pole volné elektrony reagují. Při dopadu světla na nanočástici zlata dochází k polarizaci volných elektronů, jejich excitaci a vzniku kolektivní oscilace, která se nazývá povrchový plasmon (viz Obr. 8). Jev vzniku povrchového plasmonu je pak označován jako povrchová plasmonová rezonance. Aby k rezonanci došlo, je nutné, aby se vlnový vektor a frekvence povrchového plasmonu rovnal vlnovému vektoru a frekvenci jedné z vln dopadajícího záření. Tato vlna je pak zodpovědná za excitaci volných elektronů, a dochází tak k absorpci vlnové délky ze spektra, která této vlně odpovídá. Konkrétně u AuNPs dochází k největší absorpci záření při vlnové délce kolem 520 nm čili absorpci zelené barvy. Doplňkovou barvou zelené je barva červená, proto koloidní AuNPs mají rubínově červenou barvu [9],[10],[24].



Obr. 8: Kolektivní oscilace volných elektronů na povrchu AuNPs [9]

SPR je ovlivněna řadou vlastností jako je velikost, tvar, struktura a morfologie nanočástic a také prostředí, které nanočástice obklopuje. Z toho plyne, že se změnou velikosti nanočástic se bude měnit také poloha SPR píku a tím i jejich barva. Kromě absorpce světla jsou vlivem SPR na povrchu nanočástic generována silná elektrická pole. Ta mohou být využita k výraznému zesílení optických signálů z molekul v blízkosti nanočástic, jako je např. fluorescence nebo Ramanův rozptyl [9],[10],[24].

2.4.2.1 UV-Vis spektrofotometrie

UV-Vis spektrofotometrie je analytická metoda založená na interakci elektromagnetického záření s analyzovaným vzorkem využívající záření z ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Při této metodě je tedy použito záření odpovídající vlnovým délkám zhruba 190–800 nm. Část záření je částicemi vzorku absorbována a způsobuje excitaci jejich valenčních elektronů. Zbylá část vzorkem prochází a dopadá na detektor. Dochází tedy k zeslabení záření, které popisuje fyzikální veličina tzv. transmittance T [-] (1) :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

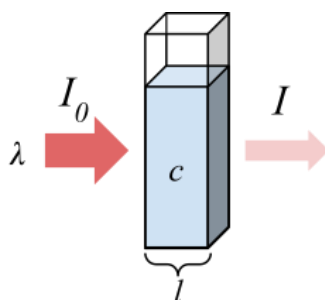
kde I [-] je intenzita záření prošlého vzorkem a dopadajícího na detektor, I_0 [-] je intenzita záření dopadajícího na vzorek [25],[27].

Častěji se však využívá jiné veličiny a to tzv. absorbance A [-]. Ta vyjadřuje schopnost částic látky pohlcovat záření o určité vlnové délce a je charakterizována jako záporný dekadický logaritmus transmittance:

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (2)$$

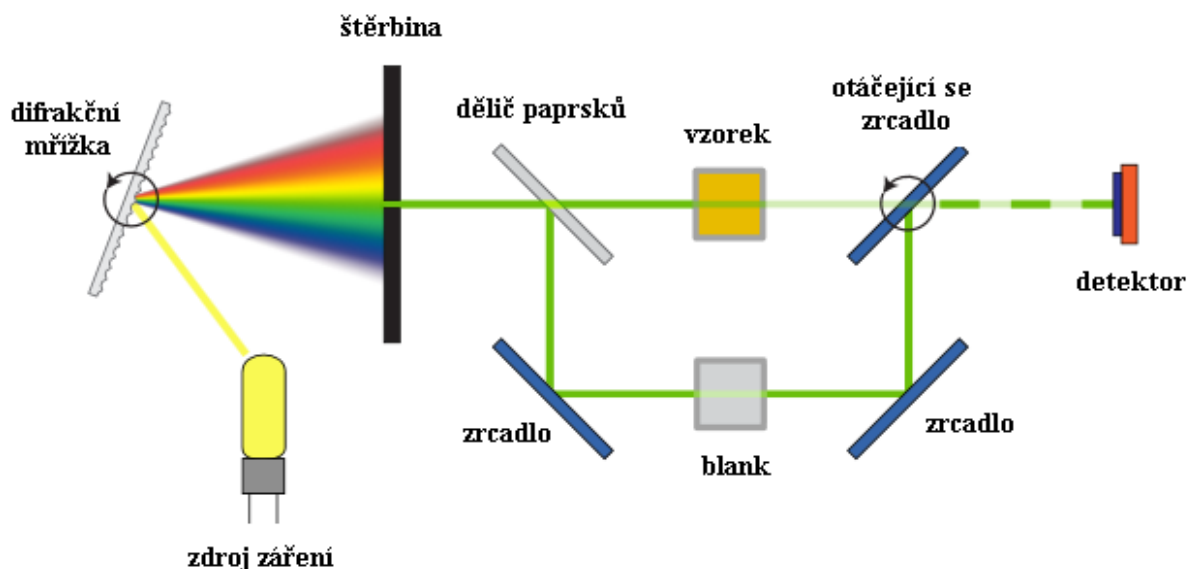
Absorbance je přímo úměrná koncentraci dané látky c [mol/dm³], tloušťce absorbující vrstvy l [cm] a molárnímu extinkčnímu koeficientu ϵ_λ [dm³/mol.cm], jak popisuje Lambert-Beerův zákon (3), (viz Obr. 9):

$$A = c \cdot l \cdot \epsilon_\lambda \quad (3)$$



Obr. 9: Absorpce záření vzorkem [28]

Měření je realizováno přístrojem tzv. spektrofotometrem, jehož schéma je zachyceno na Obr. 10. Ten se skládá ze zdroje záření, ze kterého polychromatické záření prochází monochromátorem. Jako zdroj záření pro ultrafialovou oblast se nejčastěji používá deuteriová lampa, pro viditelnou žárovka nebo halogenová lampa. V monochromátoru dochází vlivem disperzního prvku (optický hranol, difrakční mřížka) k rozložení záření na jednotlivé vlnové délky a požadovaná vlnová délka je následně vyselektována průchodem záření přes štěrbinu. U jednopaprskového spektrofotometru poté záření prochází vzorkem a dopadá na detektor (nejčastěji fotodioda). V případě dvouprskového je záření děličem paprsků rozděleno na dvě složky, z nichž jedna složka prochází analyzovaným a druhá referenčním vzorkem (blankem) [25],[26],[27].

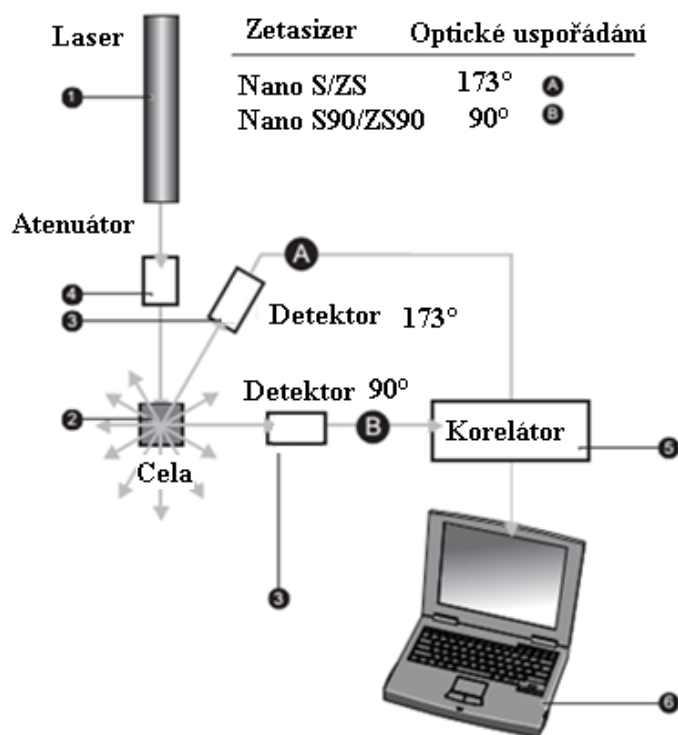


Obr. 10: Schéma spektrofotometru [26]

Výstupem metody je pak tzv. absorpční spektrum znázorňující závislost absorpance na vlnové délce. U AuNPs se absorpční maximum vlivem SPR nachází nejčastěji mezi 520–535 nm v závislosti na jejich velikosti. Zvýšené hodnoty absorpance v rozmezí 600–800 nm jsou způsobeny pohlcením záření agregáty či aglomeráty AuNPs, což může indikovat jejich nedostatečnou stabilitu [23],[25],[27].

2.4.2.2 Dynamický rozptyl světla (DLS) a víceúhlový dynamický rozptyl světla (MADLS)

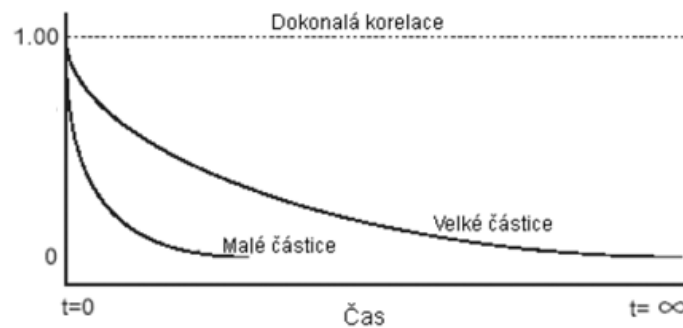
Metoda dynamického rozptylu světla (DLS) je fyzikální analytickou metodou používanou pro stanovení velikosti částic, polydispersity vzorku a charakterizaci distribuce velikosti. Princip metody je založen na měření rychlosti fluktuace intenzity světla rozptýleného částicemi vzorku, které se pohybují vlivem Brownova pohybu [29],[30].



Obr. 11: Schéma přístroje Zetasizer: 1) laser; 2) měřící cela; 3) detektor; 4) atenuátor; 5) korelátor; 6) počítač [32]

Schéma metody se nachází na Obr. 11. Laser, jakožto zdroj koherentního záření, osvětluje květu se vzorkem umístěnou v měřící cele přístroje. Většina záření prochází vzorkem a zůstává nerozptýlena, určitou část však částice rozptylují. Toto rozptýlené světlo dopadá na detektor umístěný vůči laseru buď pod úhlem 173° nebo 90°. Umístění detektoru v poloze 173° umožňuje detekci tzv. zpětného rozptylu. Výhodou tohoto uspořádání je, že paprsek nemusí procházet celým vzorkem, a tak lze měřit i vyšší koncentrace vzorků. Další výhodou je zmenšení efektu tzv. mnohonásobného rozptylu, což znamená, že rozptýlené světlo z jedné částice je následně rozptýleno jinými částicemi. Kontaminující látky jako prach (>1 μm) rozptylují více ve směru záření (dopředu tzv. Mieův rozptyl), proto se měřením zpětného rozptylu snižuje efekt prachových částic. Následně dochází k interferenci rozptýleného záření

za vzniku tmavých či světlých míst podle toho, zda se jednotlivé vlny světla skládají destruktivně či konstruktivně. Aby detektor mohl intenzitu rozptýleného světla změřit, musí být v určitém rozsahu hodnot. To v přístroji zajišťuje tzv. atenuátor, který v případě vysoce koncentrovaných vzorků sníží intenzitu laserového paprsku, v opačném případě je naopak schopen propustit na vzorek laserové světlo o vyšší intenzitě. Vlivem neustálého pohybu částic ve vzorku se poloha a intenzita tmavých a světlých interferenčních míst neustále v čase mění, neboli dochází k neustálé fluktuaci intenzity rozptýleného světla dopadajícího na detektor. Podobnost mezi dvěma signály za krátký časový okamžik je porovnávána mezi sebou korelační funkcí pomocí tzv. korelátoru. Korelační funkce se ideálně pohybuje v rozmezí 1 (pro dokonalou korelaci) až 0 (pro nulovou korelaci). Malé částice jsou tepelným pohybem ovlivněny více než velké, a intenzita rozptýleného záření bude více fluktuovat. Vlivem větší míry fluktuace bude nulové korelace signálů v čase dosaženo rychleji, čili korelační křivka bude strmější (viz Obr. 12) [29],[30],[31],[32].



Obr. 12: Korelační křivka [31]

Přístroj měří fluktuaci intenzity rozptýleného světla, kdy nejprve korelační analýzou určí difúzní koeficient D . Difúzní koeficient lze dále při znalosti teploty měření T a viskozity disperzního prostředí η_0 na základě Stokes-Einsteinovy rovnice (4) přepočítat na velikost částic (hydrodynamický průměr kulovité částice) d_H :

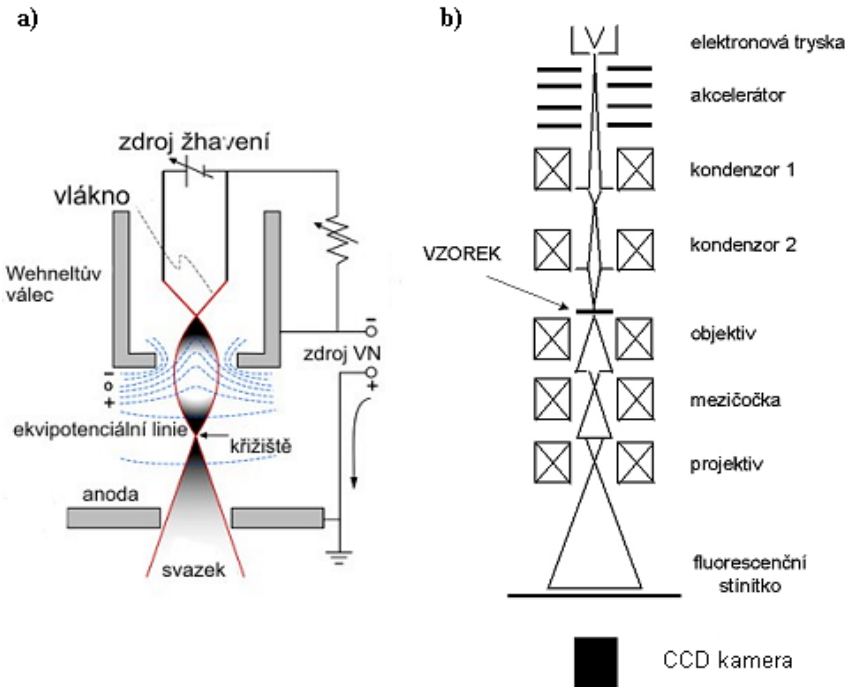
$$d_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D} \quad (4)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta ($k_B = 1,380\,648 \cdot 10^{-23}$ J/K) [31],[32].

Metoda MADLS vychází ze stejného principu, avšak poskytuje daleko přesnější informace o distribuci velikost částic ve vzorku. Na rozdíl od DLS lze pomocí MADLS také stanovit koncentraci částic ve vzorku. To je umožněno kombinací dat DLS získaných z několika detekčních úhlů, zatímco měření intenzity rozptýleného světla u metody DLS probíhá pouze v jednom detekčním úhlu. Díky tomu MADLS dosahuje daleko vyššího rozlišení, jelikož populace, které v jednom úhlu rozptylují světlo velmi slabě, a nemusí tak být do distribuce zahrnuty, jsou odhaleny v ostatních detekčních úhlech [33],[34].

2.4.2.3 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Transmisní elektronová mikroskopie je technika založená na detekci elektronů prošlých skrz zkoumaný vzorek. Schéma elektronového mikroskopu zachycuje následující Obr. 13 [35],[36].



Obr. 13: TEM: a) schéma elektronové trysky; b) schéma celého přístroje [35],[36]

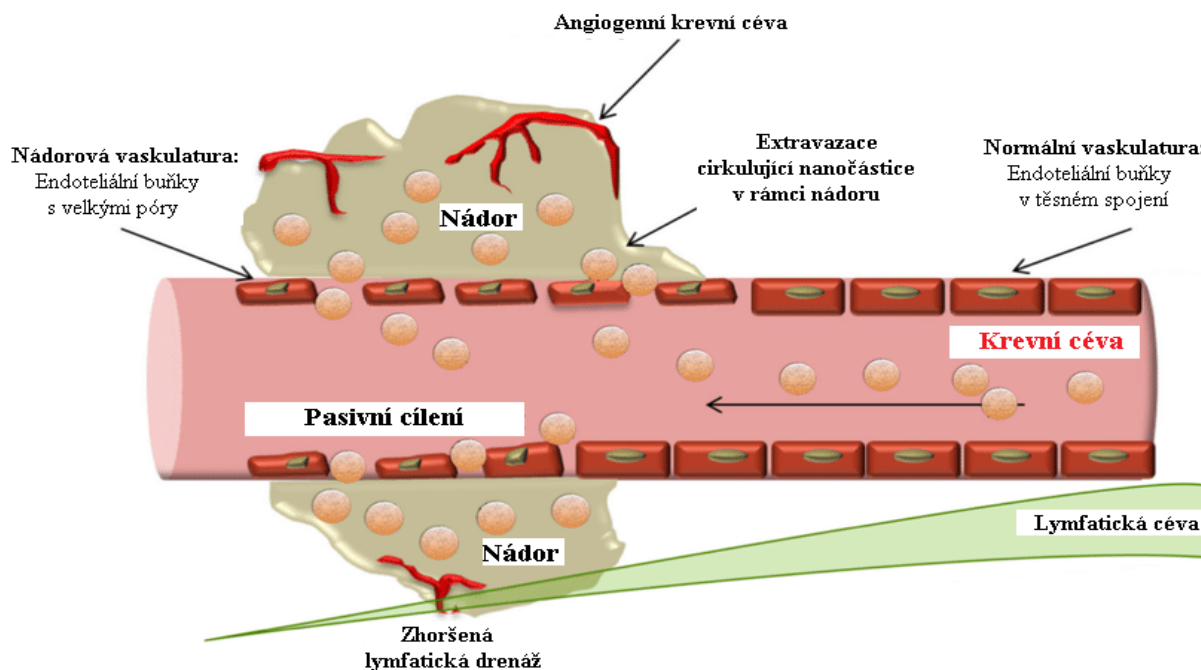
Emise elektronů v TEM je nejčastěji zajištěna katodou z tenkého wolframového drátku ve tvaru písmene V. Katoda je žhavená na teplotu kolem 2800 K. Elektronový svazek je tedy nejčastěji vytvářen termoemisí. Kolem katody je generováno elektrické pole způsobující, že se emitovaný svazek elektronů zužuje tak, že vytváří tzv. křížiště, tj. nejužší místo svazku. Křížiště vzniká těsně před otvorem anody a díky němu lze považovat zdroj elektronů za bodový a koherentní. Anoda se pak nachází naproti katodě. Dráha, rychlost a šířka svazku elektronů je po průchodu anodou ještě upravena systémem clon a čoček, které společně s elektronovou tryskou vytvářejí ozařovací soustavu elektronového mikroskopu. Dalšími částmi elektronového mikroskopu jsou kondenzor, objektiv a projekтив. Kondenzor fokusuje elektronové paprsky na vzorek a zajišťuje jeho homogenní a intenzivní ozáření. Při ozáření vzorku dochází k jeho interakci s primárními elektrony a k vychýlení jejich směru. Část elektronů rozptýlených s dostatečně velkým úhlem je zachycena clonou objektivu. Objektiv je určen k tvorbě obrazu a je zpravidla tvořen jednou elektromagnetickou čočkou. Obraz vytvořený objektivem je dále zobrazen čočkami, které tvoří projekтив. Úkolem projekтиву je promítnout obraz na stínítko a tvoří ho až čtyři elektromagnetické čočky. Na stínítku dochází k převodu obrazu tvořeného prošlými elektrony na viditelné záření, které je obvykle dále pomocí optických vláken zaznamenáváno CCD kamerou. CCD senzor má přes 10 milionů obrazových bodů (pixelů), což zajišťuje vysoké rozlišení obrazu [35],[36].

2.4.3 Povrchová modifikace AuNPs

Připravené AuNPs obvykle nesplňují požadavky pro konkrétní biomedicínské aplikace. Proto je nutná jejich následná povrchová modifikace, která zvýší koloidní stabilitu za biologických podmínek a také potlačí jejich rozpoznání buňkami imunitního systému. Povrchové modifikace AuNPs je využito k potlačení jejich rychlému vyloučení z krevního oběhu retikuloendoteliálním systémem (RES). Prodloužení doby cirkulace v krevním oběhu je nezbytné pro využití AuNPs k tzv. pasivnímu cílení do nádorů. Celkově povrchová modifikace AuNPs zvyšuje jejich stabilitu, minimalizuje vychytání buňkami imunitního systému, zlepšuje jejich biodistribuci, ale kromě toho lze také na jejich povrch navázat specifický ligand pro cílení ke konkrétním buněčným strukturám na povrchu buněk nebo v mezibuněčném prostoru (např. fibrin v trombech). Vazbou specifického ligandu na AuNPs je umožněno tzv. aktivní cílení neboli jejich využití ve specifických oblastech onemocnění a selektivní interakce s buňkami nebo biomolekulami [9],[37],[38].

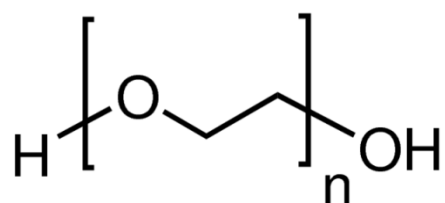
2.4.3.1 Pasivní cílení

Pasivní cílení nanočástic do míst organismu postižených nemocí je umožněno pomocí tzv. efektu permeace a retence neboli EPR efektu (viz Obr. 14). Protože se nanočástice při *in vivo* aplikaci podávají nejčastěji intravenózně, dochází k jejich biodistribuci v organismu vaskulárním systémem. V místech onemocnění, jako je např. nádor, je zvýšená vaskulární permeabilita. K tomuto zvýšení propustnosti dochází z důvodu rychlé tvorby ne plně funkčních cév obsahujících póry (fenestrace) mezi endoteliálními buňkami, které umožňují vstup pro nanočástice a makromolekuly. Další důležitou složkou EPR efektu je retence, neboli požadavek aby látka zůstala na daném místě dostatečnou dobu. Toho je v místech onemocnění dosaženo díky snížené lymfatické clearance. Nanočástice jsou ve využití EPR efektu velmi výhodné, protože jsou dostatečně malé na to, aby vstoupily do místa onemocnění, zároveň však dostatečně velké na to, aby v místě onemocnění zůstaly relativně dlouhou dobu. EPR efekt je tedy kritický pro cílení k tkáním, u nichž je výrazná neovaskulatura, jako je např. u nádorů nebo aterosklerózy [37],[39].



Obr. 14: EPR efekt pasivního cílení nanočástic [40]

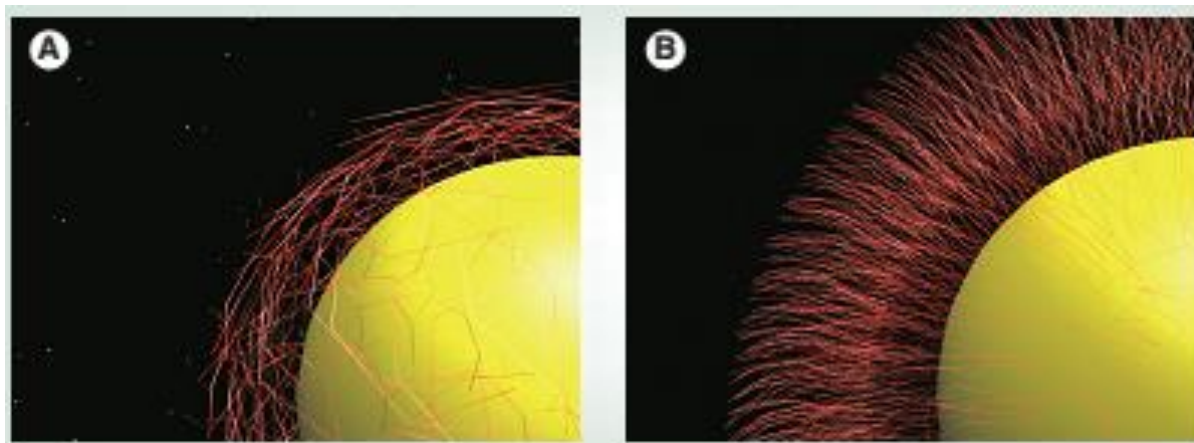
Jak již bylo zmíněno, pro pasivní cílení je nutno AuNPs modifikovat polymery, které umožňují jejich dostatečně dlouhou cirkulaci v krevním oběhu. Polymery běžně používanými pro modifikaci AuNPs jsou např. PVP (polyvinylpyrrolidin), PVA (polyvinylalkohol), PVME (polyvinylmethyleter), PEG (polyethylenglykol), chitosan aj. Nejpoužívanějším polymerem, který je levný, univerzální a schválený FDA pro mnoho aplikací, je PEG znázorněný na Obr. 15 [10],[37].



Obr. 15: Struktura PEG [37]

Pro modifikaci AuNPs se nejčastěji používá PEG obsahující thiolovou skupinu na konci polymerního řetězce. Díky volnému elektronovému páru síry dochází ke vzniku koordinačně-kovalentní vazby mezi PEG a povrchem AuNPs. Tato vazba je daleko silnější než vazba vzniklá adsorpcí citrátu na povrch AuNPs během jejich přípravy. Vlivem silnější vazby dochází k vytěsnění citrátu z povrchu AuNPs molekulou PEG. Tento jev se nazývá ligandová výměna a je nejpoužívanějším typem povrchové modifikace. Navíc PEG stabilizuje AuNPs stericly, tedy daleko silněji než citrát, který je stabilizuje na základě elektrostatické repulze. PEG tedy zvyšuje výrazně stabilitu AuNPs, hydrofilitu, a posiluje EPR efekt tím, že maskuje AuNPs před rozpoznáním buňkami imunitního systému. Při modifikaci AuNPs PEG je

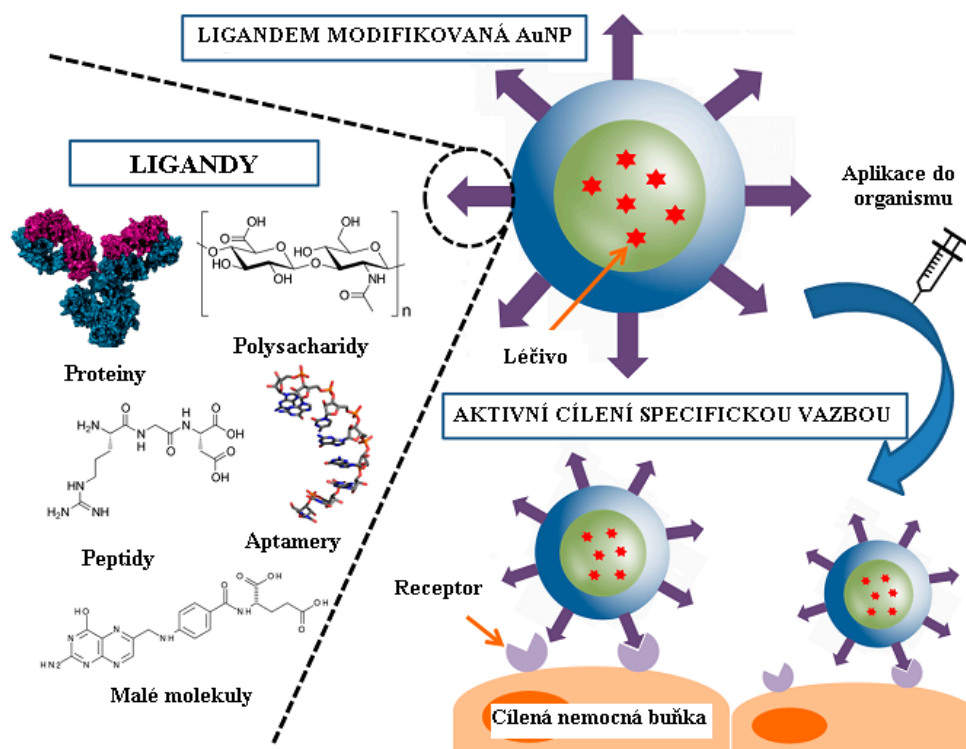
velice důležitá jeho koncentrace, jelikož nedostatečné množství PEG může naopak vést k agregaci AuNPs. To je způsobeno tím, že při nedostatečné koncentraci tvoří řetězce PEG na povrchu AuNPs tzv. mushroom konformaci. Během této konformace je povrch AuNPs nedostatečně krytý, dochází k interakci povrchu AuNPs s C–O–C skupinami polymerního řetězce PEG vázaného na jiné částici a tím pádem k agregaci. Pokud je povrch AuNPs PEG dostatečně saturován, řetězce PEG jsou natažené a vytváří tzv. konformaci brush, jak znázorňuje následující Obr. 16 [37],[39],[41].



Obr. 16: Konformace PEG na povrchu AuNP: a) mushroom; b) brush [37]

2.4.3.2 Aktivní cílení

Na rozdíl od pasivního cílení, kde docházelo ke kumulaci AuNPs v určitých tkáních převážně díky EPR efektu, lze funkcionalizované AuNPs do požadovaných míst cílit přímo. Toho je dosaženo konjugací AuNPs s ligandem (viz Obr. 17), který se silně a specificky váže k určitému receptoru typicky nadměrně exprimovanému na povrchu cílené buňky, např. buňky rakovinné. Ligand lze na povrch AuNPs vázat přímo, častěji se však využívá jeho vazby na terminální konec již přítomného stabilizujícího polymeru AuNPs. Terminální konec může obsahovat vhodnou skupinu pro navázání, např. karboxylovou pro vázání aminoskupiny protilátek, nebo k tvorbě vazby dochází s využitím tzv. klik-chemie. Klik-chemie je vynikající strategií pro povrchovou modifikaci, protože nedochází k ovlivnění struktury AuNPs a tvorba dané vazby je zcela specifická a ortogonální. Příkladem ligandů mohou být jak malé molekuly (např. lipidy, vitamíny, peptidy, sacharidy) tak i molekuly větší (proteiny, enzymy, polysacharidy, aptamery) [9],[38],[39].



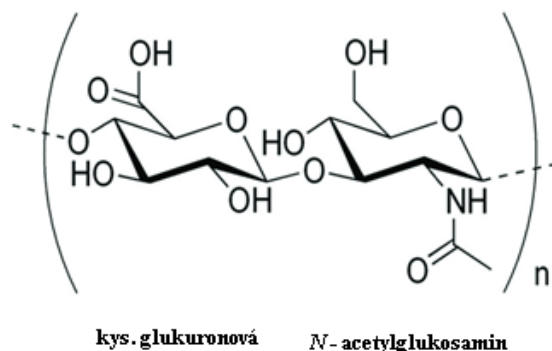
Obr. 17: Ligandy pro aktivní cílení AuNPs [42]

Nejdelší historii, co se týče využití v rámci aktivního cílení, mají protilátky, které se oproti ostatním větším ligandům vyznačují vyšší specifitou. Navíc protilátky mohou být využity nejen pro cílení, ale také k terapeutickým účelům. U protilátek se velmi často využívá vazby biotin-avidin. Z polysacharidů se velmi často využívá např. kyselina hyaluronová, chitin a manan. Kyselina hyaluronová se specificky váže na receptor CD44, který je nadměrně exprimovaný na povrchu nádorových buněk, a je považován za jeden z reprezentativních markerů rakovinných kmenových buněk. Manan je polysacharid obsahující velké množství D – manosových zbytků, které jsou rozpoznány manosovými receptory makrofágů a dendritických buněk. Z ligandů menších velikostí jsou nejčastěji využívány peptidy, kterých lze díky jejich velikosti na povrch AuNPs navázat daleko více oproti předchozím ligandům. Peptidy převážně cílí na receptor IL-4R, který je exprimovaný v plicích nádorových buňkách i nádorových endoteliálních buňkách [42],[43],[44].

2.4.3.2.1 Kyselina hyaluronová

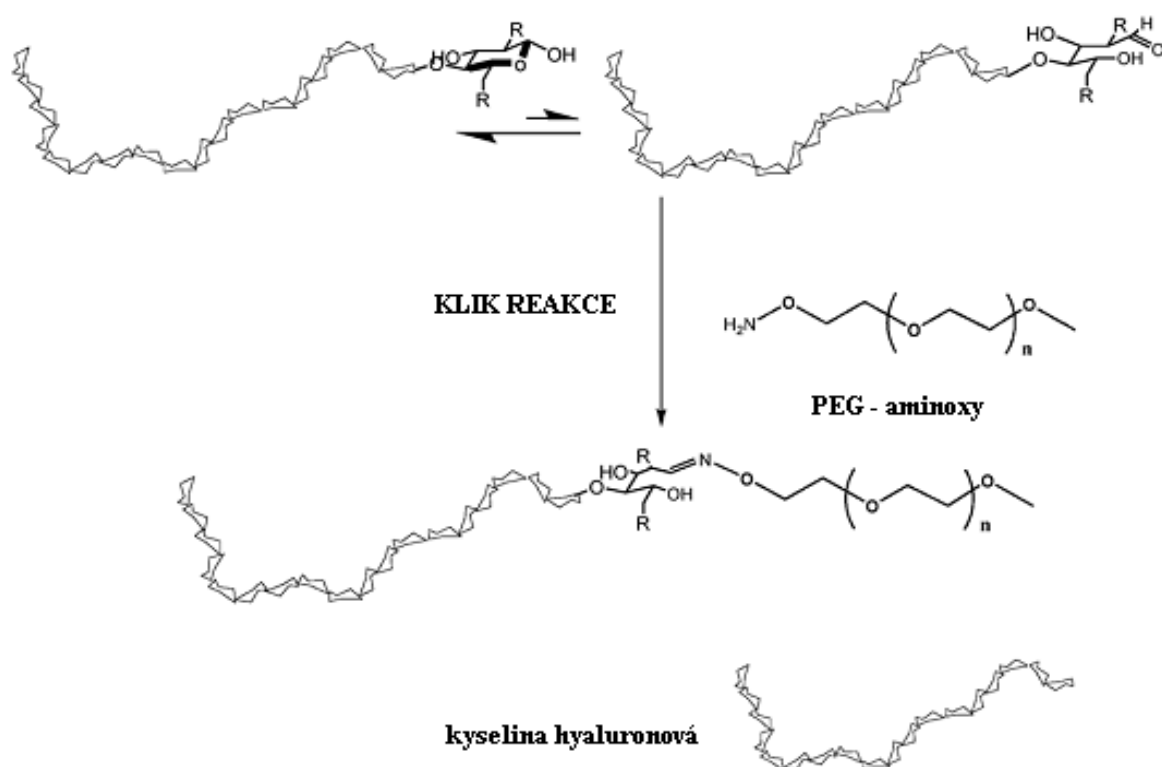
Kyselina hyaluronová (dále jen HA) je lineární polysacharid složený z opakujících se disacharidových jednotek kyseliny D – glukuronové a N – acetylglukosaminu (viz Obr. 18). HA se vyznačuje svojí výbornou rozpustností ve vodě, biokompatibilitou, biodegradovatelností, netoxicitou a neimunogenicitou. Obecně platí, že HA s nízkou molekulovou hmotností (nižší než 100 kDa) vyvolává prozánětlivé reakce, zatímco HA s vysokou molekulovou hmotností spouští protizánětlivé odpovědi. Díky svým vlastnostem se HA využívá v široké škále medicínských aplikací, jako je zejména léčení chronických ran a zánětů. HA je také ligandem pro různé receptory exprimované na mnoha typech buněk včetně buněk rakovinných. Dosud byly popsány interakce HA s různými buněčnými

receptory, jako s již dříve zmíněným CD44, receptorem pro HA zprostředkovanou motilitu (RHAMM), endoteliálním HA receptorem lymfatických cév (LYVE-1) a HA receptorem pro endocytózu (HARE). Na základě možnosti využití receptorem zprostředkované aktivní cílení nabízené těmito interakcemi je HA považována za slibného kandidáta pro selektivní buněčné dodávání zobrazovacích a protinádorových agens a pro imunoterapii, kde lze cílením dendritických buněk zvýšit účinnost vakcín [47],[48],[49].



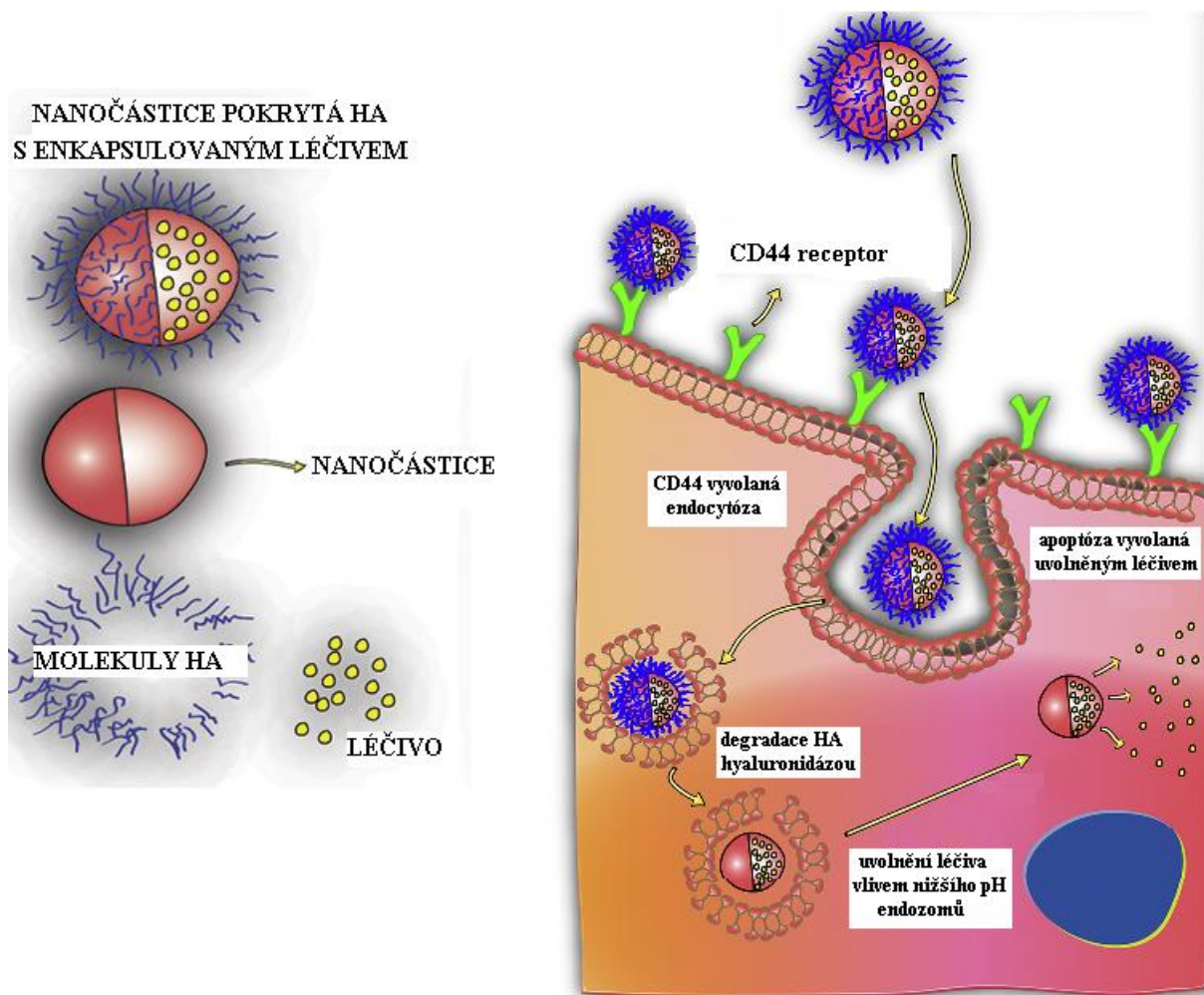
Obr. 18: Vzorec kyseliny hyaluronové [49]

Častým přístupem pro navázání HA na požadované nosiče je využití klik-chemie a to konkrétně aminosy kondenzační reakce, která je robustní strategií zejména v oblasti glykokonjugace. Jedná se o biorthogonální klik-ligaci, během které dochází ke spontánní kondenzaci funkčních aminosy skupin s dostupnou aldehydovou nebo ketonovou skupinou za vzniku oximové vazby. V případě polysacharidů je výhodou, že redukční konce většiny polysacharidů zahrnují aldehydovou funkční skupinu v rovnováze s její hemiacetální formou. Aminosy kondenzace je vysoce chemoselektivní a regioselektivní, takže je užitečná pro vazbu polysacharidů, jako je právě HA, protože v každé molekule HA je přítomen pouze jeden redukující konec (hemiacetal). Další výhodou je, že výsledná oximová vazba je stabilní při fyziologickém pH a že reakcí vzniká pouze voda, čili absence jakýchkoli nežádoucích vedlejších produktů. Pro potřeby navázání HA na AuNPs lze tedy AuNPs modifikovat PEG obsahujícím na jednom svém konci aminosy skupinu. Tuto reakci zachycuje následující Obr. 19. Kinetika tvorby oximové vazby je závislá na hodnotě pH. Uvádí se, že nejrychleji reakce probíhá při pH zhruba 4,5. Pokud je hodnota $\text{pH} < 3$ nebo $\text{pH} \geq 7$ dochází naopak k rapidnímu zpomalení reakce. Nejpoužívanějším pufrům pro navázání HA na aminosy skupinu je acetátový pufr o $\text{pH} = 5,5$ a koncentraci 20 mM. Obecně by koncentrace pufru měla být ideálně v rozmezí 5–50 mM. Oximová vazba tvořená aminosylovou ligací je termodynamicky nestabilní a ve vodném roztoku za mírně kyselých podmínek podléhá ve značné míře hydrolyze, přičemž se tato vlastnost stává výhodnou pro aplikace, kde je vyžadováno řízené uvolňování založené na definované pomalé hydrolyze kovalentní vazby. Nádorové tkáně nebo intracelulární kompartmenty, jako jsou lysozomy, jsou dobrými příklady aplikací pro řízené uvolňování [48],[51],[52].



Obr. 19: Aminoxy kondenzační reakce [50]

Hlavní receptor pro HA, receptor CD44, je transmembránový glykoprotein přítomný v buněčných membránách téměř všech lidských buněk. Organizace genu CD44 dává velké množství různých sestřihových variant a tedy vznik různých izoform CD44. Různé izoformy CD44 jsou exprimovány na buňkách imunitního systému a na většině nádorových buněk, jako jsou např. buňky rakoviny prsu, plic, žaludeční rakovinné buňky, pankreatické, ledvinové či melanomové. Na nádorových buňkách je pak CD44 exprimován v daleko větší míře než na buňkách zdravých. CD44 je navíc společným markrem několika typů rakovinných buněk, které vykazují vysoce maligní a chemorezistentní vlastnosti. Je známo, že se zúčastní celé řady buněčných funkcí, jako je orientace, adheze, migrace buněk a signálních procesů mezi buňkou a extracelulární matrix. CD44 je také zodpovědný za buněčnou internalizaci produktů vzniklých degradací HA makrofágy. Interakce HA – CD44 se využívá při dodávání chemoterapeutických léčiv do nádorových buněk (viz Obr. 20), HA však není pouze molekula zaměřující se na receptor CD44. Povrchovou modifikací nanočástic HA je dosaženo prodloužení doby cirkulace v krevním oběhu a potlačení imunitní odpovědi způsobené aktivací komplementu. HA tedy jako alternativa k modifikaci PEG představuje slibnou strategii pro navrhování a konstrukci budoucích systémů pro dodávání léčiv s prodlouženým oběhem *in vivo* [48],[53].



Obr. 20: Cílení CD44 nanočásticemi modifikovanými HA [54]

2.4.4 Využití AuNPs

Nanomateriály na bázi zlata díky své přirozené inertnosti, laditelným optickým vlastnostem, snadné syntéze a možnosti variabilní povrchové modifikace představují značný potenciál pro využití v široké škále biomedicínských aplikací. AuNPs jsou univerzální platformou pro chemické a biologické senzory, čili mohou sloužit k diagnostickým účelům a snímání signálu generovaného specifickou vazbou molekul analytu. Mezi další možnosti jejich využití patří zobrazování, cílení léků či léčba nádorových onemocnění s využitím fotodynamické terapie. AuNPs jsou také vhodné pro vývoj multifunkční platformy pro celou řadu terapeutických aplikací. Navzdory velkému počtu publikací o úspěšném uplatnění AuNPs jsou zde stále přítomny jisté omezující faktory. Mezi ně patří například nízká akumulace v nádorech, kdy je nutno použití poměrně velkého množství AuNPs, což vede k vyšším nákladům za léčbu. Dalším negativem je, že AuNPs větší než 8 nm nejsou z těla snadno odstraněny a hromadí se v orgánech, jako jsou játra a slezina [9],[10].

2.4.4.1 Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie je diagnostická a léčebná metoda využívaná zejména při léčbě tumorů využívající fotocitlivou látku neboli tzv. fotosenzibilizátor. Při této terapii dochází k ozáření fotosenzibilizátoru viditelným a/nebo infračerveným světlem o vlnové délce blízké absorpčnímu maximu fotosenzibilizátoru, čímž dojde k jeho excitaci. Excitované molekuly fotosenzibilizátoru se do základního stavu dostanou přenosem energie na molekuly kyslíku, vlivem čehož vznikají kyslíkové radikály, které jsou velice reaktivní a iniciují oxidační poškození buňky, což vede k apoptické a následně buněčné smrti. Jelikož je vlnová délka použitého záření taková, aby byla absorbována pouze fotosenzibilizátorem, nedochází k poškození zdravé tkáně. SPR je významnou vlastností AuNPs umožňující jejich využití právě při této metodě. Použití této metody je ovšem omezeno pouze na dobře prokrvené tkáně, kde se nachází dostatečné množství kyslíku, které je nezbytné pro její správný účinek [55],[56].

2.4.4.2 Fototermální terapie

Fototermální terapie je minimálně invazivní a vysoce aplikovanou metodou v léčbě rakoviny přitahující v posledních letech značnou pozornost. Během této metody opět dochází k ozáření AuNPs elektromagnetickým vlněním, kdy je ale tentokrát absorbovaná světelná energie přeměněna na energii tepelnou. Tímto způsobem dochází k zahřátí tkáně na teplotu zhruba 50°C, což je teplota způsobující buněčnou smrt. AuNPs lze tedy afinitně cílit pouze do nádorových buněk, kdy vlivem vysoké teploty dojde k jejich nekróze, zatímco zdravá tkáň zůstává nepoškozena [55],[57].

2.4.4.3 Kontrastní látky

AuNPs je věnována velká pozornost díky jejich aplikaci jakožto kontrastních látek využívající rentgenové záření. Jak už bylo zmíněno dříve, oproti konvenčním jodovým kontrastním látkám dosahují vyššího kontrastu a vyznačují se daleko delší cirkulací v krevním oběhu. Navíc díky poměrně snadné funkcionalizaci je lze cílit do požadovaných míst organismu, a tak tyto struktury zobrazit. Další metodou umožňující využití zlatých nanočástic je PET, která je citlivější než CT a která slouží převážně k hodnocení biodistribuce a farmakokinetiky zlatých nanostruktur a i ostatních nanomateriálů. Tato metoda ovšem před *in vivo* aplikací vyžaduje funkcionalizaci struktur zlata radionuklidem, kdy ale během *in vivo* studie může dojít k odpojení radionuklidu a zkreslení výsledků. Další nevýhodou je nežádoucí změna povrchových vlastností AuNPs a také nízké rozlišení PET. Zavedením radioaktivního izotopu ¹⁹⁸A do zlatých nanostruktur je pak možné jejich využití Čerenkovovou luminiscenční metodou. Nevýhodou této metody však je nízká penetrace tkání, jelikož většina emitovaného světla spadá do UV nebo viditelné oblasti, a tak dochází k jeho značnému rozptylu a útlumu okolními tkáněmi [9],[55].

2.4.4.4 *Senzory*

Jednou z hlavních aplikací AuNPs jsou chemické a biologické senzory. AuNPs se využívají pro detekci analytů, jako jsou kovové ionty, anionty, sacharidy, nukleotidy, proteiny či toxiny. Podle sensorické strategie se rozlišuje několik typů senzorů využívajících určité vlastnosti AuNPs. Příkladem mohou být senzory kolorimetrické založené na viditelné změně barvy v důsledku agregace AuNPs, elektrické a elektrochemické využívající změnu vodivosti. Schopnost AuNPs zhaset fluorescenci využívají fluorescenční senzory a SPR je využita v senzorech založených na povrchové plasmonové rezonanci. Dalšími příklady jsou SERS neboli senzory založené na Ramanově rozptylu a senzory na bázi křemíkových krystalů [10],[55].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Příprava AuNPs a jejich optimalizace

3.1.1 Materiál

Trihydrát kyseliny tetrachlorzlatité Sigma-Aldrich, USA

Dihydrát citrátu trisodného Sigma-Aldrich, USA

3.1.2 Metody

3.1.2.1 Optimalizace

Byly připraveny celkem 4 vzorky AuNPs stabilizované různým množstvím citrátu. Konkrétně látkové množství zlata ku látkovému množství citrátu odpovídalo u jednotlivých vzorků poměru 1:3; 1:6; 1:10 a 1:20. Vzorky byly následně charakterizovány metodou DLS v nízkoobjemové kyvetě ZEN0040 (100 μ l vzorku) na přístroji Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd, UK) a UV-Vis na přístroji Synergy 2 (BioTek, USA), kdy došlo k proměření 100 μ l každého vzorku na mikrotitrační destičce v rozmezí vlnových délek 450–800 nm proti vodě. U každého vzorku byla pomocí pH metru (Beckman Φ 110 ISFET, USA) stanovena hodnota pH jako aritmetický průměr ze tří měření.

3.1.2.2 Příprava roztoků

Příprava zásobního roztoku zlata

Na analytických vahách (Ohaus Explorer Analytical, USA) byl navážen 1 g $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Navážka byla rozpuštěna v 10 ml Mili-Q vody.

Příprava pracovního roztoku zlata

50 μ l zásobního roztoku zlata bylo zředěno Mili-Q vodou na konečný objem 24 ml.

Příprava zásobního roztoku citrátu

Na vahách (KERN 440, Fisher Scientific, USA) bylo naváženo 14,70 g dihydrátu citrátu trisodného. Navážka byla rozpuštěna v 50 ml Mili-Q vody. Roztok byl poté přefiltrován přes 0,22 μ m filtr.

Příprava pracovních roztoků citrátu

37,5; 75; 125 a 250 μ l zásobního roztoku citrátu bylo zředěno Mili-Q vodou na konečný objem 1 ml. Tímto způsobem byly připraveny 4 pracovní roztoky citrátu, jejichž látkové množství bylo 3x, 6x, 10x a 20x větší než látkové množství Au v pracovním roztoku zlata.

3.1.2.3 Příprava skla

Varná baňka s kulatým dnem a míchadlo byly řádně umyty saponátem a Mili-Q vodou. Poté byla baňka společně s míchadlem vypláchnuta lučavkou královskou a následně Mili-Q vodou. Nakonec byla baňka vysušena v sušárně.

3.1.2.4 *Syntéza AuNPs*

Pracovní roztok zlata byl převeden do varné baňky s kulatým dnem a bylo přidáno míchadlo. Následně byla baňka vložena do olejové lázně. Roztok byl přiveden k varu a nechán 10 min povařit. Poté byl přidán pracovní roztok citrátu a směs byla nechána reagovat 20 min. Teplota lázně byla nastavena na 145°C a rychlost míchání na 1000 ot./min. Po celou dobu syntézy byla směs pod refluxem chlazena vodou.



Obr. 21: Aparatura na syntézu AuNPs a změna barvy roztoku při syntéze AuNPs pro další experimenty

3.1.2.5 *Charakterizace AuNPs připravených pro další experimenty*

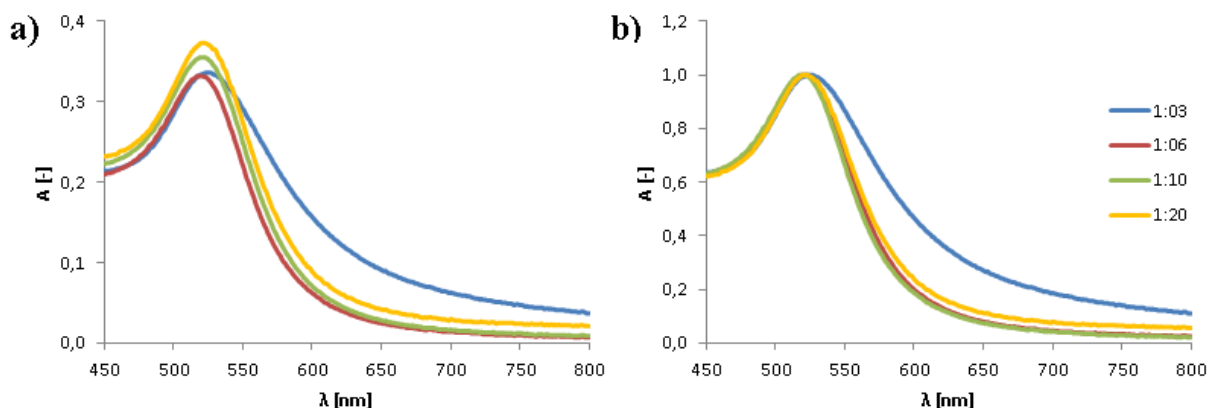
Na základě výsledků optimalizace byly pro další experimenty opět nasyntetizovány AuNPs o poměru látkového množství zlata ku citrátu 1:10. Tyto AuNPs byly charakterizovány metodami UV-Vis (UVIKON XL, BioTek, USA); DLS a MADLS (Zetasizer Ultra, Malvern Panalytical Ltd, UK) a TEM (Philips EM 208, software Morgagni 268, FEI, ČR). Během metody UV-Vis došlo k proměření 1 ml suspenze v nízkoobjemové kyvetě ZEN0040 proti vodě a DLS 50 μ l suspenze v kyvetě ZEN2112. Změřená hodnota pH u připravených AuNPs byla 6,52. Ze suspenze AuNPs byl odebrán 2x1 ml a u jednotlivých alikvotů bylo upraveno pH pomocí 0,1 M HCl a 0,1 M NaOH na 4,99 a 10,88. Hodnoty pH byly stanoveny pomocí Mini pH metru (Beckman Φ 110 ISFET, USA).

3.1.2.6 *Charakterizace pracovního roztoku zlata a důkaz kvantitativní reakce*

Pomocí přístroje UVIKON XL (BioTek, USA) bylo změřeno absorpční spektrum 1 ml pracovního roztoku zlata v nízkoobjemové kyvetě ZEN0040 v rozmezí vlnových délek 270–400 nm a poté změřena hodnota absorbance při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu. Měření probíhalo proti blanku, kterým byla voda. Z připravené suspenze AuNPs byl odebrán 1 ml vzorku do zkumavky Eppendorf. Vzorek byl poté stočen na centrifuze (Eppendorf 5430, Německo) při 30 000 ot./min po dobu 30 minut. Následně byl odebrán supernatant, u kterého bylo opět proměřeno absorpční spektrum stejným způsobem jako u pracovního roztoku zlata.

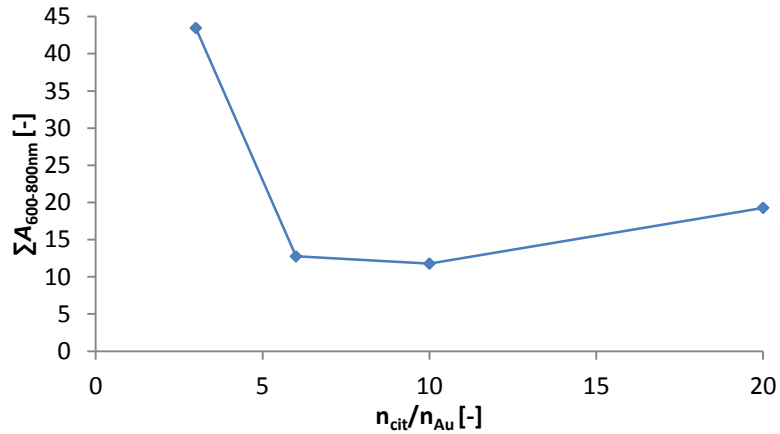
3.1.3 Výsledky

3.1.3.1 Optimalizace: UV-Vis



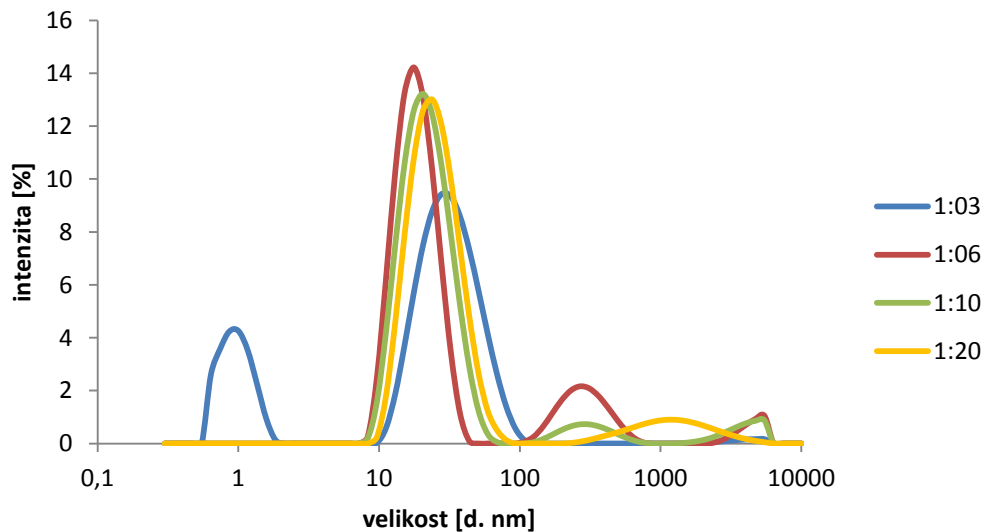
Obr. 22: Absorpční spektra jednotlivých vzorků AuNPs: a) naměřená; b) normalizovaná

Z absorpčních spekter jednotlivých vzorků na Obr. 22 a) je patrné, že látkové množství zlata ku látkovému množství citrátu odpovídající poměru 1:3 je nedostatečné pro stabilizaci AuNPs. To především z důvodu vysokých hodnot absorbance v rozmezí 600–800 nm, což je oblast absorpčního spektra, kde vysoké hodnoty absorbance indikují přítomnost agregátů. U tohoto vzorku došlo také k výraznému roztažení píku k vyšším vlnovým délkám, což je další důkaz o rozšířené distribuci velikosti částic a tedy i o daleko větší polydisperzitě. Dále si lze povšimnout také rozdílů v absorpčních maximech jednotlivých vzorků. Zatímco vzorky o poměru 1:3 a 1:6 mají absorpční maximum přibližně stejné intenzity, u vzorků 1:10 a 1:20 pak absorpční maximum dosahuje vyšších hodnot absorbance. To také může poukazovat na kvalitu stabilizace, jelikož obecně platí, že s rostoucí hodnotou absorpčního maxima roste i stabilita nanočástic. Na Obr. 22 b) jsou pak zachycena normalizovaná absorpční spektra. Díky normalizaci lze jednotlivá spektra mezi sebou snáze porovnávat a to především, co se týče míry agregace vzorku. Na základě integrace plochy pod křivkou v intervalu vlnových délek 600–800 nm lze stanovit, který ze vzorků bude mít agregátů nejvíce a který nejméně. Hodnoty integrace jsou zachyceny na následujícím Obr. 23. Obrázek jasně znázorňuje, že nejvíce agregátů bude opravdu přítomno ve vzorku 1:3, nejméně naopak ve vzorku 1:10. Z tohoto obrázku lze vydedukovat, že s přibývajícím množstvím citrátu do jeho určitého látkového množství stabilita AuNPs roste, po překročení určité hodnoty naopak začne klesat, jelikož vzorek 1:20 už má opět agregátů více než vzorek 1:10. Na základě výsledků UV-Vis lze tedy předpokládat, že pro stabilizaci AuNPs je ideální látkové množství citrátu 10x větší než zlata.



Obr. 23: Hodnoty integrace plochy pod křivkou v intervalu 600–800 nm po normalizaci spekter

3.1.3.2 Optimalizace: DLS



Obr. 24: Distribuce dle intenzity

Z Obr. 24 je vidět, že ve vzorku 1:3 mají AuNPs daleko větší velikost než u ostatních vzorků. Z obrázku i následující Tab. 1 je patrné, že nejmenší velikosti dosahují AuNPs ve vzorku 1:6. U tohoto vzorku se ale vyskytuje větší množství agregátů než u vzorku 1:10, což potvrzuje nejen zvýšení intenzity v rozmezí 100–1000 nm na Obr. 24, ale také daleko větší index polydisperzity v Tab. 1. Nejnižší PDI má pak vzorek 1:10. Na základě těchto výsledků společně s výsledky UV-Vis lze vyvodit závěr, že nejvhodnějším množstvím citrátu pro stabilizaci AuNPs je látkové množství 10x větší než zlata. Že se jedná o závěr správný, dokazuje také Příloha 1, ve které se nacházejí vzorky vyfocené po půl roce od jejich syntézy. Z tohoto důvodu jsou veškeré experimenty popsané dále v rámci této diplomové práce uskutečněny s AuNPs stabilizovanými právě poměrem látkového množství 1:10. Snahou však je připravit AuNPs o menší velikosti částic a především s daleko nižší polydisperzitou, než měly AuNPs v tomto experimentu.

Tab. 1: Velikost a polydisperzita jednotlivých vzorků

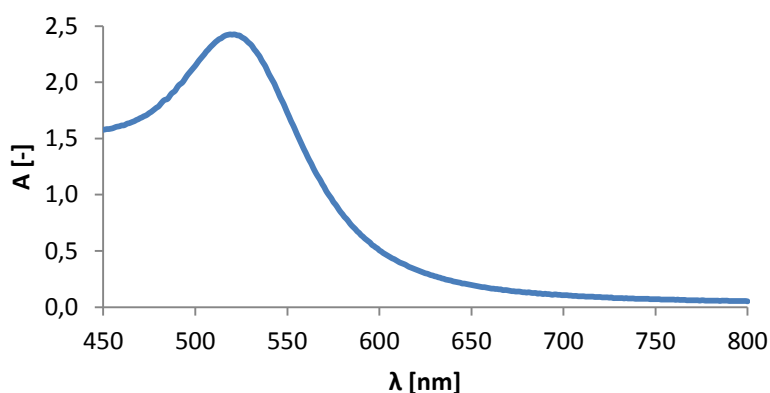
	velikost [d. nm]	σ [nm]	PDI [-]	σ [-]
1:3	37,56	0,88	0,65	0,05
1:6	21,10	0,42	0,36	0,02
1:10	22,00	0,77	0,27	0,06
1:20	24,70	1,67	0,28	0,02

V Tab. 2 si pak lze povšimnout, že s přibývajícím množstvím citrátu sodného roste hodnota pH vzorků. Jelikož je roztok citrátu sodného slabě alkalický, je nárůst pH s jeho přibývajícím množstvím logický. Je však nutné uvažovat, že i hodnota pH bude stabilitu AuNPs ovlivňovat. Proto tento vliv bude dále v experimentální části také studován.

Tab. 2: pH jednotlivých vzorků

Au:cit. [nmol]	pH [-]	σ [-]
1:3	4,84	0,02
1:6	5,74	0,04
1:10	6,16	0,02
1:20	6,70	0,03

3.1.3.3 Charakterizace AuNPs připravených pro další experimenty: UV-Vis



Obr. 25: Absorpční spektrum připravených AuNPs

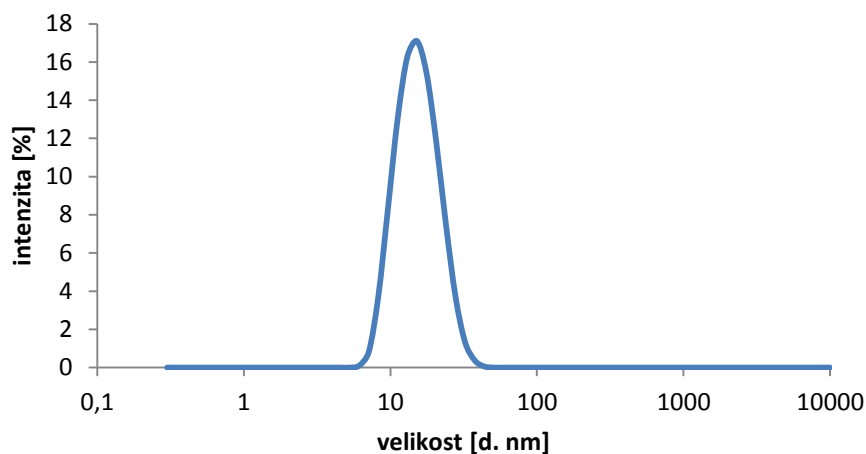
Z tvaru absorpčního spektra na Obr. 25 je vidět, že připravené AuNPs neobsahují agregáty. Pokud by agregáty byly přítomny, došlo by k nárůstu absorbance v rozmezí vlnových délek 600–800 nm. Na základě absorpčního spektra byla dle zdroje [45] určena velikost a koncentrace připravených AuNPs. Pro výpočet velikosti bylo nutné znát hodnotu absorbance v absorpčním maximu spektra AuNPs a koncentraci pracovního roztoku zlata. Výpočet koncentrace pracovního roztoku zlata je blíže popsán v kapitole 3.1.3.7. Pro výpočet koncentrace AuNPs pak bylo nutné znát hodnotu absorbance při 450 nm. Všechny tyto hodnoty zachycuje následující Tab. 3.

Tab. 3: Hodnoty nutné pro výpočet velikosti a koncentrace AuNPs

$A_{\lambda_{\max}}$ [-]	$A_{450\text{nm}}$ [-]	c_{Au} [mol/L]
2,43	1,59	$7,18 \cdot 10^{-4}$

Velikost AuNPs byla stanovena na $(14,19 \pm 0,85)$ nm a koncentrace na $(5,23 \pm 0,31) \cdot 10^{12}$ částic/ml.

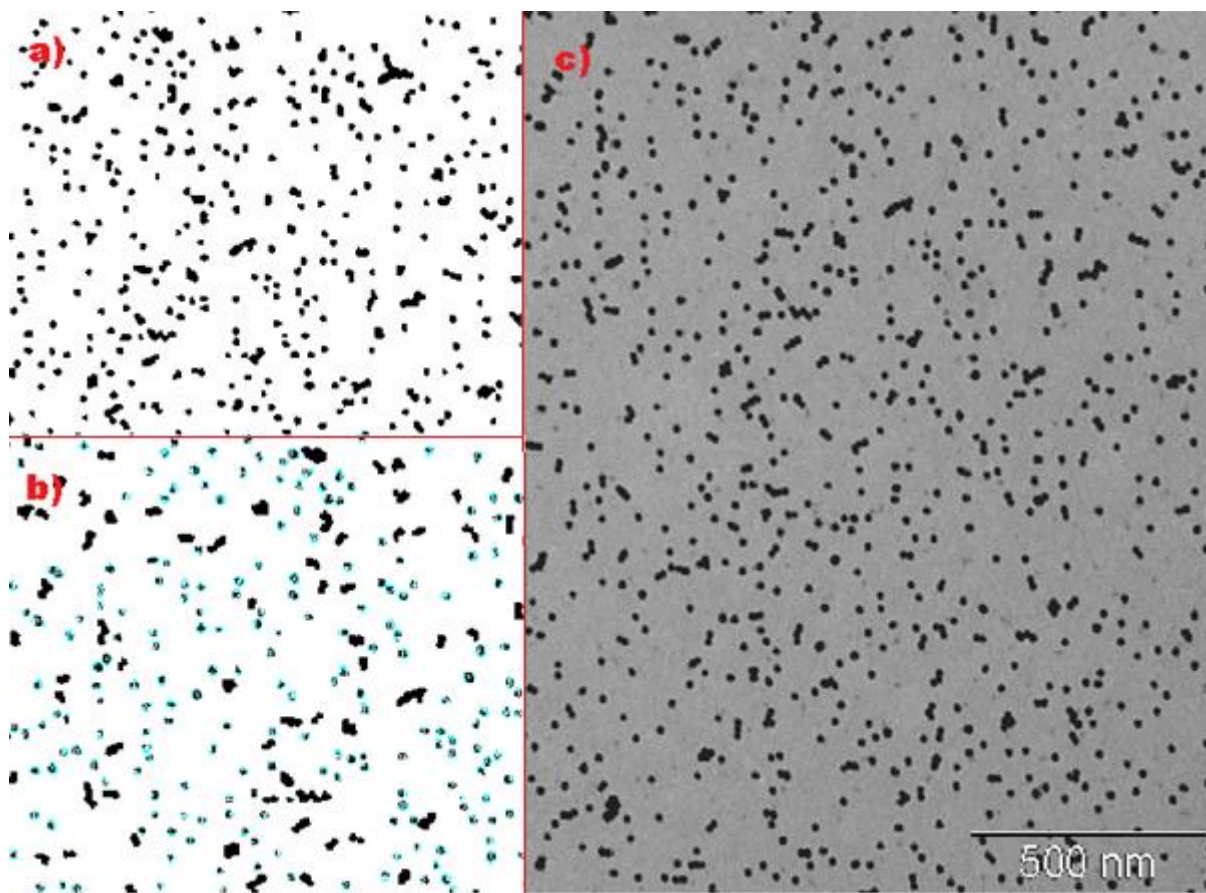
3.1.3.4 Charakterizace AuNPs připravených pro další experimenty: DLS



Obr. 26: Distribuce dle intenzity

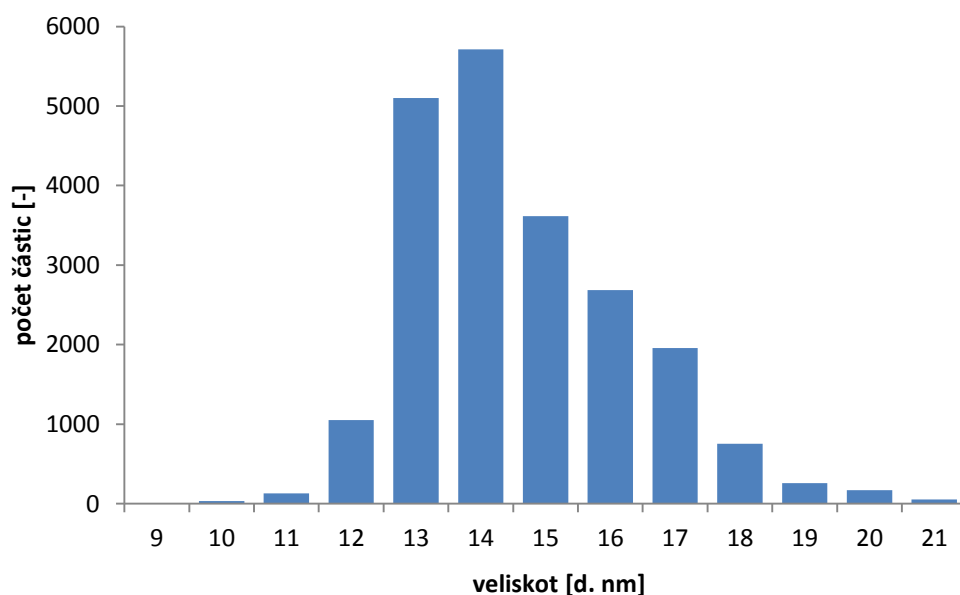
Obr. 26 potvrzuje, že připravené AuNPs jsou bez znatelné přítomnosti agregátů z důvodu přítomnosti pouze jednoho píku intenzitní distribuce velikosti částic. Hodnota PDI je pak $0,11 \pm 0,03$. Podařilo se tedy připravit AuNPs s daleko menší polydisperzitou než v experimentu optimalizace. Díky tomu je umožněno daleko snadnější interpretování výsledků v následujících experimentech modifikace AuNPs. Pomocí MADLS byla velikost AuNPs určena na $(14,37 \pm 0,31)$ nm a koncentrace na $(4,31 \pm 0,52) \cdot 10^{12}$ částic/ml.

3.1.3.5 Charakterizace AuNPs připravených pro další experimenty: TEM



Obr. 27: Snímek zachycující AuNPs z TEM: a) upravené pozadí pro stanovení velikosti pomocí programu ImageJ; b) obrázek po provedení stanovení; c) původní foto z TEM

Obr. 27 c) představuje původní snímek z TEM, kde jsou zachyceny připravené AuNPs. Obr. 27 a) je pak původní snímek z TEM upravený pro stanovení velikosti AuNPs pomocí programu ImageJ/Fiji, kde bylo nutné upravit snímek tak, aby bylo docíleno maximálního kontrastu mezi nanočásticemi a pozadím. Na Obr. 27 c) pak modře značené nanočástice představují AuNPs, ze kterých byla počítána velikost. Je vidět, že velikost byla určena pouze ze samostatných AuNPs, aglomeráty částic do výpočtu zahrnuty nebyly. Zároveň bylo nutné zajistit, aby pro výpočet velikosti byly použity snímky z TEM, kde se vyskytuje co největší počet částic. Toho bylo docíleno modifikací TEM mřížky pomocí APDMES (3-Aminopropylmethyl-diethoxysilan), kdy kladný náboj aminoskupiny dané sloučeniny přitahuje záporně nabitě nanočástice. Průměrná velikost připravených AuNPs byla stanovena z celkového počtu 21 530 částic pomocí protokolu uvedeného ve zdroji [46] a činí $(15,04 \pm 1,72)$ nm. Obr. 28 zachycuje rozložení četnosti AuNPs dle jejich velikosti. Velikost připravených AuNPs se tedy pohybovala od 9 do 21 nm, kdy nejvíce AuNPs má velikost mezi 14 a 15 nm.



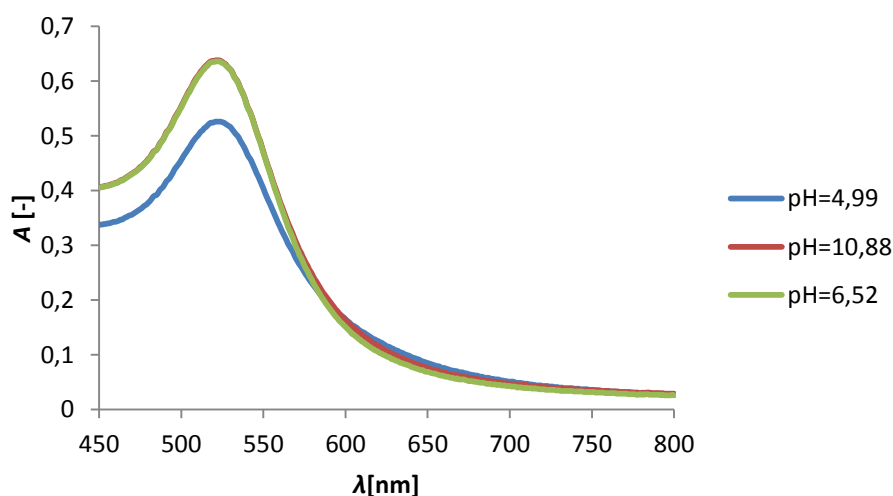
Obr. 28: Rozložení četnosti AuNPs dle velikosti

Tab. 4: Velikost AuNPs určená pomocí jednotlivých metod

metoda	velikost [d. nm]	koncentrace
UV-VIS	$14,19 \pm 0,85$	$(5,23 \pm 0,31) \cdot 10^{12}$
TEM	$15,04 \pm 1,72$	–
MADLS	$14,37 \pm 0,31$	$(4,31 \pm 0,52) \cdot 10^{12}$

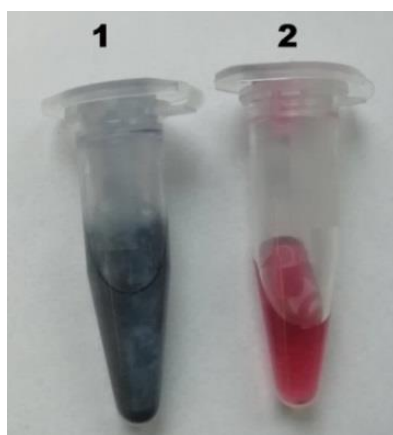
Tab. 4 zachycuje velikost AuNPs stanovenou pomocí jednotlivých metod. Velikost stanovená z UV-Vis byla vypočítána z empiricky odvozeného vzorce, velikost určená pomocí DLS pak představuje hydrodynamický průměr. Nejblíže realitě by tak měla být velikost daná metodou TEM, která se od velikosti z UV-Vis liší o 6 % a DLS o 5 %. Výsledky jednotlivých metod si jsou tedy poměrně blízké. U stanovení velikosti pomocí metody TEM však mohly případné nepřesnosti být způsobeny upravováním snímků v aplikaci Image/Fiji. Navíc se jedná o aritmetický průměr velikostí 21 530 částic, kdy se jejich velikost pohybovala zhruba od 9 do 21 nm. Z důvodu takto velkého rozpětí velikostí je také směrodatná odchylka velikosti poměrně velká na rozdíl od ostatních metod.

3.1.3.6 Charakterizace AuNPs připravených pro další experimenty: vliv pH



Obr. 29: Absorpční spektra vzorků v závislosti na pH

Vliv pH na stabilitu připravených nanočástic zachycuje Obr. 29, ze kterého je patrné, že nízká hodnota pH částice destabilizuje. Tato destabilizace se projevuje poklesem absorpčního maxima vzorku a změnou jeho barvy, kdy modrá barva je dána přítomností agregátů. Rozdíl v barvě vzorků je pak zachycen na následujícím Obr. 30. Nepříznivý vliv nízkého pH na stabilitu AuNPs je pravděpodobně způsobený tím, že nízké pH potlačuje disociaci karboxylových skupin citrátu, čímž dochází ke snížení záporného náboje, který nanočástice elektrostaticky stabilizuje.

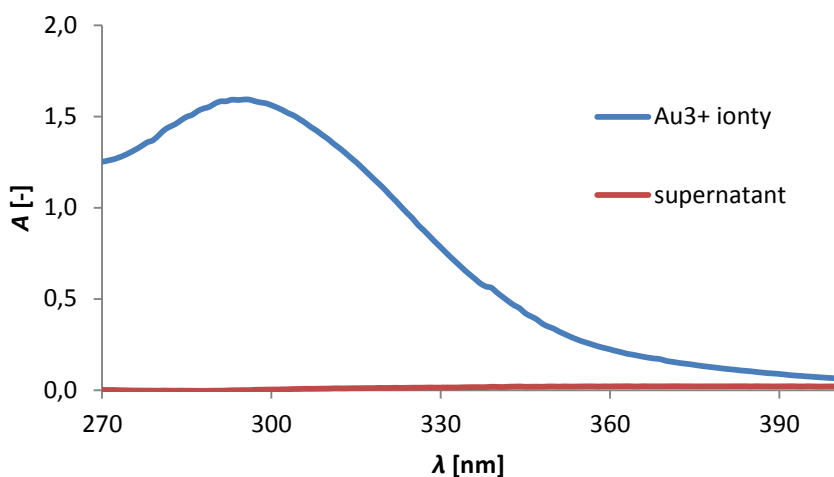


Obr. 30: Vliv pH na stabilitu AuNPs: zkumavka č.1 AuNPs v HCl; zkumavka č. 2 v NaOH

3.1.3.7 Charakterizace pracovního roztoku zlata a důkaz kvantitativní reakce

Z Obr. 31, kde modrá křivka znázorňuje absorpční spektrum Au^{3+} iontů v pracovním roztoku zlata, je patrné, že absorpční maximum odpovídá vlnové délce 290 nm. Na základě Lambert-Beerova zákona a hodnoty absorbance a molárního extinkčního koeficientu při 290 nm byla stanovena přesná koncentrace pracovního roztoku zlata na 0,718 mM. Podrobný postup stanovení je pak uveden viz Příloha 2.

Z Obr. 31 je patrná minimální absorpce roztoku supernatantu (červená křivka) indikující spotřebu veškerých Au^{3+} při reakci mezi tetrachlorzlatitou kyselinou a citrátem sodným. Reakce tedy proběhla kvantitativně.



Obr. 31: Absorpční spektrum Au^{3+} iontů

3.2 Povrchová modifikace připravených AuNPs pomocí mPEG-SH

3.2.1 Materiál

Methoxypoly(ethylenglykol)2000-thiol	Nanosoft Biotechnology LLC, USA
Dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného	Penta, ČR
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	Serva, Německo
Agaróza	Serva, Německo
Chlorid sodný	Penta, ČR
Glycerol 86%	Carl Roth, Německo
TRIS	Serva, Německo
Kyselina octová	Penta, ČR
Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich, USA

3.2.2 Metody

3.2.2.1 Příprava roztoků

Příprava zásobního 1mM roztoku mPEG-SH

Na analytických vahách (Ohaus Explorer Analytical, USA) byly naváženy 2 mg mPEG-SH. Navážka byla rozpuštěna v 1 ml Mili-Q vody.

Příprava zásobního 10x koncentrovaného roztoku TAE pufru

Na váze KERN 440 (Fisher Scientific, USA) bylo naváženo 48,46 g TRIS; 12,01 g ledové kyseliny octové a 3,72 g Na₂EDTA. Navážky byly rozpuštěny v Mili-Q vodě a doplněny na konečný objem 1000 ml. Pufr byl přefiltrován přes 0,2 µm filtr.

Příprava pracovního roztoku TAE pufru

100 ml 10x konc. TAE pufru bylo zředěno Mili-Q vodou na objem 1000 ml.

Příprava 0,5% roztoku agarózy

Bylo naváženo (KERN 440, Fisher Scientific, USA) 0,25 g agarózy. Navážka byla rozpuštěna v 50 ml TAE pufru.

Příprava 2M roztoku NaCl

Bylo naváženo (KERN 440, Fisher Scientific, USA) 4,67 g NaCl. Navážka byla rozpuštěna v 40 ml Mili-Q vody. Roztok byl přefiltrován přes 0,2 µm filtr.

3.2.2.2 Modifikace AuNPs pomocí mPEG-SH

Do 9 centrifugačních zkumavek byl napipetován 1 ml suspenze připravených AuNPs. Do 9 zkumavek Eppendorf bylo napipetováno takové množství zásobního roztoku mPEG-SH, aby jeho výsledná koncentrace odpovídala 10; 20; 30; 40; 50; 100; 200; 300 a 400 nmol na 1 mg Au. Poté byly všechny zkumavky na 30 minut vloženy do ledové lázně. Následně byly roztoky mPEG-SH za stálého míchání přidány k jednotlivým alikvótům suspenze AuNPs.

3.2.2.3 Agarózová elektroforéza

Vzorky na ELFO byly připraveny tak, že z jednotlivých alikvótů modifikovaných mPEG-SH bylo do zkumavky Eppendorf odpipetováno 250 μ l a doplněno TAE pufrem na konečný objem 1 ml. Poté byly vzorky stočeny v centrifuze (Eppendorf 5430, Německo) při 30 000 ot./min po dobu 20 minut. Následovalo odebrání 900 μ l supernatantu, doplnění TAE pufrem na 1 ml, rozsuspendování sedimentu na vortexu a opětovné stočení. Každý vzorek byl tímto způsobem promyt celkem třikrát. Po poslední centrifugaci bylo odebráno co největší množství supernatantu a ke každému vzorku byly přidány 3 μ l glycerolu. Následně bylo 5 μ l každého vzorku dáno do jamky agarózového gelu a byla provedena elektroforéza při 70 mV po dobu 90 minut (Labtron LHES-A10, UK)

Gel na elektroforézu byl připraven nalitím 0,5% roztoku agarózy do formy na gel tak, aby výška gelu byla zhruba 1 mm, a jeho následným ztuhnutím.

3.2.2.4 UV-Vis

Na mikrotitrační destičku bylo do dvou řad napipetováno 100 μ l každého modifikovaného alikvótu. U druhé řady bylo ke každému alikvótu přidáno 100 μ l 2 M zásobního roztoku NaCl. Poté byla mikrotitrační destička vložena do chladničky a následující den bylo u každého vzorku proměřeno absorpční spektrum v rozmezí vlnových délek 450–800 nm na přístroji Synergy 2 (BioTek, USA) proti vodě.

3.2.2.5 DLS

Do nízkoobjemové plastové kyvety ZEN0040 bylo z každého modifikovaného alikvótu odpipetováno 100 μ l a byla změřena velikost na přístroji Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd, UK). Tímto způsobem byla velikost u každého alikvótu změřena třikrát. Výsledné velikosti i grafy jsou pak průměrem z těchto tří měření.

3.2.2.6 Vliv pH

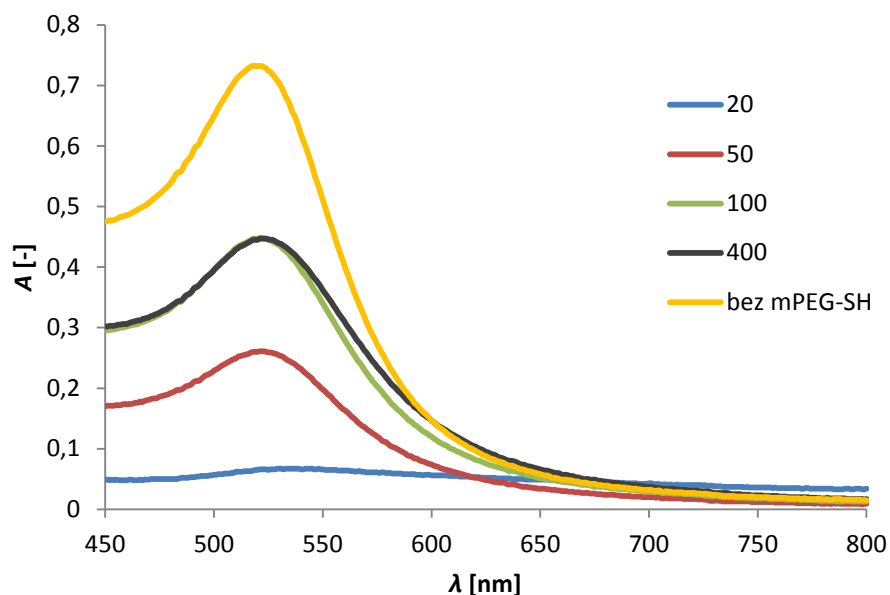
U jednotlivých vzorků byla stanovena hodnota pH jakožto aritmetický průměr ze tří měření pomocí Mini pH metru (Beckman Φ 110 ISFET, USA).

3.2.2.7 Kinetika povrchové modifikace AuNPs mPEG-SH

Do plastové kyvety DTS0012 bylo odpipetováno 1,5 ml suspenze AuNPs a přidáno míchadlo. Poté byla na přístroji UVIKON XL (BioTek, USA) zapnuta funkce Time-drive a měřena absorbance při 550 nm po dobu 30 min. Po ustálení absorbance bylo zhruba v 2. minutě měření za stálého míchání přidáno 20; 100 a 400 nmol mPEG-SH na 1 mg Au.

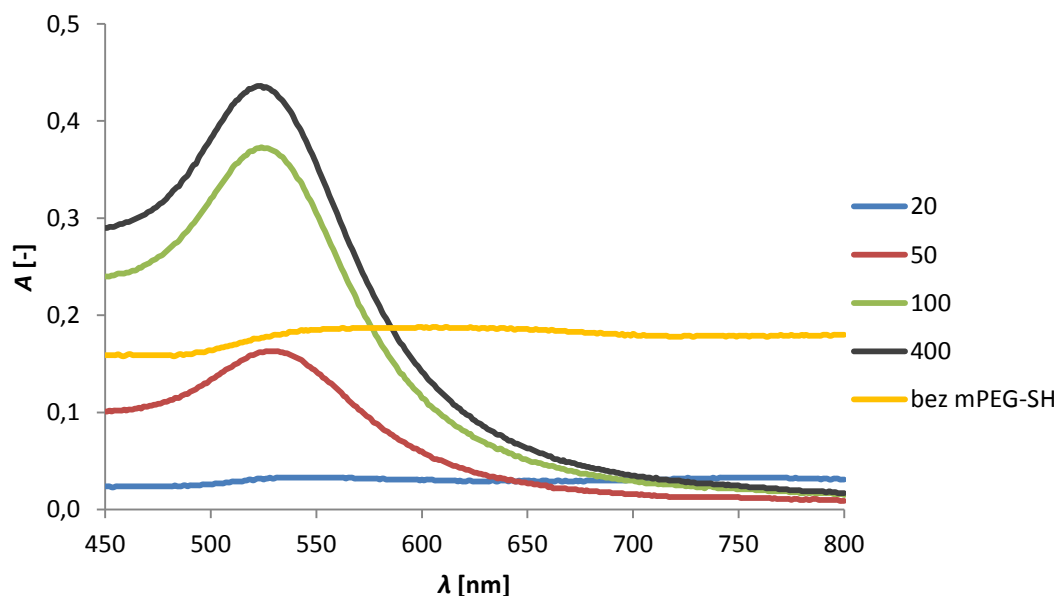
3.2.3 Výsledky

3.2.3.1 UV-Vis



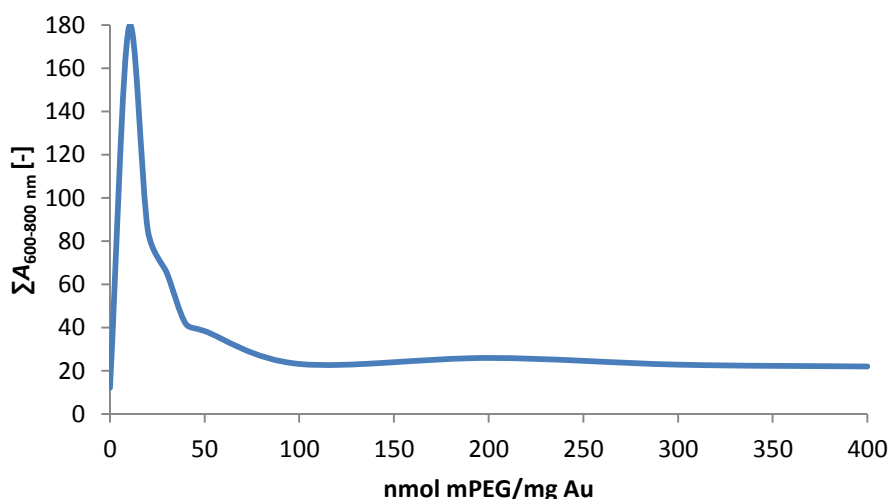
Obr. 32: Absorpční spektra AuNPs po modifikaci (čísla u křivek reprezentují hodnoty koncentrace nmol mPEG/mg Au)

Ze spekter jednotlivých vzorků na Obr. 32 je vidět, že s rostoucím množstvím mPEG-SH roste intenzita absorpčního maxima. Zatímco vzorky modifikované 100–400 nmol mPEG-SH na 1 mg Au mají intenzitu absorpčního maxima přibližně stejnou, vzorky modifikované 50 nmol a méně mají intenzitu absorpčního maxima značně nižší. To je pravděpodobně způsobeno tím, že u těchto vzorků došlo během modifikace k jejich výraznému vysrážení, jak je ukázáno na Obr. 36. Vysrážením AuNPs pak rapidně klesl počet nanočástic schopných absorpce, což se projevilo snížením hodnoty absorpčního maxima.



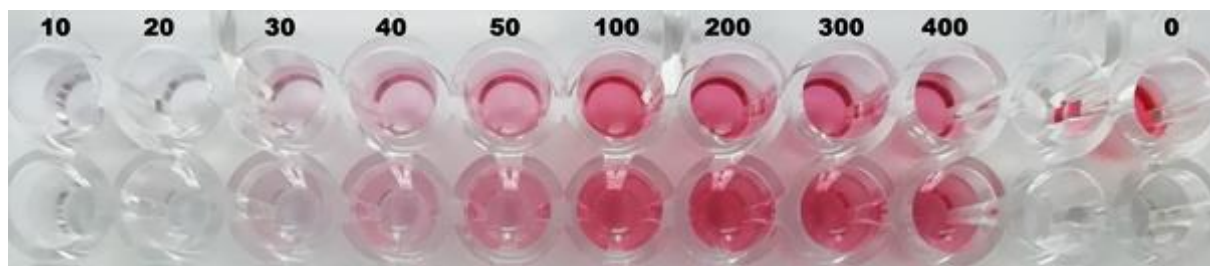
Obr. 33: Absorpční spektra AuNPs po modifikaci v prostředí 1 M NaCl (čísla u křivek reprezentují hodnoty koncentrace nmol mPEG/mg Au)

Na Obr. 33 je opět vidět velký rozdíl mezi intenzitami absorpčních maxim vzorků 10–50 nmol a vzorků 100–400 nmol. Také si lze povšimnout, že spektra u vzorků 10–30 nmol jsou tvořena pouze „přímkou“, čili lze usuzovat, že vlivem vysoké iontové síly 1 M roztoku NaCl došlo k jejich agregaci. Největší vliv iontové síly 1 M roztoku NaCl je pak vidět u vzorku AuNPs bez mPEG–SH, kde došlo k jeho vysrážení. Důvodem je to, že tento vzorek je stabilizovaný pouze elektrostaticky odpudivými interakcemi mezi záporně nabitými skupinami citrátu, kdežto vzorky modifikované mPEG–SH jsou stabilizovány stericly. Zvýšením iontové síly je pak velikost odpudivých sil mezi citrátem daleko nižší.



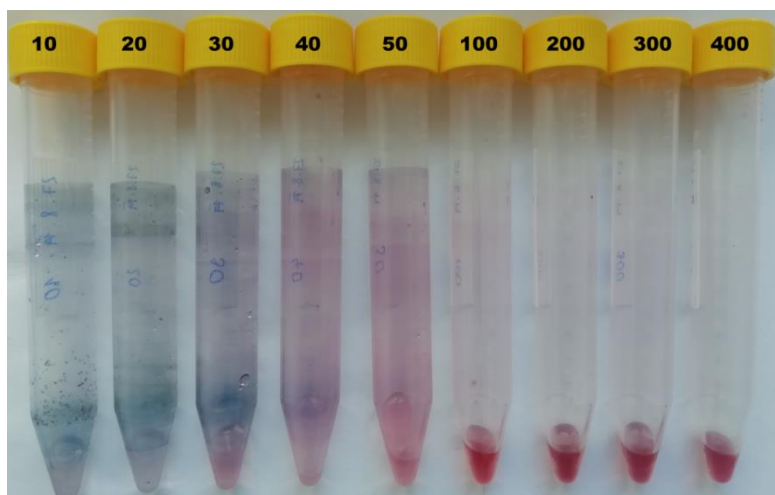
Obr. 34: Hodnoty integrace plochy pod křivkou v intervalu 600–800 nm po normalizaci spekter

Obr. 34 zachycuje hodnoty integrace plochy pod křivkou absorpčních spekter v rozmezí vlnových délek 600–800 nm po jejich normalizaci. Z obrázku je vidět, že s přibývajícím množstvím mPEG–SH množství agregátů klesá, kdy od hodnoty 100 nmol/mg Au zůstává přibližně konstantní. Lze tedy předpokládat, že dostatečným množstvím pro stabilizaci AuNPs je 100 nmol mPEG–SH na 1 mg Au.



Obr. 35: Modifikované vzorky na mikrotitrační destičce: 1. řada – samostatné vzorky; 2. řada – vzorky v prostředí 1 M NaCl (čísla nad jamkami reprezentují hodnoty koncentrace nmol mPEG/mg Au)

Obr. 35 zachycuje vzorky na mikrotitrační destičce před UV-Vis analýzou. V první řadě mikrotitrační destičky jsou vzorky samostatně, ve druhé pak v prostředí 1M NaCl. Zde je dobře vidět, jak různé množství mPEG–SH ovlivňuje barvu vzorků. Obecně platí, že s rostoucími rozměry AuNPs se barva suspenze vlivem SPR mění z červené, přes fialovou a modrou až do úplného odbarvení. Téměř bezbarvé jsou vzorky modifikované 10 a 20 nmol mPEG–SH. Tak lze jen na základě barvy usuzovat, že tyto vzorky jsou oproti ostatním méně koloidně stabilní. Vzorky 30–50 nmol mají barvu fialovější, s rostoucím množstvím mPEG–SH je pak tato barva sytější. To opět poukazuje na fakt, že se s rostoucím látkovým množstvím mPEG–SH tendence k agregaci klesá. Vzorky 100–400 nmol pak mají barvu červenou, zde by tedy agregátů mělo být nejméně. Největší vliv iontové síly 1 M roztoku NaCl je znát u nedomifikovaných AuNPs, kde došlo k úplnému odbarvení suspenze vlivem vysrážení nanočástic. Tyto předpoklady dané barvou vzorků pak korelují s ostatními výsledky.

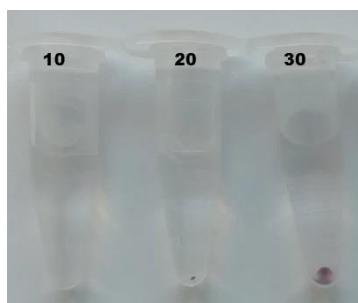


Obr. 36: Centrifugační zkumavky den po provedení modifikace (čísla nad zkumavkami reprezentují hodnoty koncentrace nmol mPEG/mg Au)

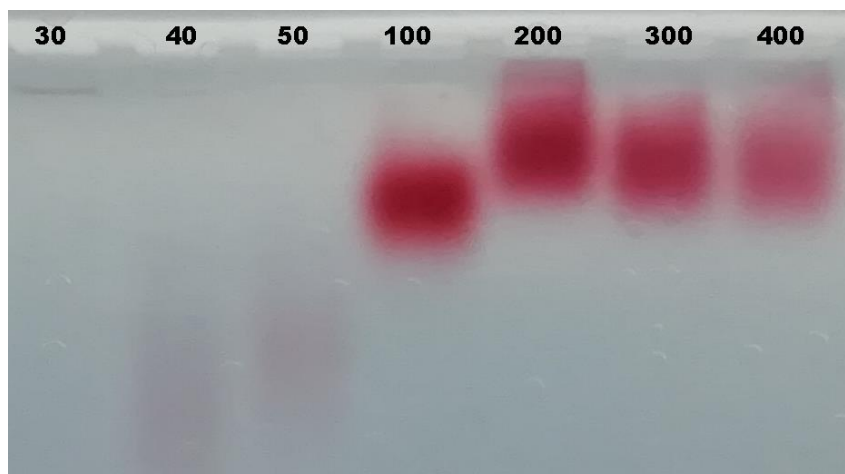
Na tomto obrázku je zřetelně vidět, že u modifikace 10–50 nmol mPEG–SH došlo k vysrážení AuNPs na stěnách zkumavek. To se následně projevilo na nižších hodnotách absorpčních maxim těchto vzorků. Dále je opět vidět rozdílná barva jednotlivých vzorků, kdy s rostoucím množstvím mPEG–SH se barva mění z modré, přes fialovou na sytější červenou. Na základě dosavadních výsledků lze tedy usuzovat, že AuNPs jsou dostatečně stabilizovány od 100 nmol mPEG–SH na 1 mg Au. Tento předpoklad potvrzuje i Příloha 3, ve které jsou zachyceny AuNPs měsíc po modifikaci.

3.2.3.2 Elektroforéza

Následující Obr. 37 zachycuje vzorky po provedení první centrifugace. Jak bylo vidět již na Obr. 36, během modifikace došlo k výraznému vysrážení nanočástic u vzorků 10–30 nmol mPEG–SH. Nejvíce pak u vzorku 10 nmol, proto po centrifugaci nebyl ve zkumavce Eppendorf patrný žádný sediment tvořený nanočásticemi. U vzorku s 20 nmol pak bylo nanočástic už více, ale jelikož byly stále velice nestabilní, vysrážely se v podobě malé černé tečky na dně zkumavky. Až od vzorku modifikovaného 30 nmol se stabilita AuNPs vlivem jednotlivých centrifugačních kroků nezměnila. Proto byla ELFO provedena se vzorky až od tohoto látkového množství.



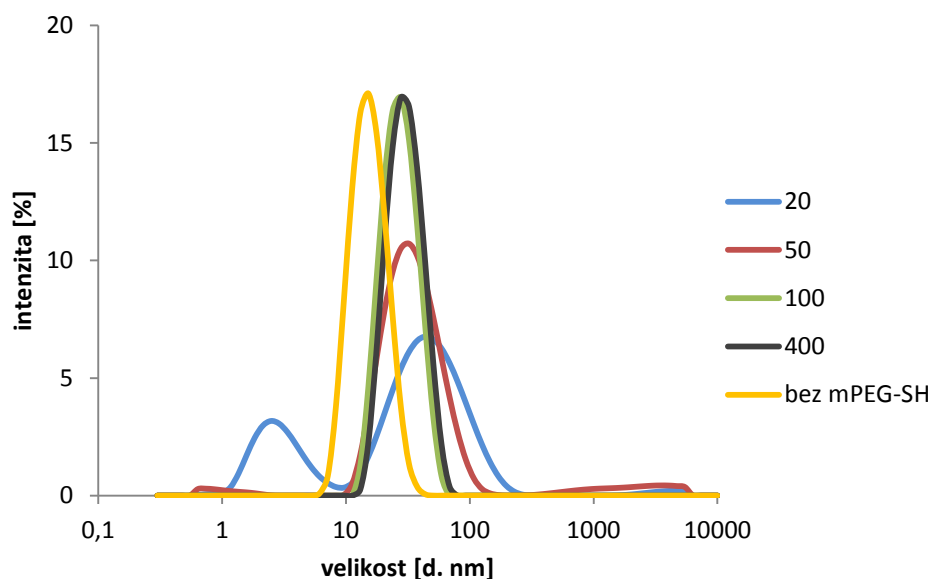
Obr. 37: Rozdíl ve stabilitě vzorků po první centrifugaci (čísla nad zkumavkami reprezentují hodnoty koncentrace nmol mPEG/mg Au)



Obr. 38: Detail gelu po provedení elektroforézy (čísla nad bandy reprezentují hodnoty koncentrace nmol mPEG/mg Au)

Z důvodu vysrážení velkého množství částic při modifikaci AuNPs 30–50 nmol mPEG–SH jsou bandy v gelu reprezentující tyto vzorky velmi špatně viditelné (viz Obr. 38). Dále jsou tyto bandy v gelu velice roztažené, což vypovídá o vysoké polydisperzitě vzorků. U vzorku 30 nmol je navíc patrná černá čára ve startovací jamce, která je pravděpodobně tvořená agregáty AuNPs, jejichž velikost byla na průchod póry gelu příliš velká. Je však patrné, že s rostoucím množstvím mPEG–SH se vzorky pohybují menší rychlostí. To je způsobeno tím, že molekuly mPEG–SH mají neutrální náboj a čím více je povrch AuNPs jimi saturován, tím jsou AuNPs méně záporné a mají menší elektroforetickou mobilitu. Povrch AuNPs modifikovaných 100–400 nmol je pak saturován daleko více než u vzorků modifikovaných menším množstvím, proto se tyto vzorky pohybují gelem daleko pomaleji

3.2.3.3 DLS



Obr. 39: Distribuce dle intenzity (čísla u křivek reprezentují hodnoty koncentrace nmol mPEG/mg Au)

Z výsledků DLS je opět jasně vidět, že dostatečné množství mPEG–SH pro stabilizaci AuNPs je až od 100 nmol na 1 mg Au. Vzorky modifikované menším množstvím mPEG–SH obsahují agregáty, což se v intenzitním spektru projevuje zhoršenou distribucí. O daleko větší polydisperzité těchto vzorků vypovídají i vysoké hodnoty PDI v následující Tab. 5. Z důvodu vysoké polydisperzity těchto vzorků pak nelze hodnoty velikostí v Tab. 5 považovat za relevantní. Velikost nanočástic vyjádřená jako Z-average uvedená v této tabulce nejlépe odpovídá skutečnosti u vzorků s nízkou polydisperzitou. Nízkou polydisperzitu vykazují vzorky 100–400 nmol. U těch si lze také povšimnout, že s rostoucím množstvím mPEG–SH roste i jejich velikost. To je pravděpodobně způsobeno tím, že čím více molekul mPEG–SH je na povrchu AuNPs navázaných, tím více molekul mPEG–SH má „natažený“ řetězec, a dochází tedy ke změně konformace z „mushroom“ do „brush“. Dále je u všech modifikovaných vzorků oproti nemodifikovaným AuNPs patrný posun píků k větším velikostem způsobený navázáním molekul mPEG–SH na jejich povrch.

Tab. 5: Velikost a polydisperzita vzorků včetně směrodatných odchylek

mPEG–SH [nmol/mg Au]	velikost [d. nm]	σ [nm]	PDI [-]	σ [-]
0	14,37	0,31	0,11	0,03
10	24,50	1,61	0,61	0,03
20	13,73	0,76	0,76	0,03
30	18,60	3,12	0,88	0,05
40	22,73	5,20	0,56	0,21
50	28,90	1,44	0,37	0,12
100	24,97	0,51	0,14	0,03
200	27,67	0,06	0,12	0,01
300	29,43	0,58	0,19	0,00
400	30,13	0,42	0,19	0,02

Z jednotlivých výsledků plyne, že dostatečným množstvím pro stabilizaci AuNPs je 100 nmol mPEG–SH/mg Au. Následující experimentální část je prováděna výhradně s AuNPs o daném poměru.

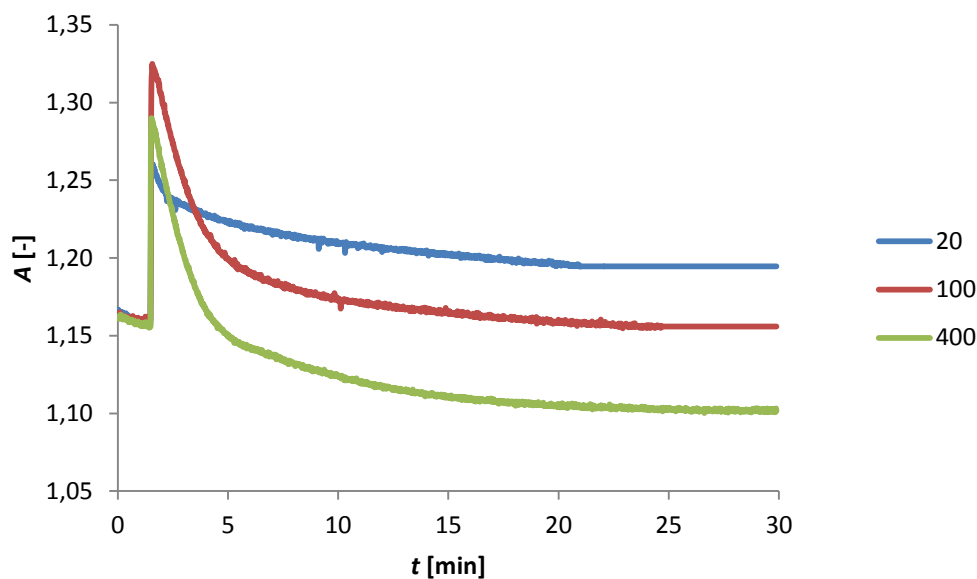
3.2.3.4 Vliv pH

Tab. 6: Závislost pH vzorků na množství mPEG-SH

mPEG-SH [nmol/mg Au]	pH [-]	σ [-]
0	6,52	0,00
10	6,47	0,02
20	6,45	0,02
30	6,37	0,01
40	6,34	0,01
50	6,36	0,02
100	6,35	0,00
200	6,33	0,01
300	6,33	0,00

Z dat uvedených v Tab. 6 je patrný minimální nárůst hodnoty pH s rostoucí koncentrací mPEG-SH. Oproti nemodifikovaným AuNPs kde, jak je popsáno výše, má pH výrazný vliv na stabilitu, u modifikovaných částic nebyl vliv koncentrace mPEG-SH na hodnotu pH znatelný.

3.2.3.5 Kinetika povrchové modifikace AuNPs mPEG-SH



Obr. 40: Kinetika povrchové modifikace AuNPs po přidání mPEG-SH (čísla u křivek reprezentují hodnoty koncentrace nmol mPEG/mg Au)

Z Obr. 40 zachycujícího kinetiku modifikace AuNPs je vidět, že po přidání mPEG-SH dochází nejprve k značnému nárůstu absorbance a následně jejímu poklesu. Tento nárůst by mohl být způsoben tvorbou agregátů a následný pokles absorbance pak jejich rozpadem. Při

modifikaci by mohlo hypoteticky docházet k tomu, že přídavek mPEG–SH způsobuje disociaci záporně nabitého citrátu z povrchu AuNPs. Tato disociace citrátu je pak daleko rychlejší než navázání mPEG–SH na povrch AuNPs, vlivem čehož se částice stávají velice nestabilní, a tak se tvoří agregáty. Že je disociace citrátu z povrchu AuNPs mnohem rychlejší než navázání molekul mPEG–SH by mohlo být vysvětleno tím, že citrátové anionty jsou mnohem menší, a proto z povrchu AuNPs difundují velice rychle, kdežto objemnější molekuly mPEG–SH difundují suspenzí pomaleji, a než se dostanou k povrchu AuNPs, aby mohlo dojít k jeho stabilizaci, vzniknou agregáty. Postupem času se však k povrchu AuNPs prodifunduje stále více molekul mPEG–SH, jejichž navázáním na povrch jsou nanočástice více stabilní a agregáty se postupně rozpadají, což by vysvětlovalo následný pokles absorbance. Po přidavku 20 nmol mPEG–SH se však nenachází ve vzorku tolik molekul PEG, jako u modifikace 100 a 400 nmol, částice tedy nejsou stabilizovány takovou mírou, a proto i pokles absorbance není tak značný jako po přidavku většího množství mPEG–SH. Zhruba po 10 minutách dochází k ustálení absorbance, proto lze předpokládat, že modifikace povrchu AuNPs mPEG–SH netrvá déle než tuto dobu.

3.2.4 Testy stability

3.2.4.1 Metody

pH stabilita

2 ml AuNPs modifikovaných 100 nmol mPEG–SH bylo zředěno Mili-Q vodou na konečný objem 10 ml. U takto zředěného vzorku byla měřena velikost částic v závislosti na pH v rozmezí pH 3–11. pH vzorku bylo upraveno přidavky 0,1 M HCl, 1 M HCl a 1 M NaOH pomocí automatického titrátoru. Experiment byl proveden na přístroji Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical Ltd, UK).

Teplotní stabilita

200 μ l AuNPs modifikovaných 100 nmol mPEG–SH bylo zředěno Mili-Q vodou na konečný objem 1 ml. U takto zředěného vzorku byla měřena velikost částic v závislosti na teplotě v rozmezí teplot 15–60 °C. Vzorek byl měřen v kyvetě ZEN40 na přístroji Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical Ltd, UK).

Stabilita v závislosti na iontové síle

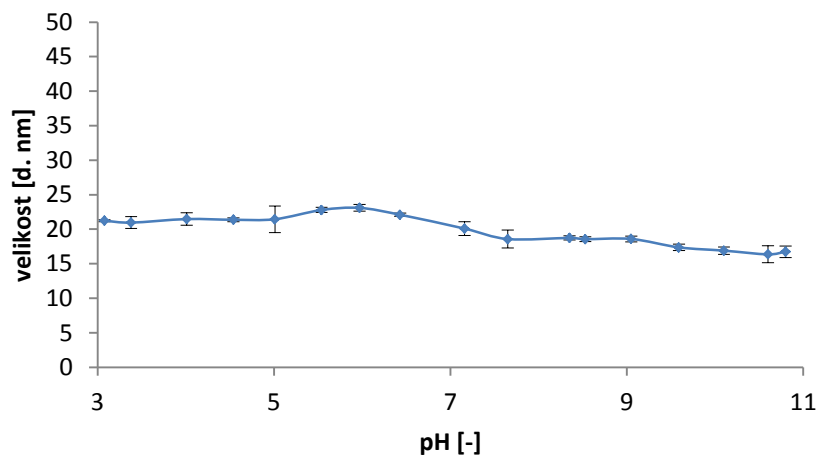
2 ml AuNPs modifikovaných 100 nmol mPEG–SH bylo zředěno Mili-Q vodou na konečný objem 10 ml. U takto zředěného vzorku byla měřena velikost částic v závislosti na koncentraci NaCl v rozmezí 0–1 M. Roztok 2 M NaCl byl ke vzorku přidáván pomocí automatického titrátoru. Experiment byl uskutečněn na přístroji Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical Ltd, UK).

Časová stabilita v 80% FBS

200 μ l AuNPs modifikovaných 100 nmol mPEG–SH bylo zředěno pomocí FBS na konečný objem 1 ml. U takto upraveného vzorku byla měřena absorpční spektra každou hodinu v rozmezí vlnových délek 450–800 nm po dobu 10 hodin. Jako blank bylo použito FBS. Vzorek byl měřen v kyvetě ZEN0040 na přístroji UVIKON XL (BioTek, USA).

3.2.4.2 Výsledky

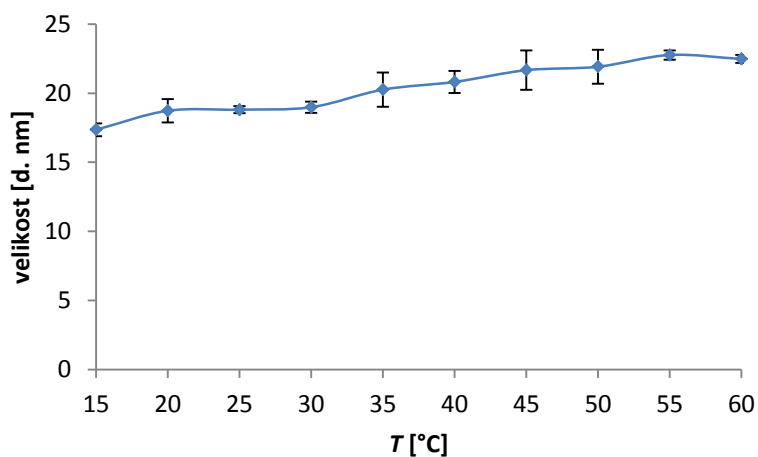
pH stabilita



Obr. 41: Závislost velikosti AuNPs na pH

Z Obr. 41 je vidět, že velikost AuNPs modifikovaných 100 nmol mPEG-SH se změnou pH zůstává přibližně stejná. Takto modifikované AuNPs jsou tedy v rozmezí hodnot pH 3–11 velikostně stabilní.

Teplotní stabilita

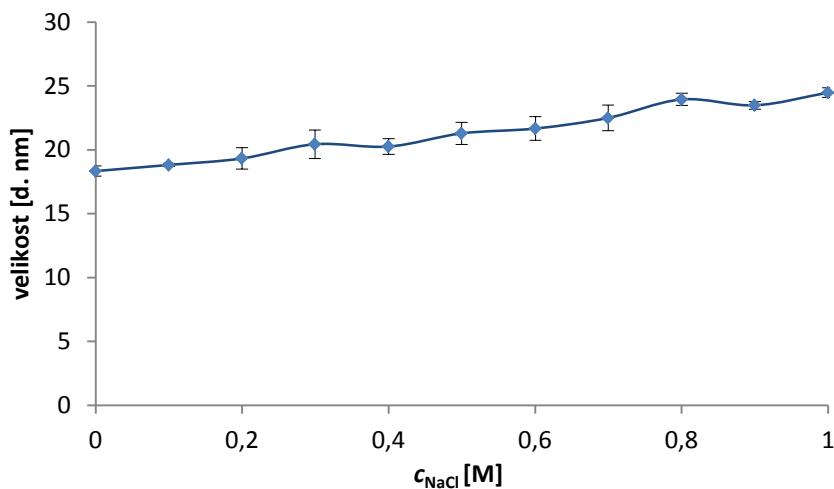


Obr.42: Závislost velikosti AuNPs na teplotě

Z Obr.42 je patrný trend, že s rostoucí teplotou velikost nanočástic mírně stoupá. Tento nárůst činí 5,2 nm v rozmezí 45°C a není tedy tak velký, aby byl způsobený tvorbou agregátů. Experiment byl zopakován také s polystyrenovým standardem o velikosti částic 50 nm, viz Příloha 4. U standardu také s rostoucí teplotou rostla velikost částic a to se stejnou směrnici lineární regrese jako u AuNPs. Nárůst je pravděpodobně způsoben souhrnem teplotní expanze

objemu nanočástic a teplotní změnou viskozity média, která neodpovídá tabelovaným údajům v databázi přístroje. AuNPs modifikované 100 nmol mPEG-SH lze tedy v rozmezí teplot 15–60°C považovat za stabilní.

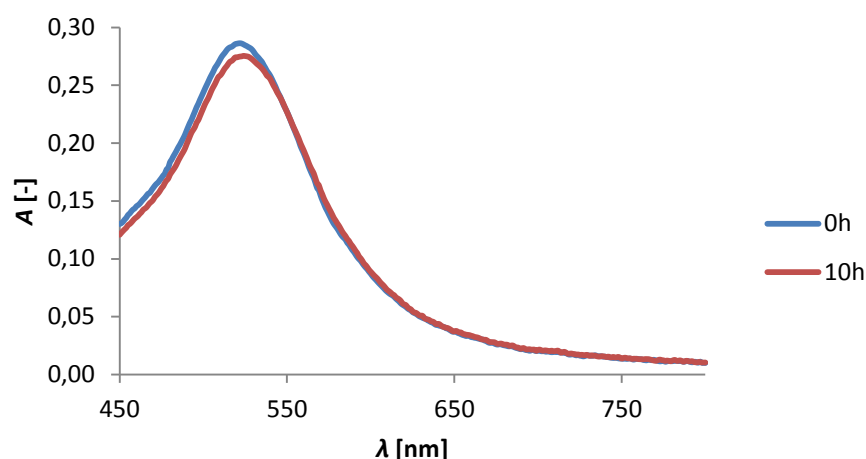
Stabilita v závislosti na iontové síle



Obr. 43: Závislost velikosti AuNPs na koncentraci NaCl

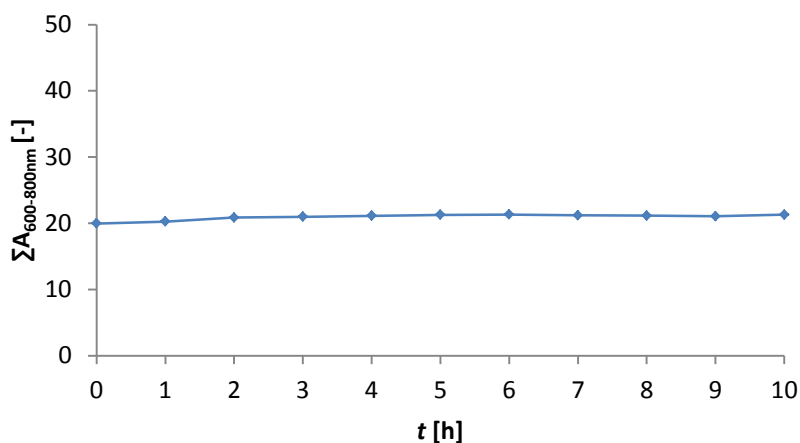
Na Obr. 43 je vidět, že s rostoucí iontovou silou mírně roste velikost částic. S přidávkou NaCl dochází k postupnému zvyšování viskozity vzorku, a tak se nanočástice s přidávkou NaCl pohybují suspenzí pomaleji. Přístroj je pak tedy může vyhodnocovat jako větší. Proto bylo nutné naměřené velikosti pro každý přírůstek NaCl upravit a provést korekci viskozity na odpovídající koncentraci NaCl ve vzorku. I přes tuto úpravu dat je však trend růstu stále patrný, jak je na Obr. 43 zachyceno. Mezi počáteční a koncovou koncentrací nárůst činí konkrétně 4,4 nm (před úpravou dat pak 6,1 nm). Takto malá změna velikosti nemůže ale být považována za důsledek tvorby agregátů ve vzorku. Pravděpodobně se jedná o přechod řetězců mPEG-SH z konformace „mushroom“ do „brush“. Tuto domněnku by potvrzovala i skutečnost, že zvýšené iontové síly se využívá při modifikaci planárních povrchů molekulami mPEG. To právě z toho důvodu, že vyšší iontová síla způsobí natažení řetězců molekul mPEG, vlivem čehož se ho na povrch materiálu naváže více, a modifikace je tak kvalitnější. [58] AuNPs modifikované 100 nmol mPEG-SH lze tedy v rozmezí koncentrace NaCl 0–1 M považovat za stabilní.

Časová stabilita v 80 % FBS séru



Obr. 44: Absorpční spektra AuNPs v 80% FBS po době 10 hodin

Z absorpčních spekter na Obr. 44 je vidět, že se tvar spekter po uplynutí 10 h nezměnil a došlo pouze k velmi mírnému poklesu intenzity absorpčního maxima. Tento pokles s největší pravděpodobností nesouvisí s tvorbou agregátů AuNPs. Pokud by se ve vzorku vytvořily agregáty, jejich přítomnost by se projevila nárůstem absorbance v intervalu vlnových délek 600–800 nm. Obr. 45, na kterém je v čase zachycena integrace plochy pod křivkou v tomto rozmezí vlnových délek po normalizaci spekter, ovšem dokazuje, že k nárůstu absorbance nedochází. Navíc pokud by povrch AuNPs nebyl dostatečně stéricky bráněn molekulami mPEG–SH, na povrch AuNPs by se navázaly molekuly proteinů ze séra a došlo by k vytvoření tzv. proteinové koróny. Tohoto jevu se využívá při pasivní modifikaci povrchu nanočástic kovů molekulami proteinů. Vytvoření proteinové koróny kolem nanočástic pak má za následek zvětšení jejich velikosti, což se v absorpčním spektru projevuje posunem absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám, jak je ukázáno v Příloha 5. [59] V tomto případě k posunu absorpčního maxima nedošlo, a proto jsou AuNPs modifikované 100 nmol mPEG–SH v 80 % FBS stabilní a dostatečně stéricky chráněny.

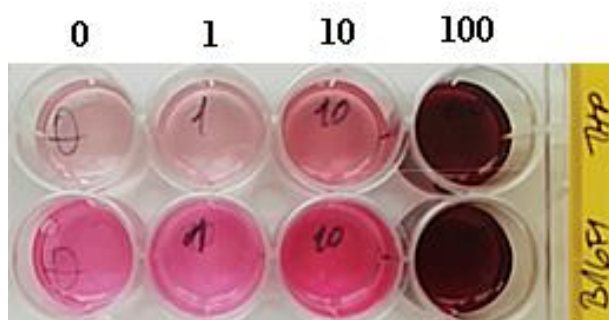


Obr. 45: Hodnoty integrace plochy pod křivkou v intervalu 600–800 nm po normalizaci spekter

3.2.5 Testy cytotoxicity

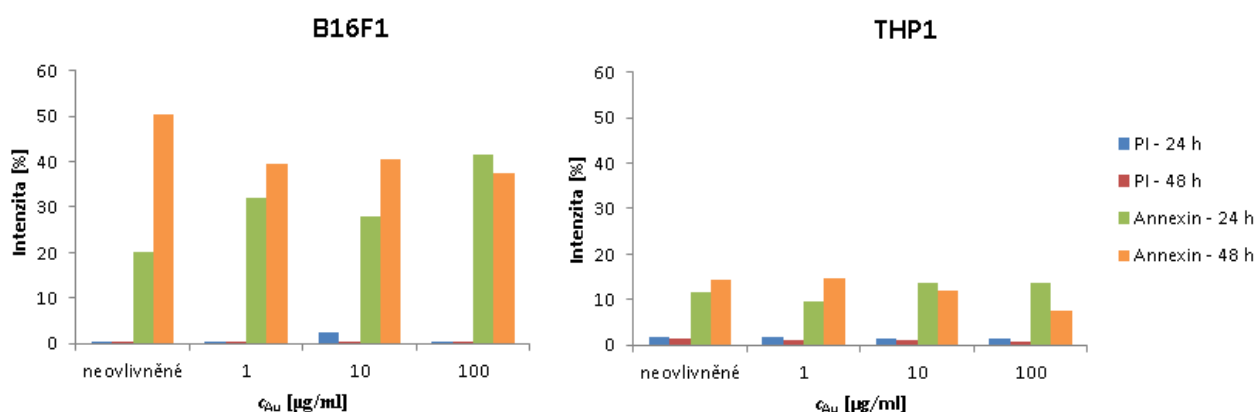
3.2.5.1 Metoda

AuNPs modifikované 100 nmol mPEG-SH byly 10x zakoncentrovány ultracentrifugací při 50 000 ot./min (Hermle Z200A, Hermle LaborTechnik GmbH, Německo) po dobu 1,5 h. Testy cytotoxicity byly stanoveny u dvou druhů buněk a to buněk B16F1 a THP1. K oběma typům buněk byly přidány zakoncentrované AuNPs tak, aby byly buňky vystaveny působení AuNPs o koncentraci 1; 10 a 100 $\mu\text{g Au/ml}$. Viabilita buněk byla stanovena metodou průtokové cytometrie na přístroji BD FACS LSR II Fortessa (Becton Dickinson) pomocí barvení propidiumjodidu, dále jen PI, (ThermoFisher Scientific) a Annexinu V konjugovaného s Alexa Fluor® 488 (Invitrogen). Viabilita se stanovovala po 24 a 48 h. Jako excitační a emisní maximum u PI byly použity vlnové délky 536 a 617 nm, u Annexinu V 495 a 519 nm. Pro kontrolu bylo měření provedeno i s buňkami neovlivněnými AuNPs.



Obr. 46: Titrační destička s buňkami po přidání modifikovaných AuNPs: 1. řada – THP1 buňky; 2. řada – B16F1 buňky (čísla nad jamkami reprezentují hodnoty koncentrace Au $\mu\text{g/ml}$)

3.2.5.2 Výsledky



Obr. 47: Viabilita buněk: modré sloupce – intenzita signálu PI změřená 24 h od přidání AuNPs; červené – intenzita signálu PI po 48 h; zelené – intenzita signálu Annexin V po 24 h; oranžové – intenzita signálu Annexin V po 48 h

Annexin V je fluorescenční barvivo vázající se na negativně nabitý fosfolipid fosfatidylserin. Tento fosfolipid se ve zdravých buňkách nachází na vnitřní straně plazmatické membrány. Proapoptotické signály však způsobují jeho rychlou externalizaci umožňující navázání Annexinu V. Jelikož buňky nekrotické váží Annexin V díky prasklé buněčné membráně stejně jako apoptotické, je nezbytné jejich současné značení PI, který se váže k nukleovým kyselinám. Apoptotické buňky jsou pak pozitivní na barvení Annexinem a negativní na barvení PI, zatímco nekrotické jsou pozitivní na obě barviva, protože PI se díky permeabilizované buněčné membráně dostane do nitra nekrotických buněk. [60]

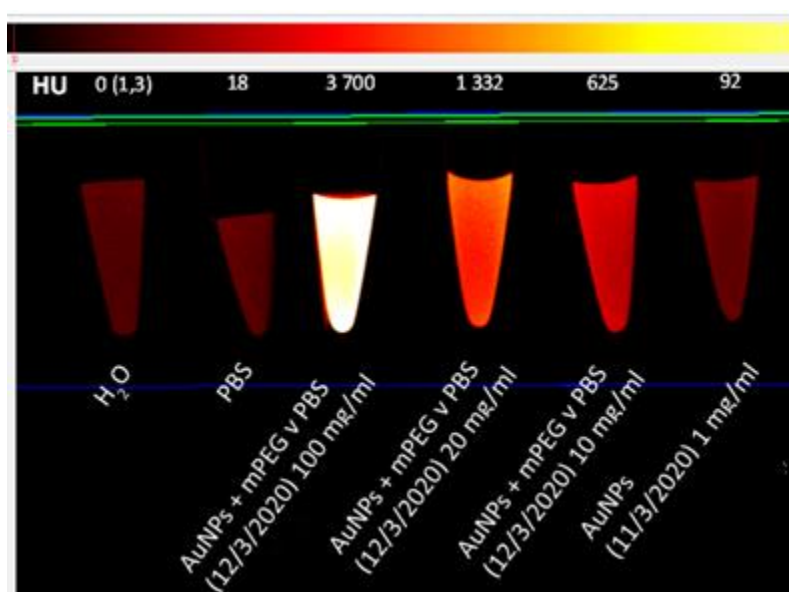
Z Obr. 47 zachycujícího viabilitu buněk je vidět, že intenzita fluorescence PI je u obou typů buněk minimální. Ve vzorcích tedy nejsou přítomny téměř žádné nekrotické buňky. Výsledky pak indikují, že daleko větší množství buněk se nachází ve stavu apoptózy. Jelikož intenzita fluorescence Annexinu V je zhruba stejná jak pro buňky ovlivněné AuNPs, tak buňky neovlivněné, lze předpokládat, že AuNPs nemají na viabilitu buněk vliv. To potvrzuje i fakt, že intenzita fluorescence je zhruba stejná i pro všechny použité koncentrace AuNPs a to jak po 24 tak i po 48 h. Na základě těchto výsledků a testů stability lze tedy předpokládat, že AuNPs modifikované mPEG jsou dostatečně stabilní a biokompatibilní bez výrazné cytotoxicity, a je tedy možná jejich *in vivo* aplikace.

3.2.6 Aplikace *in vivo*

3.2.6.1 Metody

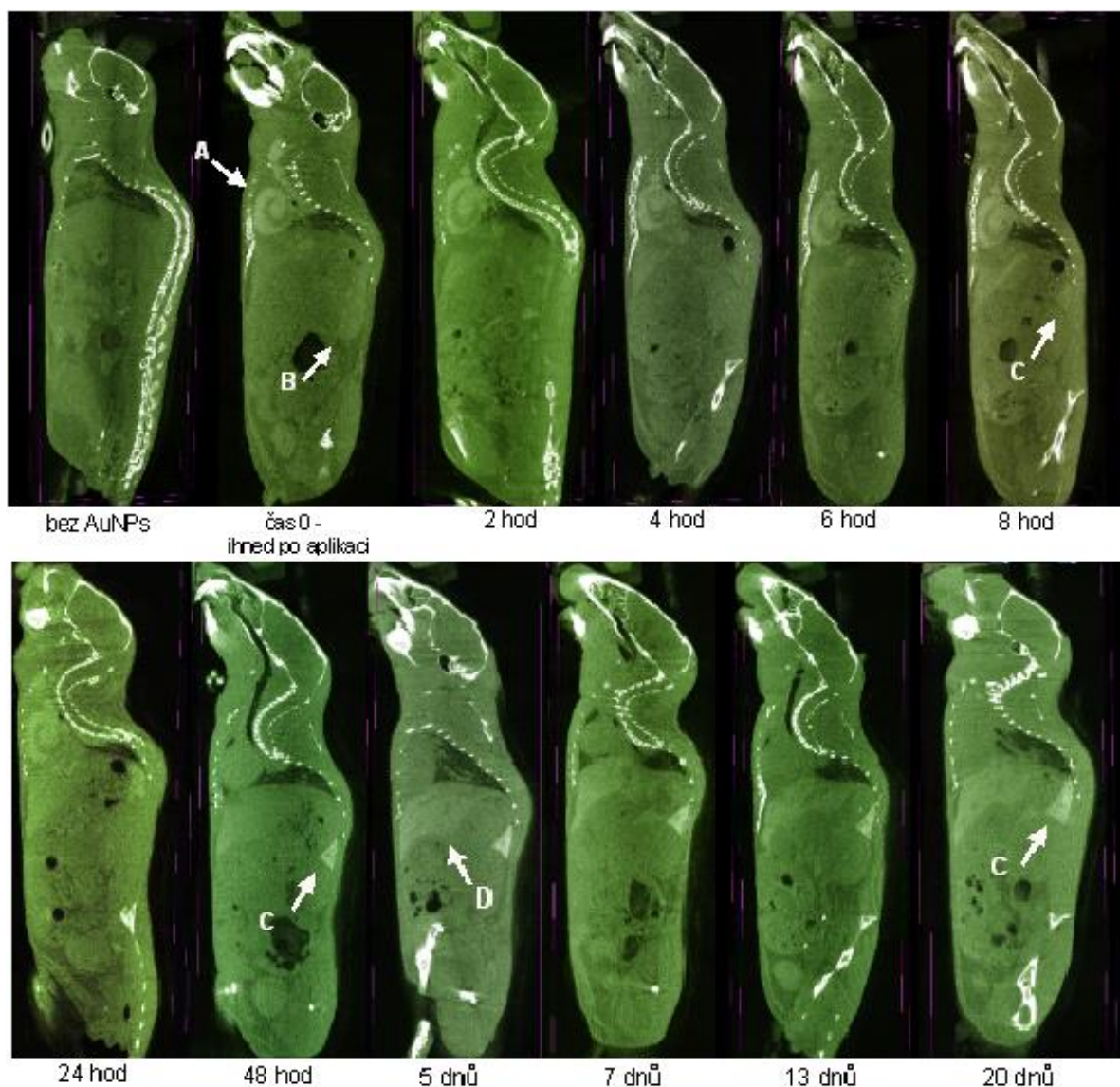
AuNPs modifikované 100 nmol mPEG-SH byly zakoncentrovány na 100 mg Au/ml, sterilizovány filtrací přes 2 μm filtr a převedeny do roztoku PBS. Takto připravené AuNPs byly následně intravenózně aplikovány do myši. V aplikované dávce se nacházelo přibližně 20 a 40 mg Au. Poté byla myš skenována na přístroji MicroCT SkyScan 1276 (Bruker, Německo). Jednotivé skeny byly pořízeny kontinuálním rotačním skenováním za použití filtru – low dose a high dose. Každý sken se skládal ze 4 částí, které byly při počítačové rekonstrukci spojeny v jeden obraz v programu InstaRecon®, 3D vizualizace a morfometrie byly provedeny v programu CTvox a CTAn.

3.2.6.2 Výsledky



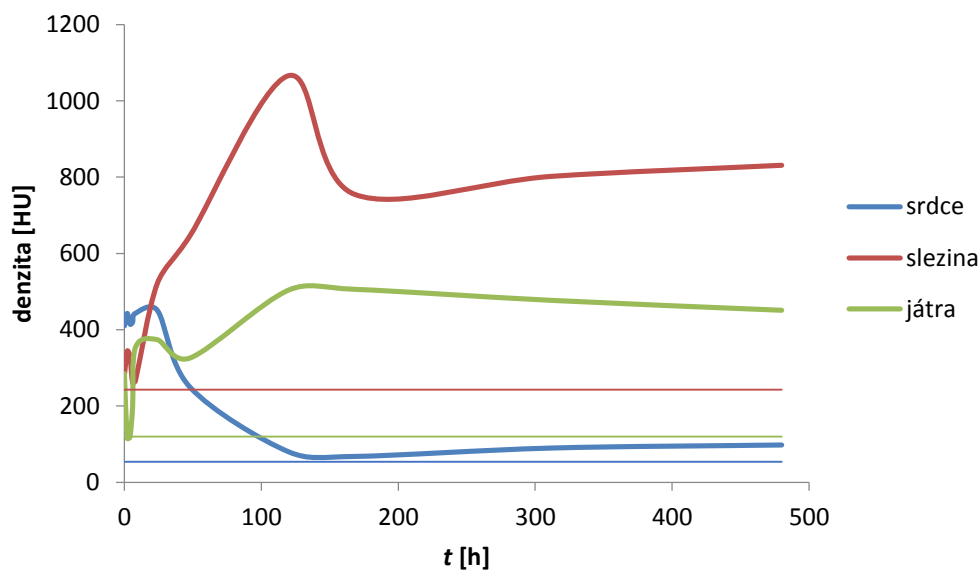
Obr. 48: Porovnání koncentrační řady modifikovaných AuNPs na μCT

Na Obr. 48 je zachyceno srovnání kontrastu různých koncentrací AuNPs po měření na μCT . Na základě tohoto experimentu je vidět, že vhodnou koncentrací AuNPs pro *in vivo* zobrazování je až koncentrace 100 mg/ml, proto modifikované AuNPs byly zakoncentrovány právě na tuto koncentraci. Ostatní koncentrace dosahují rapidně nižších hodnot HU, a proto by pravděpodobně nebyly při *in vivo* aplikaci dostatečně kontrastní. Pro jistotu byla proměřena i voda a roztok PBS, aby bylo dokázáno, že jakožto médium, ve kterém se AuNPs nacházejí, nedochází jejich vlivem ke zkreslení měření.



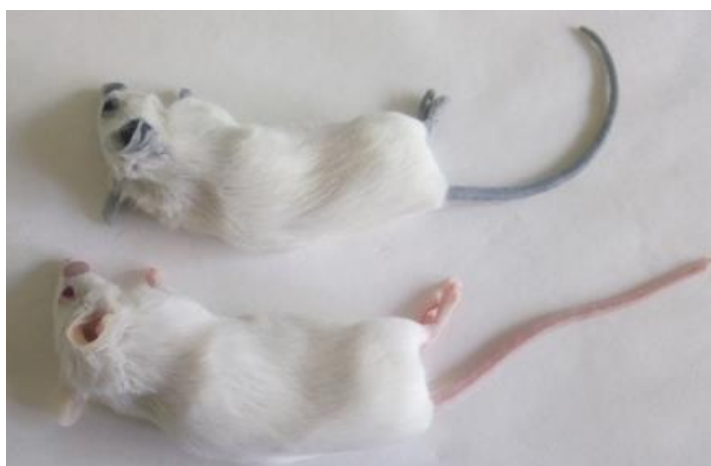
Obr. 49: Snímky z dlouhodobého skenování myši po aplikaci jediné dávky AuNPs: a) srdce; b) ledviny; c) slezina; d) játra

Z Obr. 49 je vidět, že ihned po intravenózní aplikaci AuNPs dochází k zobrazení srdečních komor (A) myši vyplněných krví s kontrastní látkou a díky výraznému prokrvení ledvin jsou patrné i cévy v ledvinách (B). Lze si povšimnout velkého rozdílu mezi snímkem myši po aplikaci AuNPs a bez AuNPs, kde žádné orgány viditelné nejsou. Postupem času dochází ke snížení koncentrace AuNPs v krvi a jejich vychytávání slezinou (C), která na snímku začíná být patrná již po 8 h od aplikace. Po 2 h od aplikace se na snímcích zobrazují také jaterní laloky, což je opět dáno vysokým průtokem krve s kontrastní látkou tímto orgánem. Játra (D) jsou pak plně zobrazena po 48 h vlivem vychytání AuNPs makrofágy v játrech. Nejlépe jsou pak játra viditelná na snímku po 5 dnech. Vlivem vychytávání AuNPs jednotlivými orgány dochází ke snížení jejich koncentrace v krvi, a proto jsou srdeční komory postupem času na jednotlivých snímcích stále méně viditelné. Během tohoto skenování byl použitý filtr „low dose“, který je šetrný ke zvířeti, a rychlé rotační skenování, díky kterému zvíře nedostane příliš vysokou dávku záření. Nevýhodou jsou však skeny v malém rozlišení.



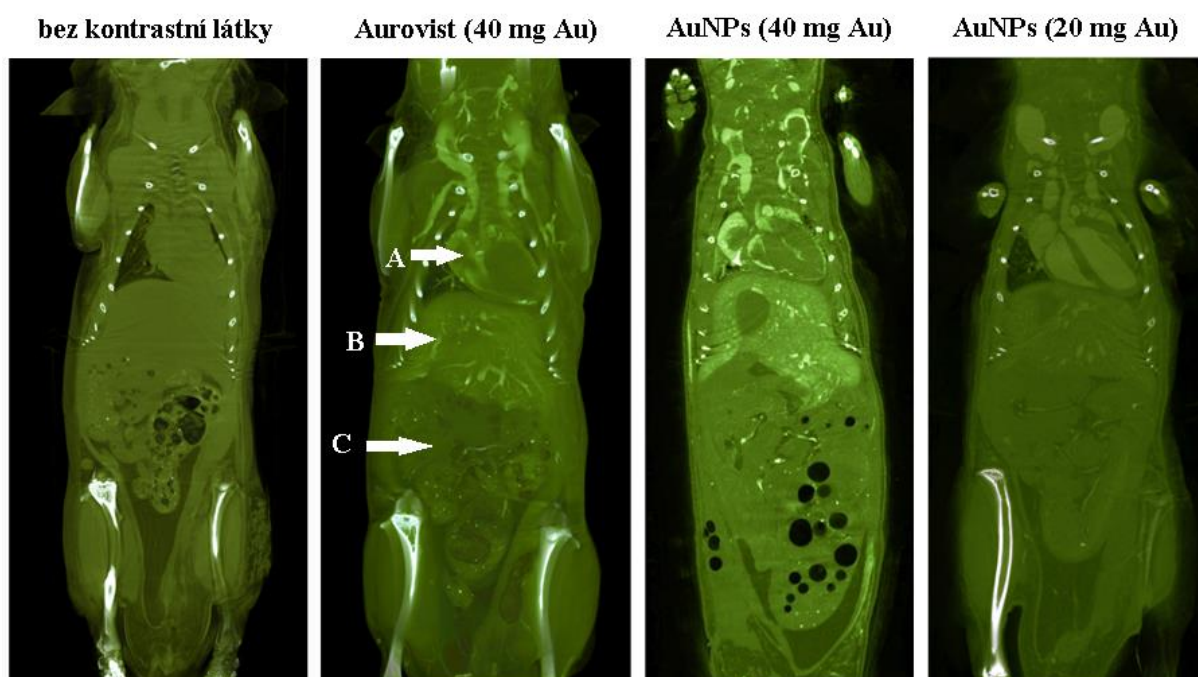
Obr. 50: Změna denzity v čase jednotlivých orgánů

Na Obr. 50 je zachyceno, jak se mění denzita jednotlivých orgánů v čase během skenování na μ CT. Rovné čáry pak reprezentují hodnoty denzity naměřené před podáním AuNPs. Tyto výsledky korelují s kontrastem daných orgánů v čase na předchozím Obr. 49. Je zde vidět, jak postupem času dochází k vychytávání AuNPs z krve, vlivem čehož denzita srdce klesá, až je zhruba po 5 dnech (120 h) na hodnotě stejné jako bez přítomnosti kontrastní látky. Slezina a játra vykazují ihned po aplikaci zvýšenou denzitu, kdy během zhruba 4–6 h dochází k jejímu poklesu na hodnotu naměřenou bez přítomnosti AuNPs a poté k jejímu rapidnímu nárůstu. To je způsobeno tím, že kontrast těchto orgánů je zpočátku vlivem jejich výrazného prokrvení dán přítomností AuNPs v krvi. Následně dochází k vychytání AuNPs z krve, a tedy snížení kontrastu, a poté k postupné akumulaci AuNPs v těchto orgánech, kdy jejich denzita opět roste. Ke kumulaci AuNPs dochází i v kůži, zejména ve velmi prokrvených oblastech, jak je vidět na následujícím Obr. 51, kde myš, které byly podány AuNPs, je zbarvena do tmavomodré barvy.



Obr. 51: Rozdíl ve zbarvení myši před a po podání AuNPs

Následující Obr. 52 zachycuje snímky ze skenování mrtvé myši. Díky tomu, že byla myš usmrcena, mohl být použit filtr „high dose“ a aplikována vyšší dávka rentgenového záření. Proto jsou tyto snímky více kvalitní a mají daleko vyšší rozlišení než snímky na Obr. 49. Je zde také dobře vidět srovnání mezi připravenými AuNPs, komerční kontrastní látkou na bázi zlata od firmy Aurovist a snímkem bez přítomnosti kontrastní látky. Koncentrace zlata v aplikované dávce komerční látky byla 40 mg, u AuNPs také 40 mg a dále 20 mg. U všech snímků po aplikaci kontrastní látky lze na rozdíl od snímku bez kontrastní látky dobře rozlišit srdce (A), játra (B) a střeva (C). Tyto orgány jsou poměrně dobře patrné již od koncentrace zlata 20 mg, koncentrace 40 mg pak poskytuje daleko lepší kontrast. Lze si také povšimnout rozdílu mezi snímky, na nichž je zachycena myš po podání Aurovistu a připravených AuNPs o stejné koncentraci. Zdá se, že laboratorně připravené AuNPs poskytují při stejné koncentraci vyšší kontrast než komerčně dostupný Aurovist.



Obr. 52: Snímky ze skenování mrtvé myši – porovnání komerční kontrastní látky na bázi Au a připravených AuNPs o koncentraci 40 a 20 mg Au: a) srdce; b) játra; c) střeva

Na základě doposud popsaných výsledků bylo dokázáno, že připravené AuNPs mohou být vhodnou platformou pro přípravu různě modifikovaných AuNPs pro *in vivo* preklinické zobrazování na modelu malých hlodavců.

3.3 Povrchová modifikace připravených AuNPs kys. hyaluronovou

3.3.1 Materiál

Methoxypoly(ethylen glykol)2000-thiol	Nanosoft Biotechnology LLC, USA
Aminoxy PEG Thiol	NANOCS, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina hyaluronová (37 690 kDa)	Contipro, ČR
Chlorid sodný	Penta, ČR
Kyselina octová 99%	Penta, ČR
Trihydrát octanu sodného	Penta, ČR
DMSO	Sigma-Aldrich, USA

3.3.2 Metody

3.3.2.1 Příprava roztoků

Příprava 1 mM roztoku mPEG-SH

Na analytických vahách (Ohaus Explorer Analytical, USA) byly naváženy 2 mg mPEG-SH. Navážka byla rozpuštěna v 1 ml Mili-Q vody.

Příprava 1 mM roztoku AminoxyPEG-SH

Na analytických vahách (Ohaus Explorer Analytical, USA) bylo naváženo 5 mg aminoxyPEG-SH. Navážka byla rozpuštěna v 1 ml DMSO.

Příprava 10% roztoku Tween 20

2 ml Tween 20 byly zředěny na objem 20 ml Mili-Q vodou.

Příprava 1 mM roztoku kys. hyaluronové

Na váze KERN 440 (Fisher Scientific, USA) bylo naváženo 37,69 mg kyseliny hyaluronové. Navážka byla rozpuštěna v 1 ml Mili-Q H₂O.

Příprava 20 mM acetátového pufru, pH = 5,5

Byl připraven 20mM roztok kyseliny octové a 20mM roztok octanu sodného. Roztok octanu sodného byl za stálého míchání přidáván k roztoku kyseliny octové, dokud se hodnota pH neustálila na 5,5. pH bylo měřeno pomocí přístroje pH720 (InoLab, WTW, Německo)

Příprava 5 M roztoku NaCl

Bylo naváženo 14,61 g NaCl (KERN 440 Fisher Scientific, USA). Navážka byla převedena do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněna Mili-Q vodou po rýsku. Poté byl roztok přefiltrován přes 0,22 µm filtr.

3.3.2.2 Modifikace AuNPs a aminosy ligace

K 1 ml AuNPs bylo přidáno 5 µl 10% roztoku Tween 20 a suspenze byla nechána reagovat 30 min. Poté bylo ke vzorku přidáno 5 µl roztoku aminosy PEG-SH. Následující den bylo ke vzorku napipetováno 10 µl roztoku mPEG-SH a modifikace opět probíhala do následujícího dne. Poté byl vzorek stočen při 20 000 ot./min. po dobu 30 min (centrifuga Eppendorf 5430, Německo). Byl odpipetován supernatant, vzorek byl zředěn 5M roztokem NaCl na objem 1 ml a rozsuspendován. Tímto způsobem byl znovu 2x promyt, tentokrát však acetátovým pufrům. Po převedení modifikovaných AuNPs do acetátového pufru bylo přidáno 5 µl roztoku kyseliny hyaluronové a reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě za stálého míchání při 350 rpm. Po uplynutí reakční doby byl vzorek převeden zpět do Mili-Q vody.

3.3.2.3 MADLS

50 µl vzorku bylo napipetováno do kyvety ZEN2112 a byla změřena velikost na přístroji Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd., UK). Vzorek byl proměřen před přidáním kys. hyaluronové, ihned a 2 hod po přidání a poté následující den. Stejným způsobem byl proměřen i samotný roztok kys. hyaluronové.

3.3.2.4 UV-Vis

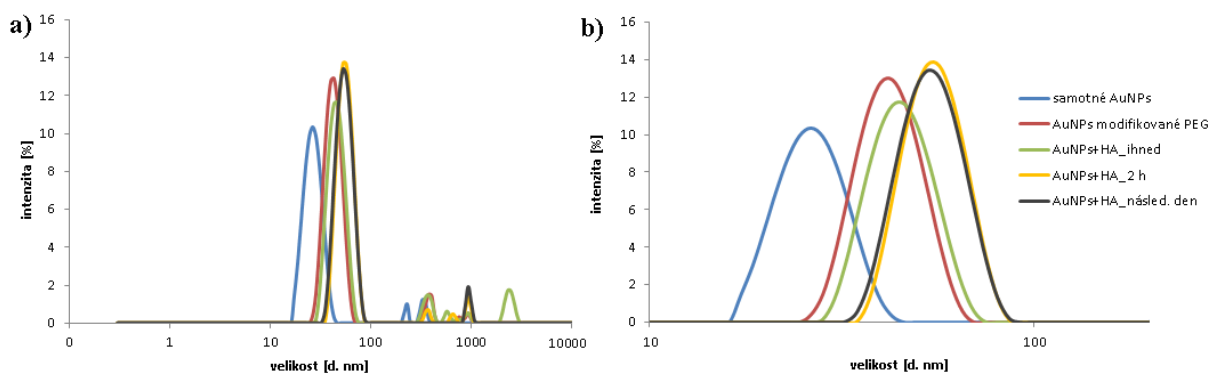
1 ml vzorku byl proměřen v nízkoobjemové kyvetě ZEN40 na přístroji UVIKON XL od firmy BioTek v rozmezí vlnových délek 450–800 nm proti vodě.

3.3.2.5 TEM

10 µl vzorku bylo kápnuto na mřížku pro TEM a vysušeno. Následně byla na mřížku kápnuta kapka 2 % roztoku uranyl acetátu, díky kterému dochází k obarvení kyseliny hyaluronové. Po 10 s působení byla kapka uranyl acetátu vysušena a vzorek byl následně mikroskopován (Philips EM 208, software Morgagni 268, FEI, ČR).

3.3.3 Výsledky

3.3.3.1 MADLS

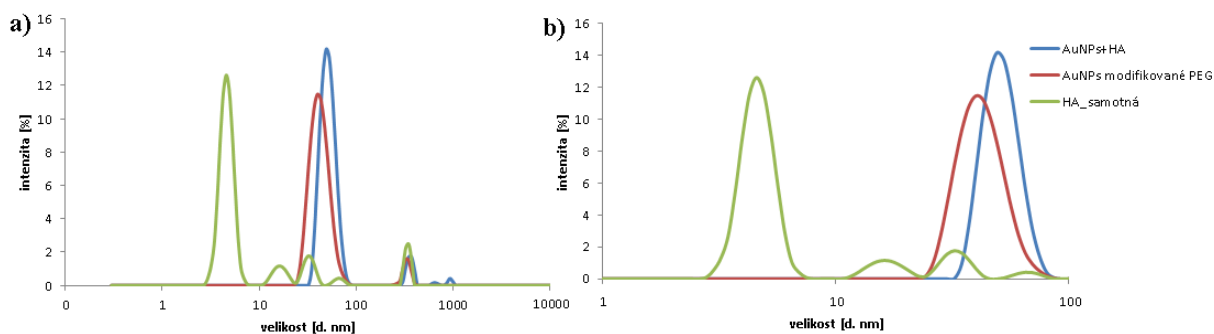


Obr. 53: Modifikace AuNPs a ligace kys. hyaluronové (HA): a) distribuce dle intenzity; b) detail distribuce dle intenzity velikosti částic (modrá křivka reprezentuje samotné AuNPs; červená modifikované AuNPs; zelená, oranžová a černá AuNPs ihned, 2 h a následující den po přidání HA)

Na Obr. 53 je patrné, že modifikací AuNPs pomocí mPEG-SH a aminoxy-PEG-SH došlo k nárůstu jejich velikosti. Jelikož na tento experiment byly nasyntetizovány nové AuNPs, liší se jejich velikost i PDI od AuNPs v experimentu modifikace mPEG-SH. Modifikací AuNPs na základě hodnoty PDI v Tab. 7 došlo ke snížení jejich polydisperzity, která se ale přidáním kys. hyaluronové opět zvýšila. Obr. 53 názorně zachycuje, jak se kys. hyaluronová postupně na AuNPs váže. Zatímco ihned po přidání kys. hyaluronové nárůst činil pouze zhruba 3 nm, další den byl nárůst 12 nm, a výsledná velikost AuNPs se tak nelišila od velikosti po 2 hodinách reakce. Na základě toho lze usuzovat, že pro obsazení všech vazebných míst kys. hyaluronovou jsou právě 2 hodiny dostatečnou dobou. Všechny velikosti v Tab. 7, kromě velikosti samotných AuNPs, byly u vzorku stanoveny v prostředí acetátového pufru, kdy pH vzorku činilo $5,42 \pm 0,01$.

Tab. 7: Velikost a PDI AuNPs po modifikaci a ligaci kys. hyaluronové

	velikost [d. nm]	σ [nm]	PDI [-]	σ [-]
samotné AuNPs	26,64	1,73	0,33	0,07
AuNPs modifikované PEG	42,54	1,62	0,28	0,01
HA_ ihned	45,72	0,41	0,33	0,01
HA_ 2 h	55,60	2,03	0,34	0,04
HA_ následující den	54,76	1,83	0,34	0,03

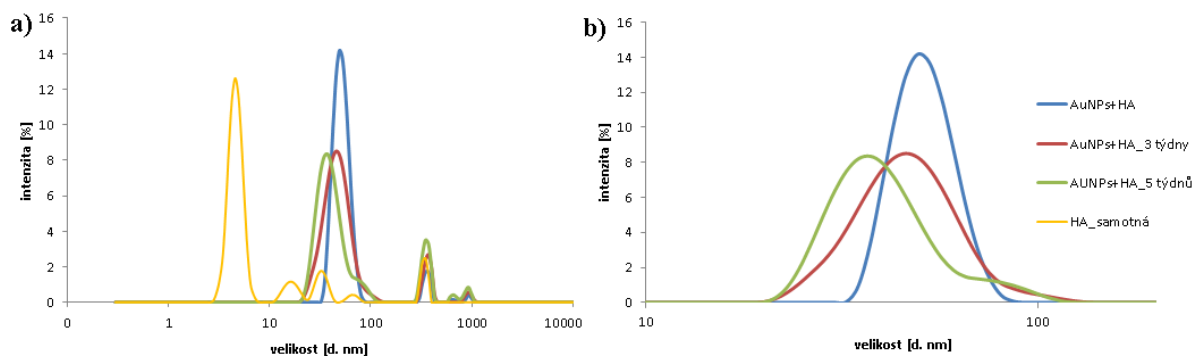


Obr. 54: AuNPs po navázání kys. hyaluronové (HA) v prostředí Mili-Q vody: a) distribuce dle intenzity; b) detail distribuce dle intenzity (modrá křivka reprezentuje modifikované AuNPs; červená AuNPs po ligaci HA; zelená samotnou HA)

Na Obr. 54 je zachycena distribuce velikosti dle intenzity roztoku kyseliny hyaluronové, modifikovaných AuNPs a AuNPs po ligaci v prostředí Mili-Q vody. Jak je z obrázku patrné, roztok kyseliny hyaluronové obsahuje aglomeráty a je značně polydisperzní, což vysvětluje, proč se hodnota PDI během její ligace na AuNPs zvyšuje, jak je uvedeno v předchozí Tab. 7. Po průběhu ligace, kdy došlo k převodu AuNPs z acetátového pufru zpět do prostředí Mili-Q vody, čímž se odstranila nenavázaná kyselina hyaluronová, se PDI snížil z 0,34 na 0,26. Z Obr. 54 je opět patrný nárůst velikosti AuNPs po přidání kyseliny hyaluronové dokazující její navázání. Konkrétně nárůst činí 11,7 nm. Velikost samotné kyseliny hyaluronové je pak 5,18 nm. Vezme-li se v potaz, že se kyselina hyaluronová váže na AuNPs po celém jejich povrchu, je jasné, že by se hydrodynamický průměr měl zvětšit o 2x 5,18 nm, tedy zhruba 10,4 nm. To v rámci směrodatných odchylek zachycených v následující Tab. 8 odpovídá skutečnému nárůstu 11,7 nm a lze tedy říci, že se kyselina hyaluronová na AuNPs opravdu navázala.

Tab. 8: Velikost a PDI HA, AuNPs po modifikaci a ligaci kys. hyaluronové v prostředí Mili-Q vody

	velikost [d. nm]	σ [nm]	PDI [-]	σ [-]
AuNPs modifikované PEG	42,66	3,06	0,19	0,01
AuNPs + HA	54,36	1,80	0,26	0,06
HA	5,18	0,95	0,27	0,07



Obr. 55: Postupná hydrolyza oximové vazby: a) distribuce dle intenzity; b) detail distribuce dle intenzity (modrá křivka reprezentuje AuNPs následující den od přidání HA; červená a zelená tentýž vzorek po třech a pěti týdnech od průběhu ligace; oranžová samotnou HA)

Po převedení AuNPs s navázanou kyselinou hyaluronovou do Mili-Q vody byla změřená hodnota pH vzorku $7,17 \pm 0,12$. Přestože by k hydrolyze oximové vazby mělo docházet za nižšího pH, sledováním stability vzorku po dobu 5 týdnů se ukázalo, že k její hydrolyze dochází pravděpodobně i při vyšších hodnotách pH. Po zhruba 3 týdnech se velikost nanočástic zmenšila na 48 nm, po 5 týdnech byla již 42nm, čili stejná jako velikost AuNPs po modifikaci PEG před provedením ligace (viz Obr. 55). Hydrolyzou vazby pak došlo i ke zvýšení polydisperzity, jak je uvedeno v následující Tab. 9.

Tab. 9: Velikost AuNPs během hydrolyzy oximové vazby

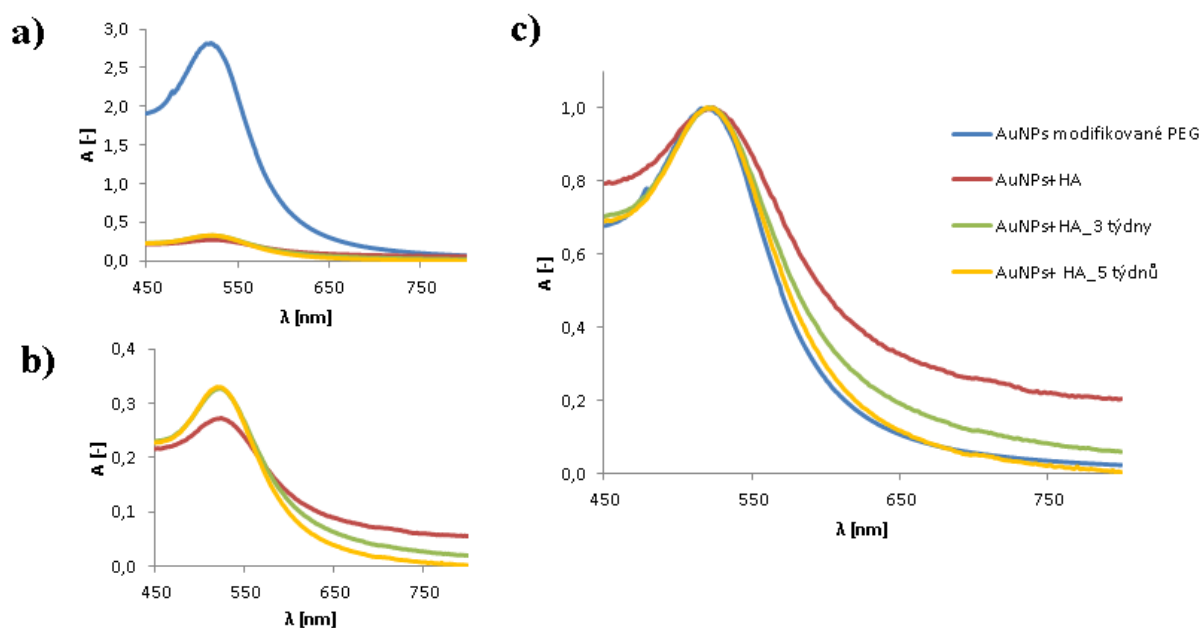
	velikost [d. nm]	σ [nm]	PDI [-]	σ [-]
AuNPs+HA	54,36	1,80	0,26	0,06
AuNPs+HA_3 týdny	47,94	1,68	0,24	0,01
AuNPs+HA_5 týdnů	42,39	2,46	0,31	0,02
modifikované AuNPs	42,66	3,06	0,19	0,01

Důležité je, že jak po ligaci hys. hyaluronové, tak také po hydrolyze oximové vazby počet AuNPs zůstal zachován a pohybuje se ve stále stejném řádu, jak dokumentuje následující Tab. 10. To dokazuje, že jak ligace kyseliny hyaluronové, tak i zánik oximové vazby neovlivňuje stabilitu AuNPs.

Tab. 10: Distribuce podle koncentrace částic po ligaci HA a hydrolyze oximové vazby

	koncentrace [počet částic/ml]	σ [počet částic/ml]
AuNPs modifikované PEG	$7,59 \cdot 10^9$	$1,63 \cdot 10^9$
AuNPs+HA	$1,08 \cdot 10^9$	$0,27 \cdot 10^9$
AuNPs+HA_5 týdnů	$4,47 \cdot 10^9$	$1,20 \cdot 10^9$

3.3.3.2 UV-Vis



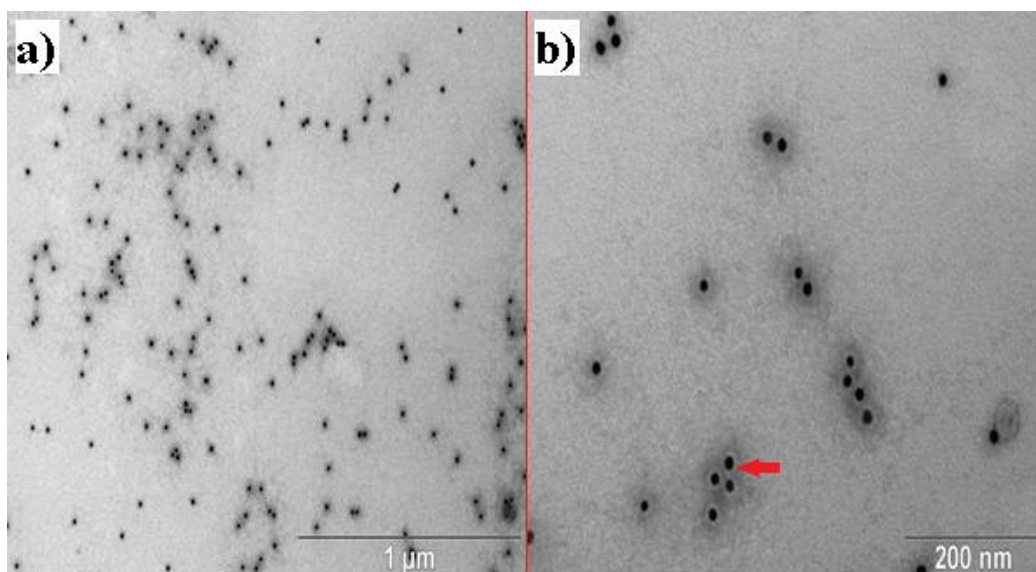
Obr. 56: Absorpční spektra vzorku před a po navázání kys. hyaluronové (HA) v průběhu 5 týdnů v prostředí Mili-Q vody a) naměřená spektra; b) detail naměřených spekter AuNPs s HA; c) normalizovaná spektra (modrá křivka reprezentuje modifikované AuNPs před přidáním HA; červená AuNPs následující den po přidání HA; zelená a žlutá 3 a 5 týdnů od ligace)

Obr. 56 je dalším důkazem o navázání kyseliny hyaluronové na povrch AuNPs a následné hydrolyze oximové vazby. Navázání kyseliny hyaluronové na povrch AuNPs vede ke zvýšení tloušťky dielektrické vrstvy AuNPs, čímž se snižuje energie povrchového plasmonu, a tak dochází k posunu SPR píku k vyšším vlnovým délkám, jak je zachyceno v následující Tab. 11. Postupnou hydrolyzou oximové vazby pak dochází k navrácení SPR píku na jeho hodnotu před průběhem ligace. Navíc vazbou kyseliny hyaluronové na AuNPs dochází k potlačení absorpce AuNPs, což se projevuje sníženou hodnotou absorpance v absorpčním maximu, jak znázorňuje Obr. 56 a). Postupnou hydrolyzou oximové vazby pak hodnota absorpance v absorpčním maximu roste, viz Obr. 56 b). Z Obr. 56 c) si pak lze povšimnout, že vazbou kyseliny hyaluronové na AuNPs došlo k znatelnému rozšíření píku a výraznému nárůstu absorpance v rámci vyšších vlnových délek. Postupným zánikem vazeb a uvolněním molekul kyseliny hyaluronové z povrchu AuNPs se pak toto rozšíření a nárůst absorpance snižuje, až po 5 týdnech je normalizované spektrum vzorku stejné, jako bylo před provedením ligace. Tyto výsledky korelují s výsledky ve zdroji [61], kde s rostoucí koncentrací kyseliny hyaluronové na povrchu AuNPs dochází jak ke snížení hodnoty absorpčního maxima, tak také k nárůstu absorpance u vyšších vlnových délek. [61]

Tab. 11: Posun absorpčního maxima vzorku po ligaci HA a po 3 a 5 týdnech od ligace

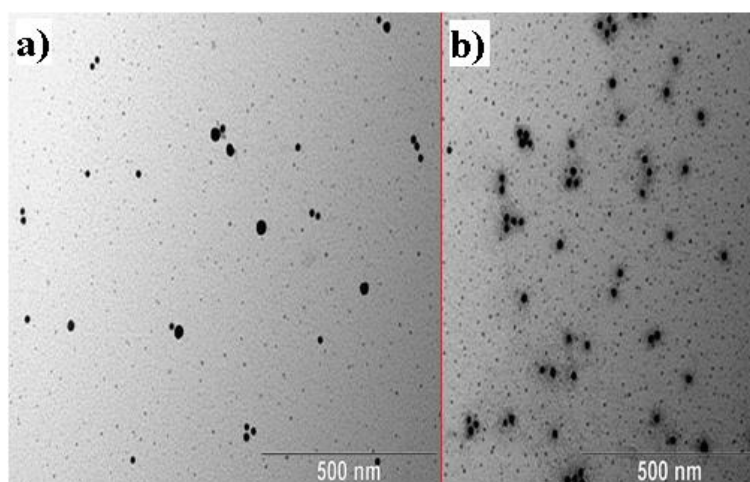
	AuNPs modifikované PEG	AuNPs + HA	AuNPs + HA 3 týdnů	AuNPs + HA 5 týdnů
λ_{MAX} [nm]	520	524	523	520

3.3.3.3 TEM



Obr. 57: AuNPs s navázanou kys. hyaluronovou – snímky z TEM: a) měřítko 1000 nm; b) 200 nm (šipka znázorňuje neobarvenou vrstvu pravděpodobně tvořenou molekulami PEG)

Obr. 57 představuje snímky z TEM, na kterých jsou zachycené AuNPs s navázanou kyselinou hyaluronovou. Díky barvení uranyl acetátem je docíleno výrazného kontrastu mezi kyselinou hyaluronovou a pozadím, kdy kyselina hyaluronová vytváří kolem AuNPs korónu tmavé barvy. Na detailnějším snímku znázorněném na Obr. 57 b) si pak lze povšimnout, že mezi tmavou korónou a povrchem AuNPs se nachází bezbarvá oblast. Tyto oblasti jsou na daném snímku znázorněny šipkou a jsou pravděpodobně tvořeny molekulami PEG, které obarveny nejsou.



Obr. 58: Rozdíl mezi AuNPs bez a s navázanou kys. hyaluronovou (HA): a) AuNPs bez HA; b) AuNPs s navázanou HA

Na Obr. 58 se pak pro srovnání nacházejí dva snímky, kdy na snímku a) jsou AuNPs bez kyseliny hyaluronové, zatímco na snímku b) je kyselina hyaluronová na AuNPs navázána a opět tvoří tmavou korónu kolem částic.

3.3.4 Testy stability

3.3.4.1 Metody

pH stabilita

2 ml AuNPs s navázanou kyselinou hyaluronovou bylo zředěno Mili-Q vodou na konečný objem 10 ml. U takto zředěného vzorku byla měřena velikost částic v závislosti na pH v rozmezí pH 3 – 11. pH vzorku bylo upraveno přidávkou 0,1 M HCl, 1 M HCl a 1 M NaOH pomocí automatického titrátoru. Experiment byl proveden na přístroji Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical Ltd, UK).

Teplotní stabilita

200 µl AuNPs s navázanou kyselinou hyaluronovou bylo zředěno Mili-Q vodou na konečný objem 1 ml. U takto zředěného vzorku byla měřena velikost částic v závislosti na teplotě v rozmezí teplot 15–60°C. Vzorek byl měřen v kyvetě ZEN40 na přístroji Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical Ltd, UK).

Stabilita v závislosti na iontové síle

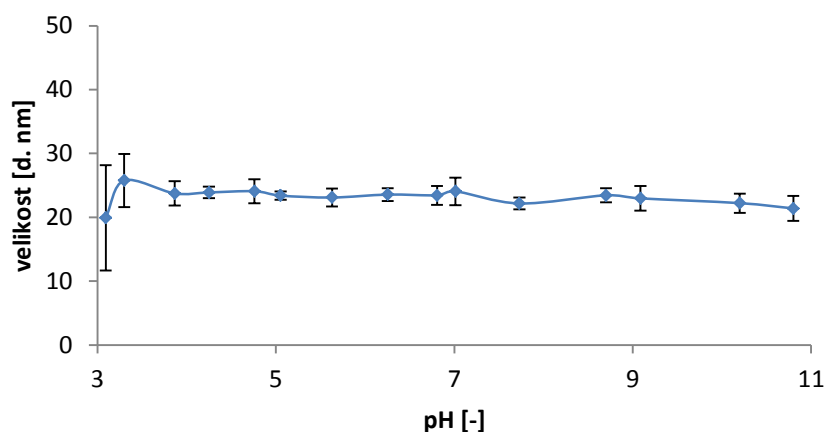
2 ml AuNPs s navázanou kyselinou hyaluronovou bylo zředěno Mili-Q vodou na konečný objem 10 ml. U takto zředěného vzorku byla měřena velikost částic v závislosti na koncentraci NaCl v rozmezí 0–1 M. Roztok 2 M NaCl byl ke vzorku přidáván pomocí automatického titrátoru. Experiment byl uskutečněn na přístroji Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical Ltd, UK).

Časová stabilita v 80% FBS

200 µl AuNPs s navázanou kyselinou hyaluronovou bylo zředěno pomocí FBS na konečný objem 1 ml. U takto upraveného vzorku byla měřena absorpční spektra každou hodinu v rozmezí vlnových délek 450–800 nm po dobu 10 hodin. Vzorek byl měřen v kyvetě ZEN40 na přístroji UVIKON XL (BioTek, USA) proti FBS.

3.3.4.2 Výsledky

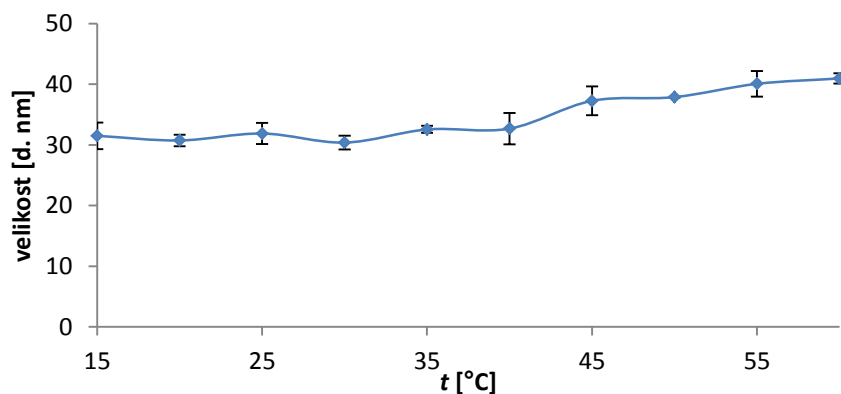
pH stabilita



Obr. 59: Závislost velikosti AuNPs na pH

Z Obr. 59 je vidět, že velikost AuNPs s navázanou kyselinou hyaluronovou se ve sledovaném rozmezí pH výrazně nemění. Jediná změna velikosti je patrná kolem pH 3, avšak není statisticky významná. Takto modifikované AuNPs jsou tedy v rozmezí hodnot pH 3–11 z krátkodobého hlediska velikostně stabilní.

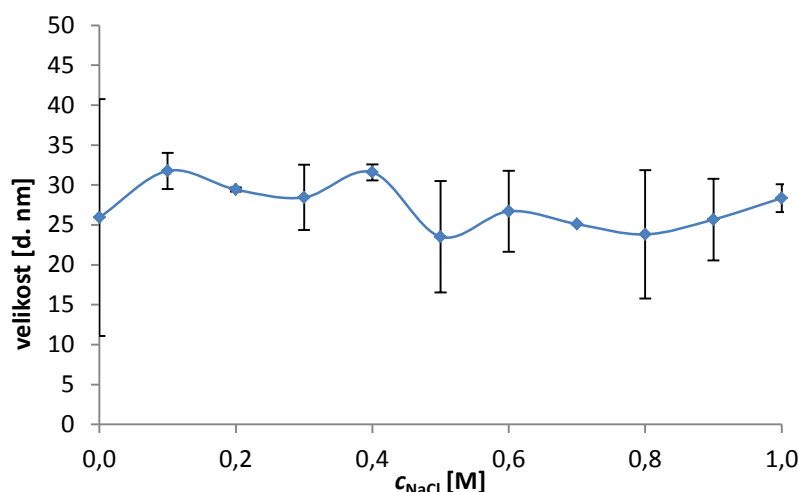
Teplotní stabilita



Obr. 60: Závislost velikosti AuNPs na teplotě

Z Obr. 60 je patrné, že s rostoucí teplotou velikost AuNPs mírně roste. Rozhodně se ovšem nejedná o tak velký nárůst, který by byl způsobený tvorbou agregátů. Stejně jako u modifikace AuNPs mPEG–SH došlo i u AuNPs s navázanou kyselinou hyaluronovou k porovnání měření provedeným se standardem. Jelikož je směrnice lineární regrese blízká jak pro standard, tak i AuNPs s kyselinou hyaluronovou, je pravděpodobné, že nárůst velikosti je opět způsoben souhrnem teplotní expanze objemu nanočástic a teplotní změnou viskozity média, která neodpovídá tabelovaným údajům v databázi přístroje. Porovnání se standardem je pak ukázáno viz Příloha 4.

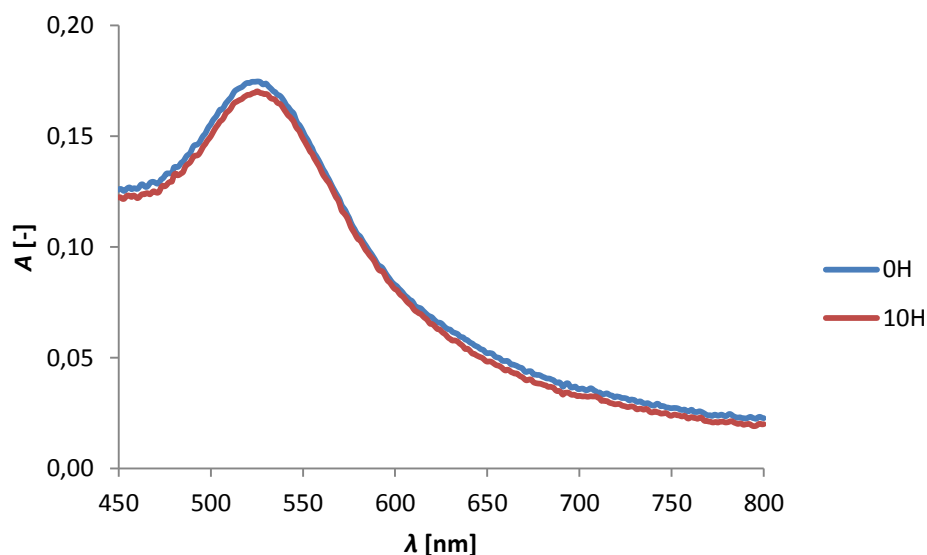
Stabilita v závislosti na iontové síle



Obr. 61: Závislost velikosti AuNPs na koncentraci NaCl

Obr. 61 dokazuje, že přestože velikost mírně kolísá, tak lze vzhledem k poměrně vysokým chybovým úsečkám považovat AuNPs v daném rozmezí koncentrace NaCl za stabilní. Tyto mírné změny ve velikosti nejsou totiž dostatečně velké na to, aby byly způsobeny agregací částic.

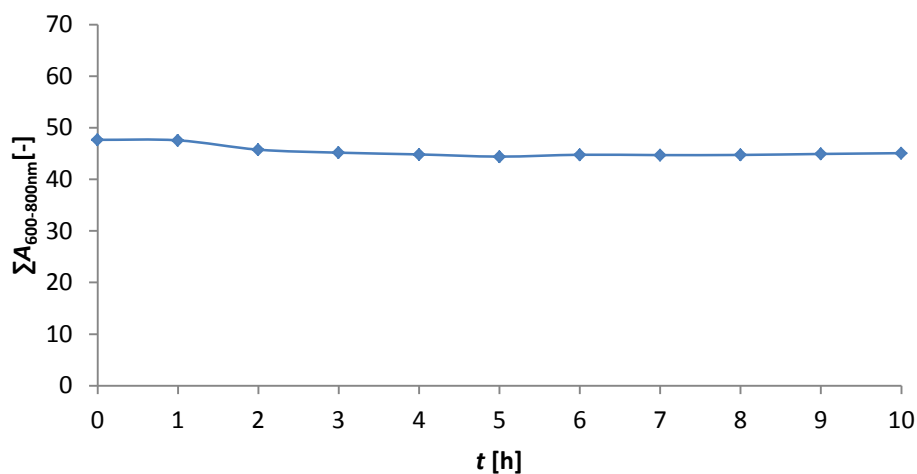
Časová stabilita v 80 % FBS séru



Obr. 62: Absorpční spektra AuNPs v 80% FBS po době 10 hodin

Z Obr. 62 znázorňujícího porovnání absorpčních spekter AuNPs po uplynutí 10 h je vidět, že spektra jsou téměř totožná. Důležité je, že nedošlo k nárůstu absorbance v rozmezí vlnových délek 600–800 nm, což by naznačovalo agregaci vzorku. Hodnoty integrace plochy pod křivkou v tomto intervalu v jednotlivých časech měření po normalizaci spekter jsou

zachycený na následujícím Obr. 63. Jelikož hodnota zůstává stále stejná, jsou AuNPs konjugované kyselinou hyaluronovou v 80% FBS séru stabilní.



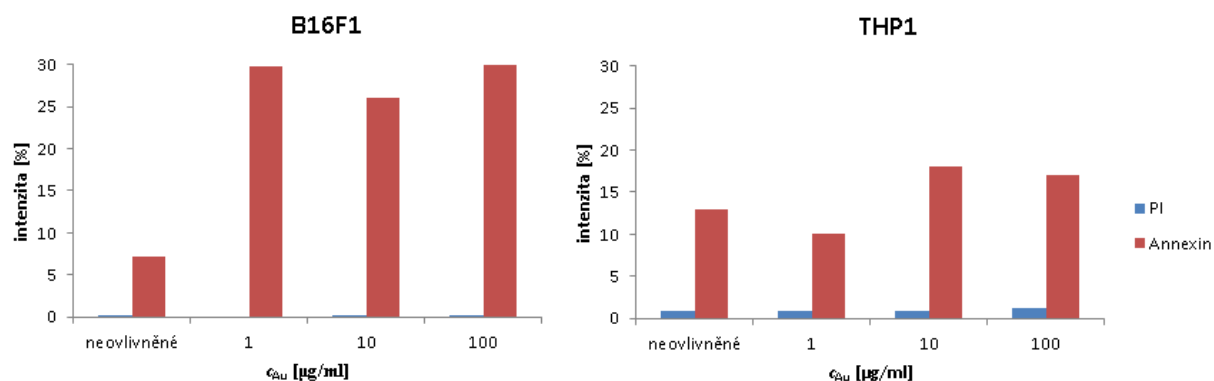
Obr. 63: Absorpční spektra AuNPs v 80% FBS po době 10 hodin

3.3.5 Testy cytotoxicity

3.3.5.1 Metoda

AuNPs konjugované kys. hyaluronovou byly 10x zakoncentrovány ultracentrifugací (Hermle Z200A, Hermle LaborTechnik GmbH, Německo) při 50 000 ot./min po dobu 1,5 h. Testy cytotoxicity byly stanoveny u dvou druhů buněk a to buněk B16F1 a THP1. K oběma typům buněk byly přidány zakoncentrované AuNPs tak, aby byly buňky vystaveny působení AuNPs o koncentraci 1; 10 a 100 $\mu\text{g Au/ml}$. Viabilita buněk byla stanovena metodou průtokové cytometrie na přístroji BD FACS LSR II Fortessa (Becton Dickinson) pomocí barvení propidiumjodidu, dále jen PI, (ThermoFisher Scientific) a Annexinu V konjugovaného s Alexa Fluor® 488 (Invitrogen). Viabilita se stanovovala po 24 h. Jako excitační a emisní maximum u PI byly použity vlnové délky 536 a 617 nm, u Annexinu 495 a 519 nm. Pro kontrolu bylo měření provedeno i s buňkami neovlivněnými AuNPs.

3.3.5.2 Výsledky



Obr. 64: Viabilita buněk po 24 h: modré sloupce – intenzita signálu PI změřená 24 h od přidání AuNPs; červené – intenzita signálu Annexin V změřená 24 h od přidání AuNPs

Na základě Obr. 64 lze předpokládat, že AuNPs funkcionalizované kys. hyaluronovou nezpůsobují nekrózu buněk vzhledem k nízké hodnotě fluorescence při jejich značení PI. Ve vzorcích se opět nachází větší množství apoptotických buněk, protože buňky vykazují pozitivitu na značení Annexinem V. U buněčné linie THP1 je intenzita fluorescence Annexinu přibližně stejná jak u buněk ovlivněných AuNPs, tak i neovlivněných. U linie B16F1 je pak rozdíl v intenzitě pro Annexin mezi ovlivněnými a neovlivněnými buňkami větší, ale stále ne takový, na základě kterého by byly AuNPs považovány za toxické. Proto lze AuNPs konjugované kys. hyaluronovou považovat na základě dosavadních výsledků jak za stabilní, tak také biokompatibilní, a tudíž je možná jejich *in vivo* aplikace.

4 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byl připraven homogenní preparát nanočástic zlata. Nanočástice zlata byly připraveny Turkevichovou metodou a následně povrchově modifikovány methoxypoly(ethylenglykol)thiolem.

Dalším polymerem použitým k povrchové modifikaci připravených nanočástic zlata byl aminoxypoly(ethylenglykol)thiol. Na tento polymer byla s využitím oximové ligace navázána kyselina hyaluronová.

Veškeré preparáty byly charakterizovány pomocí pokročilých fyzikálně-chemických metod (DLS, MADLS, UV-Vis) a elektronové mikroskopie (TEM).

Stabilita modifikovaných nanočástic zlata byla ověřena na základě testů stability a jejich biokompatibilita v *in vitro* testech na buněčných liniích.

Nanočástice zlata modifikované methoxypoly(ethylenglykol)thiolem byly intravenózně aplikovány do myši, která byla následně skenována pomocí μ CT. Na základě výsledků z μ CT byla prokázána využitelnost takto modifikovaných nanočástic zlata jako kontrastních látek pro *in vivo* zobrazování pomocí μ CT na myším modelu.

5 ZDROJE

- [1] WEBB E., M. YUAN, N. R. LEMOINE a Y. WANG. Imaging in animal models. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*. 2016, **3**(2), 428-431. DOI: 10.15761/ICST.1000182.
- [2] KUCHMIY A. A., G. A. EFIMOV a S. A. NEDOSPASOV. Methods for in vivo Molecular Imaging. *Biochemistry (Moscow)*. 2012, **77**(12), 1603 - 1620. DOI: 10.1134/S0006297912120012.
- [3] BADEA, C. T., M. DRANGOVA, D. W. HOLDSWORTH a G. A. JOHNSON. In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography. *Physics in Medicine & Biology*. 2008, **53**(19), R319–R350. DOI: 10.1088/0031-9155/53/19/R01.
- [4] HOLDSWORTH, D. W. a M. M. THORNTON. Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends in Biotechnology*. 2002, **20**(8), S34-S39.
- [5] BOERCKEL, J. D., D. E. MASON, A. M. MCDERMOTT a E. ALSBERG. Microcomputed tomography: approaches and applications in bioengineering. *Stem Cell Research & Therapy*. 2014, **5**(6), 1 - 12. DOI: 10.1186/scrt534.
- [6] SCHAMBACH, S. J., S. BAG, L. SCHILLING, C. GRODEN a M. A. BROCKMANN. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods*. 2009, **50**(1), 2-13. DOI: 10.1016/j.ymeth.2009.08.007.
- [7] Computed Tomography. *MDC* [online]. [cit. 2019-12-25]. Dostupné z: <https://www.mdc-berlin.de/content/computed-tomography>
- [8] ASHTON, J. R., J. L. WEST a C. T. BADEA. In vivo small animal micro-CT using nanoparticle contrast agents. *Frontiers in Pharmacology*. 2015, **6**(256), 1 - 22. DOI: 10.3389/fphar.2015.00256.
- [9] YANG, X., M. YANG, B. PANG, M. VARA a Y. XIA. Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chemical Reviews*. 2015, **115**(19), 10410–10488. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00193.
- [10] SAHA, K., S. S. AGASTI, Ch. KIM, X. LI a V. M. ROTELLO. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Review*. 2012, **112**(5), 2739–2779.
- [11] HERIZCHI R., ABBASI E., MILANI M. a AKBARZADEH A. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. *Journal Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016, **44**(2), 596-602. DOI: 10.3109/21691401.2014.971807.
- [12] S., Monic, Vivek B., Yogesh K. a Hitest K. W. Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. *Frontiers in Bioscience*. 2014, **19**, 1320-1344. DOI: 10.2741/4284.
- [13] N., Sehgal, Soni K., Gupta N. a Kohli K. Microorganism Assisted Synthesis of Gold Nanoparticles: A Review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2018, **8**(64), 22-29.
- [14] S., Monic, Vivek B., Yogesh K. a Hitest K. W. Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. *Frontiers in Bioscience*. 2014, **19**, 1320-1344. DOI: 10.2741/4284.
- [15] REETZ M. T. a HELBIG W. Size-Selective Synthesis of Nanostructured Transition Metal Clusters. *Journal of The American Chemical Society*. 1994, **116**(16), 7401-7402. DOI: 10.1021/ja00095a051.

- [16] JANA N. R., GEARHEART L. a MURPHY C. J. Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2001, **17**(22), 6782-6786. DOI: 10.1021/la0104323.
- [17] DANIEL M. C., ASTRUC D.. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical reviews*. 2003, **104**(1), 293-346. DOI: 10.1021/cr030698+.
- [18] TURKEVICH J., STEVENSON P. C. a HILLIER J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951, **11**, 55 - 75. DOI: 10.1039/DF9511100055.
- [19] FRENS G. Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions. *Nature-Physical Science*. 1973, **241**(105), 20-22. DOI: 10.1038/physci241020a0.
- [20] HOLKAR C. R., JAIN S. S., JADHAV A. J. a PINJARI D. V. Scale-Up Technologies for Advanced Nanomaterials for Green Energy: Feasibilities and Challenges. *Nanomaterials for Green Energy*. 2018, 433-455. DOI: 10.1016/B978-0-12-813731-4.00014-X.
- [21] WUITHSCHICK, M., A. BIRNBAUM, S. WITTE, M. SZTUCKI, U. VAINIO a A KOL. Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. *ACS Nano*. 2015, **9**(7), 7052-7071.
- [22] WUITHSCHICK, M., A. BIRNBAUM, S. WITTE a U. VAINIO. Missing Piece of the Mechanism of the Turkevich Method: The Critical Role of Citrate Protonation. *Chem. Mater.* 2016, **28**(11), 4072-4081.
- [23] CHO, T. J. a V. A. HACKLEY. Assessing the chemical and colloidal stability of functionalized gold nanoparticles. *NIST*. 2018, **1200**(26), 1-13.
- [24] COUTURE, M., S. S. ZHAO a J. F. MASSON. Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *PCCP*. 2013, **15**(27), 11190-11216. DOI: 10.1039/c3cp50281c.
- [25] NOVOTNÁ, R., T. ŠILHA a Z. TRÁVNÍČEK. *SPEKTRÁLNÍ METODY STUDIA CHEMICKÝCH LÁTEK* [online]. Olomouc: Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2011 [cit. 2020-01-24]. Dostupné z: http://agch.upol.cz/userfiles/file/Spektralni_metody.pdf
- [26] *Colorimetric Water Quality Sensing with Mobile Smart Phones* [online]. 2012 [cit. 2020-01-24]. Dostupné z: https://people.ok.ubc.ca/kennchau/publications/Schaefer_MASc_thesis.pdf. MASc thesis. The University of British Columbia,.
- [27] SKOOG, D. A., F. J. HOLLER a S. R. CROUCH. *Principles of Instrumental Analysis*. 7. Boston, USA: Cengage Learning, 2017. ISBN 9781305577213.
- [28] Spektrofotometrie (2. LF UK). In: *WikiSkripta* [online]. 2018 [cit. 2020-01-24]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_\(2._LF_UK\)](https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_(2._LF_UK))
- [29] Optické vlastnosti koloidních soustav: fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu. Krystalografická společnost [online]. 2008 [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.htm>

- [30] ŠEVČÍKOVÁ, P., V. KAŠPÁRKOVÁ, J. KREJČÍ a P. VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*. 2014, (108), 479-482. ISSN 00092770.
- [31] *Dynamický rozptyl světla* [online]. 2012 [cit. 2019-01-24]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [32] *Manual: Zetasizer Nano user manual* [online]. 2011 [cit. 2019-01-24]. Dostupné z: https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/zetasizer_nanozs_manual.pdf
- [33] *Malvern Panalytical* [online]. [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN180719HowItWorksMADLS>
- [34] BOUALEM, A., C. FERRE, M. JABLOUN, A. JALOCHA a P. RAVIER. Multiangle dynamic light scattering for the improvement of multimodal particle size distribution measurements *SoftMatter*. 2014, **11**(28), 28–32.
- [35] KARLÍK, M. Transmisní elektronová mikroskopie: pohled do nitra materiálů. *Čs.čas.fyz.* 2005, **55**, 457-464
- [36] KUBÍNEK, R., K. ŠAFÁŘOVÁ a M. VŮJTEK. Elektronová mikroskopie. *Univerzita Palackého v Olomouci*. 2011, , 1-51.
- [37] JOKERST, J. V., T. LOBOVKINA, R. N. ZARE a S. S. GAMBHIR. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine*. 2011, **6**(4), 715-728.
- [38] CHEN, Y., Y. XIANYU a X. JIANG. Surface Modification of Gold Nanoparticles with Small Molecules for Biochemical Analysis. *American Chemical Society*. 2017, (50), 310-319.
- [39] SMITH, B. R., S. S. GAMBHIR a X. JIANG. Nanomaterials for In Vivo Imaging. *Chemical Reviews*. 2017, **117**(50), 901-986.
- [40] LOUREIRO, A., N. G. AZOIA, A. C. GOMES a A. CAVACO-PAULO. Albumin-Based Nanodevices as Drug Carriers. *Current Pharmaceutical Design*. 2016, **22**(10), 1371 - 1390.
- [41] WANG, W., Q. Q. WEI, J. WANG, B. C. WANG, S. H. ZHANG a Z. YUAN. Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or coagulant? *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013, **404**(2013), 223–229.
- [42] YOO, J., Ch. PARK, G. YI, D. LEE a H. KOO. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers*. 2019, **11**(640), 1-13.
- [43] GHOTBI, Z., A. HADDADI, S. HAMDY, R. W. HUNG, J. SAMUEL a A. LAVASANIFAR. Active targeting of dendritic cells with mannan-decorated PLGA nanoparticles. *Cancers*. 2011, **19**(4), 281-292.
- [44] MI KYONG, Y., P. IN YOUNG, K. IN YOUNG, P. IN KYU a K. JIN-SOOK. Active targeting of dendritic cSuperparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Coated with Mannan for Macrophage Targeting. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2011, **8**(10), 5196-5202.
- [45] Using UV-VIS as a tool to determine size and concentration of Spherical Gold Nanoparticles (SGNPs) from 5 to 100 nm. © *Nanopartz™, a division of Concurrent Analytical Inc.* 2008, 1-3.
- [46] DUNE SCIENCES, INC. Particle Size Analysis SOP: Particle Size analysis of nanomaterials using ImageJ/Fiji. *Smart grids*. 2011, 1-7.

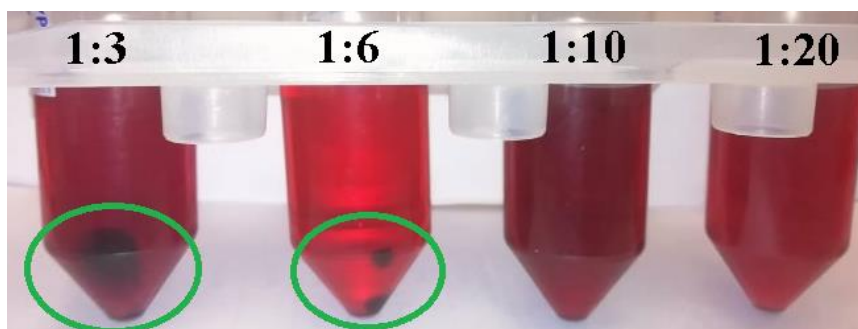
- [47] ZHONG, L., Y. LIU, L. XU a kol. Exploring the relationship of hyaluronic acid molecular weight and active targeting efficiency for designing hyaluronic acid-modified nanoparticles. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2019, **14**(5), 521-530.
- [48] TURÁNEK, J., M. LEDVINA, M. RAŠKA a kol. Hyaluronic Acid Surface Modified Liposomes Prepared via Orthogonal Aminoxy Coupling: Synthesis of Nontoxic Aminoxylipids Based on Symmetrically α -Branched Fatty Acids, Preparation of Liposomes by Microfluidic Mixing, and Targeting to Cancer Cells Expressing CD44. *Bioconjugate Chemistry*. 2018, **29**(7), 2343 -2356.
- [49] GUPTA, R. C., R. LALL, A. SRIVASTAVA a A. SINHA. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019, **6**(192), 1 - 24.
- [50] NOVOA-CARBALLAL, R. a A. H. E. MULLER. Synthesis of polysaccharide-b-PEG block copolymers by oxime click. *ChemComm*. 2012, **48**(31), 3781–3783.
- [51] KÖLMEL, D. K. a E. T. KOOL. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* 2017, **117**(15), 10358-10376.
- [52] LARSEN, D., A. M. KIETRYS, S. A. CLARK, H. S. PARK, A. EKEBERGH a E. T. KOOL. Exceptionally rapid oxime and hydrazone formation promoted by catalytic amine buffers with low toxicity. *Chem. Sci.* 2018, **9**(23), 5252-5259.
- [53] LIU, X. a H. S. S. QHATTAL. Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes. *Mol. Pharmaceutics*. 2011, **8**(4), 1233–1246.
- [54] HAE-YONG, S., N. S. REJINOLD, L. M. KAMALI, Ch. KONDAREDDY, P. IN-KYU a K. YEU-CHUN. CD44 targeting biocompatible and biodegradable hyaluronic acid cross-linked zein nanogels for curcumin delivery to cancer cells: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*. 2018, **280**(10), 20-30.
- [55] ELAHI, N., M. KAMALI a M. H. BAGHERSAD. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*. 2018, **184**, 537-556.
- [56] STUCHINSKAYA, T., M. MORENO, M. J. COOK, D. R. EDWARDS a D. A. RUSSELL. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody–phthalocyanine–gold nanoparticle conjugates†. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011, **10**(5), 822-831.
- [57] VINES, J. B., J. H. YOON, N. E. RYU, D. J. LIM a H. PARK. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front Chem*. 2019, **7**(167), 1-16.
- [58] Ortiz, R., Olsen, S., & Thormann, E. (2018). Salt-Induced Control of the Grafting Density in Poly(ethylene glycol)Brush Layers by a Grafting-to Approach. *Langmuir*, **34**(15), 4455-4464.
- [59] THOBHANI, S., S. ATTREE, R. BOYD, N. KUMARSWAMI a J. NOBLE. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *Journal of Immunological Methods*. 2010, **356**(2), 60-69.
- [60] BALVAN, J., M. RAUDENSKÁ, M. MASÁŘÍK a R. KIZEK. Analýza programované buněčné smrti průtokovou cytometrií. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014, **3**, 60–63.
- [61] HOSSEINZADEH, H., F. ATYABI, B. S. VARNAMKHAISTI, R. HOSSEINZADEH, S. N. OSTAD, M. H. GHAHREMANI a R. DINARVAND. SN38 conjugated hyaluronic acid gold nanoparticles as a novel system against metastatic colon cancer cells. *International Journal of Pharmaceutic*. 2017, **526**(2), 339-352.

6 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

Zkratka	Vysvětlení zkratky
AuNPs	nanočástice zlata
BLT	bioluminiscenční tomografie
CT	počítačová tomografie
DLS	dynamický rozptyl světla
ELFO	elektroforéza
EPR efekt	efekt permeace a retence
FLT	fluorescenční tomografie
HA	kyselina hyaluronová
PEG	polyethylenglykol
PET	pozitronová emisní tomografie
PI	propidiumjodid
PVA	polyvinylalkohol
PVME	polyvinylmethyleter
PVP	polyvinylpyrrolidin
MRI	magnetická rezonance
RES	retikuloendoteliální systém
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie
SPR	povrchová plasmonová rezonance
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
US	ultrazvuk
σ	směrodatná odchylka

7 PŘÍLOHY

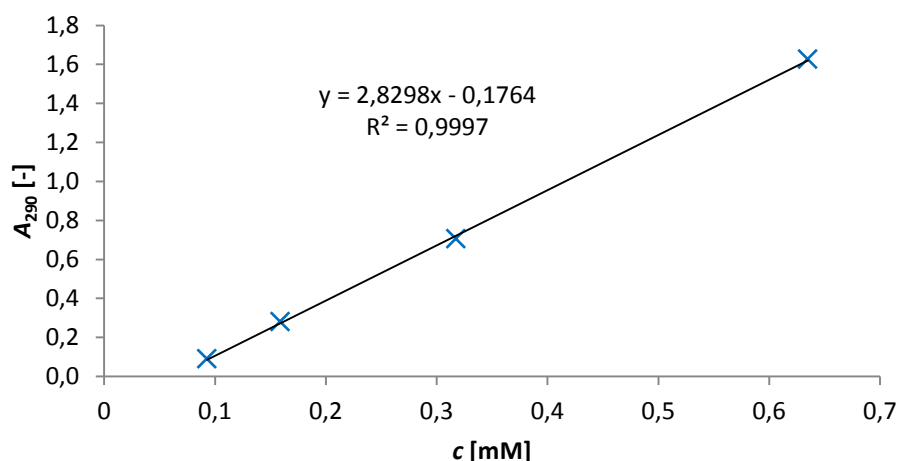
7.1 Příloha 1



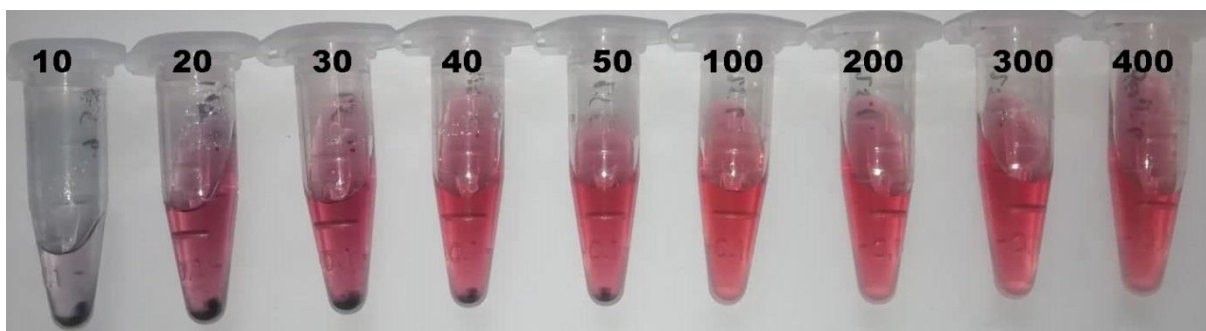
V této příloze jsou zachyceny zkumavky s připravenými AuNPs z experimentu optimalizace po půl roce. Poměr nad jednotlivými zkumavkami zachycuje látkové množství zlata ku látkovému množství citrátu. Je jasně vidět, že v prvních dvou zkumavkách je přítomno značné množství sedimentu vytvořeného v důsledku agregace částic. U zbylých dvou vzorků se tento sediment nevyskytuje. Tento obrázek tedy potvrzuje, že závěr z experimentu optimalizace byl správný a nejvhodnějším látkovým množstvím citrátu sodného pro stabilizaci AuNPs je opravdu množství 10x větší než zlata.

7.2 Příloha 2

Oblast platnosti Lambert-Beerova zákona pro Au^{3+} ionty, kdy pracovní roztok zlata byl 2x, 4x, a 6x zředěn a byla u něj změřena absorbance při 290 nm, tedy vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu. Je vidět, že závislost absorbance na koncentraci je lineární, tudíž vypočítaná hodnota koncentrace pracovního roztoku zlata by měla být správná a odpovídat skutečnosti.

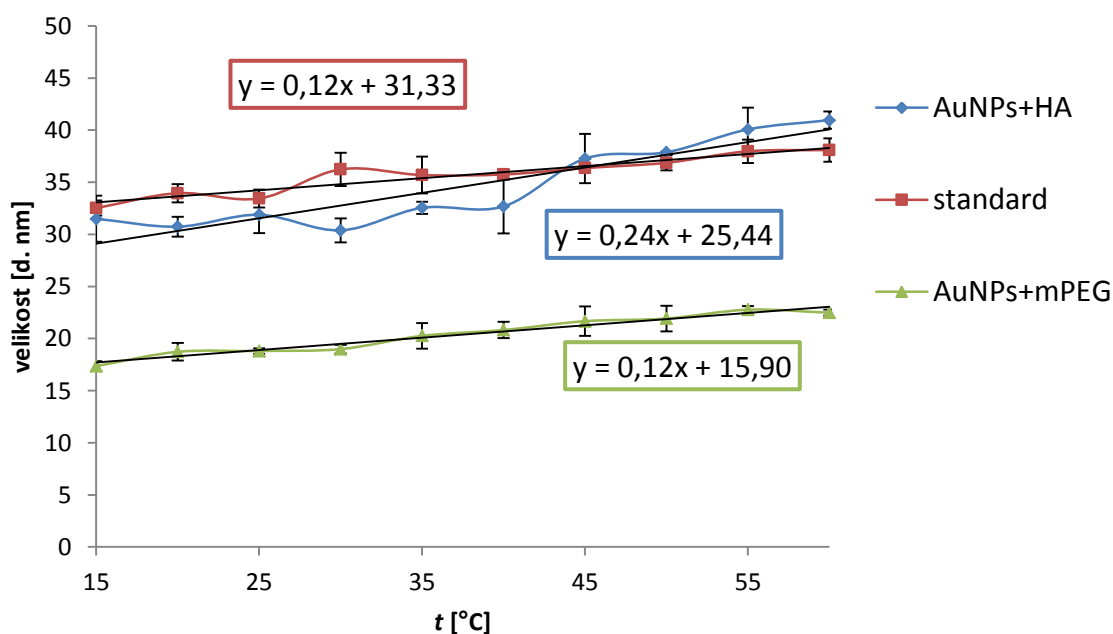


7.3 Příloha 3



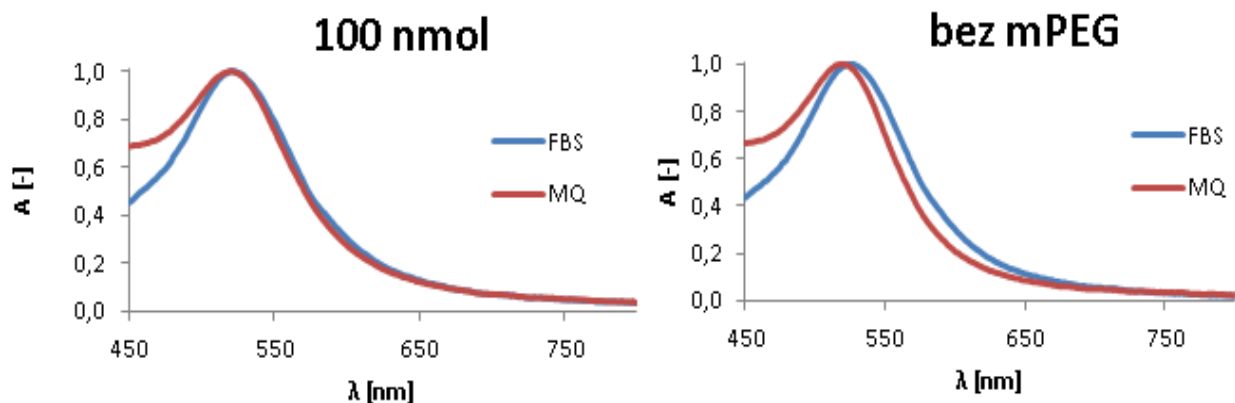
Na tomto obrázku jsou zachyceny zkumavky s AuNPs modifikovanými různým množstvím mPEG–SH měsíc po modifikaci. Čísla nad zkumavkami pak odpovídají látkovému množství mPEG–SH na 1 mg Au. Tento obrázek opět dokazuje, že AuNPs jsou dostatečně stabilizovány až od látkového množství 100 nmol, jelikož u nižšího množství je ve zkumavkách přítomný sediment tvořený vysráženými nanočásticemi.

7.4 Příloha 4



Obrázek zachycuje závislost velikosti 50 nm polystyrenového standardu, AuNPs modifikovaných 100 nmol mPEG–SH na 1 mg Au a AuNPs s navázanou kyselinou hyaluronovou na teplotě. Stejně jako u modifikovaných AuNPs, i u standardu dochází s rostoucí teplotou k nárůstu velikosti a to se zhruba stejnou směrnici lineární regrese. Nárůst velikosti je tedy pravděpodobně způsobený chybou měření přístroje.

7.5 Příloha 5



Obrázek zachycuje AuNPs modifikované 100 nmol mPEG-SH na 1 mg Au a nemodifikované AuNPs v prostředí 80% FBS a Mili-Q vody (v legendě obrázku MQ). Zatímco modifikované AuNPs jsou ve FBS stabilní a spektra v prostředí FBS a Mili-Q vody jsou stejná, povrch nemodifikovaných AuNPs není stericly chráněn. To se projevuje v prostředí FBS oproti vodě Mili-Q posunem absorpčního maxima z 519 nm na 524 nm vlivem navázání molekul proteinů na jejich povrch.