

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Makromolekulární chemie



Bc. Zdislava Pechrová

Funkční nanodiagnostika pro ^{31}P zobrazování magnetickou rezonancí: Nové
paradigma pro kontrastní látky
Functional nanodiagnostics for ^{31}P magnetic resonance imaging: New paradigm for
noninvasive imaging agents

Diplomová práce

Školitel: **Mgr. Martin Hrubý, Ph.D., DSc.**

Praha, 2019

Prohlášení

Já, Zdislava Pechrová, prohlašuji, že diplomovou práci „Funkční nanodiagnostika pro ³¹P zobrazování magnetickou rezonancí: Nové paradigma pro kontrastní látky“ jsem vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem uvedla.

Poděkování

Děkuji Mgr. Martinu Hrubému, Ph.D., DSc a Mgr. Volodymyru Lobazovi, Ph.D., za jejich cenné rady a pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji panu Mgr. Łukaszi Rafałowi Konefałowi Ph.D. za změření NMR spekter. Poděkování také patří mým rodičům a celé rodině za morální, psychickou i finanční podporu během mého studia.

Abstrakt

Náplní mojí diplomové práce je vývoj koncepčně nové třídy kontrastních látek pro ^{31}P zobrazení magnetickou rezonancí (MRI). Tyto kontrastní látky jsou založeny na nanočásticích fytátu vápenatého (CaIP_6), což je sůl kyseliny fytové (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfátu). Fytát je běžně přítomen v rostlinách (zejména v semenech a zrnech). Není biologicky rozložitelný, ale je netoxický pro zvířata i lidi a kolem 22 % jeho hmotnosti tvoří fosfor, což je využitelné pro ^{31}P NMR / MRI.

Tyto nanočástice CaIP_6 jsou dopovány paramagnetickými ionty Fe^{3+} , které rozšiřují signál ^{31}P , čímž jsou nanočástice ve zdravých tkáních neviditelné. V přítomnosti bakterií produkujících siderofory (například v *Helicobacter pylori* v žaludečních vředech), je Fe^{3+} uvolňován rechelatací z nanočástic a ^{31}P a signál je opět detekovatelný. *In vitro* simulace tohoto uvolnění byla modelována deferoxaminem, což je bakteriální siderofor ze *Streptomyces pilosus* s vysokou afinitou k iontům Fe^{3+} .

Nanočástice CaIP_6 byly syntetizovány dvěma způsoby. První cestou je přímé srážení fytátu vápenatou solí. Druhou možností je iontová výměna fosfátu v nanočásticovém hydroxyapatitu, který vytváří elektrostaticky stabilizované nanočástice fytátu vápenatého.

Nejllepší metodou na přípravu dopovaných částic se ukázala syntéza srážením fytátu vápenatou solí. Tyto vzorky, označené jako CaIP_6 2, měli dostatečné rozšíření ^{31}P signálu při obsahu Fe^{3+} 2,1 mol%. Dva vzorky s různou koncentrací Fe^{3+} (2,1 mol% Fe^{3+} a 8,1 mol% Fe^{3+}) se rekomplexovali s deferoxaminem, kde u obou vzorků po dvou hodinách byly všechny Fe^{3+} ionty uvolněny z částice. Obnova signálu byla také pozorována ^{31}P NMR, kde byl veliký rozdíl mezi signálem před a po přidavku deferoxaminem.

Abstract

The topic of my Master degree thesis is the development of a conceptually new class of contrast agents for the ^{31}P magnetic resonance imaging (^{31}P MRI). These agents are based on nanoparticles of calcium(II) phytate. Phytate (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate) is largely present in plants, seeds and grains. It is non-biodegradable but nontoxic for animals and human beings and most importantly around 22% of its mass is phosphorus, so it is easily detectable by ^{31}P NMR/MRI.

These nanoparticles of Ca(II) phytate were doped with paramagnetic Fe^{3+} ions which broaden the ^{31}P signal, making the nanoparticles invisible in healthy tissues. In the presence of bacteria producing siderophores (for example in *Helicobacter pylori* in gastric ulcers), Fe^{3+} is released from the gel and ^{31}P MRI signal becomes detectable. In vitro simulation of this release was performed with deferoxamine, a compound possessing high affinity to Fe^{3+} ions forming coloured complex with it exploitable for the UV-VIS evaluation.

The Ca(II) phytate can be synthesized in two possible ways. The first way is by direct precipitation of the Ca^{2+} salt with sodium phytate. The second way is ion exchange of phosphate in the nanoparticles of hydroxyapatite which creates electrostatically stabilized calcium phytate nanoparticles. Both these ways were tested and compared.

Preparation of the nanoparticles from hydroxyapatite was successful, size of these particles is around 100nm. However, synthesis of Ca(II) phytate nanoparticles doped with Fe^{3+} was partly problematic and needs further optimization.

The best method for preparing doped particles has been the synthesis by aggregation of sodium phytate by calcium salt. These samples, referred to as CaP₆ 2, had a sufficient ^{31}P broadening of signal with concentration of Fe^{3+} 2,1 mol%. Two samples with different concentration (2,1 mol% Fe^{3+} a 8,1 mol% Fe^{3+}) were complexated with deferoxamine, where in both cases all of Fe^{3+} ions were released from the phytate after two hours. Signal restoration was also observed on ^{31}P NMR, where there was a significant difference in signal intensity before and after addition of deferoxamine.

1 Teoretický úvod

1.1 Nanočástice a koloidy

Nanočástice jsou jakkoliv tvarované částice, jejichž rozměry jsou v rozmezí jednotek až desítek nanometrů. Tato tematika je v současné době oblastí intenzivního vědeckého výzkumu, a to díky široké škále potenciálních aplikací v biomedicínských, optických a elektronických oborech.

Nanočástice vykazují řadu speciálních navzájem propojených vlastností vzhledem k větším částicím chemicky totožného materiálu, zejména: (1) jsou vysoce mobilní ve volném stavu; (2) mají velký specifický povrch a (3) mohou vykazovat tzv. kvantové efekty.¹

Nanočástice lze rozdělit do různých typů podle velikosti, tvaru, vnitřní struktury a vlastností materiálu. Některé klasifikace rozlišují mezi organickými a anorganickými nanočásticemi; první skupina zahrnuje např. dendrimery, liposomy a polymerní nanočástice, zatímco druhá zahrnuje např. kvantové tečky nebo nanočástice zlata. Jiné klasifikace dělí nanočástice na tvrdé (např. částice zlata, oxidu křemičitého nebo titaničitého) respektive měkké („soft matter“; např. liposomy, vezikuly a nanokapky).²

Koloidy je termín užívaný pro systémy obsahující jednu substanci jemně dispergovanou v druhé. Tyto látky se označují jako dispergované respektive disperzní medium. Koloidní systémy mohou být pevné, kapalné nebo plynné. Termín byl poprvé užit v roce 1861 Thomasem Grahamem k popsání „pseudoroztoků“ ve vodném roztoku chloridu stříbrného, síry a berlínské modři, které připravil Francesco Selmi v půlce devatenáctého století. Graham vyvodil, že velikost koloidů bude v řádu jednotek až tisíců nanometrů. Tento rozsah velikostí se překrývá s rozsahem velikostí nanočástic (1-100 nm). Rozdíl je v podstatě sémantický pro částice o velikosti menší než 100 nm. Alternativě se tento rozsah někdy také nazývá „mesoscale“. ^{1,2,3}

1.1.1 Kyselina fytoová

Kyselina fytoová, systematickým názvem *myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát (IP₆) se vyskytuje ve velkém množství v rostlinách, zejména v jejich semenech a zrnech. Její soli se

nazývají fytáty, které se v přírodě nacházejí jako smíšené vápenaté a hořečnaté soli (fytin). Okolo 60-90 % veškerého organického fosforu v rostlinách se vyskytuje ve formě fytinu.

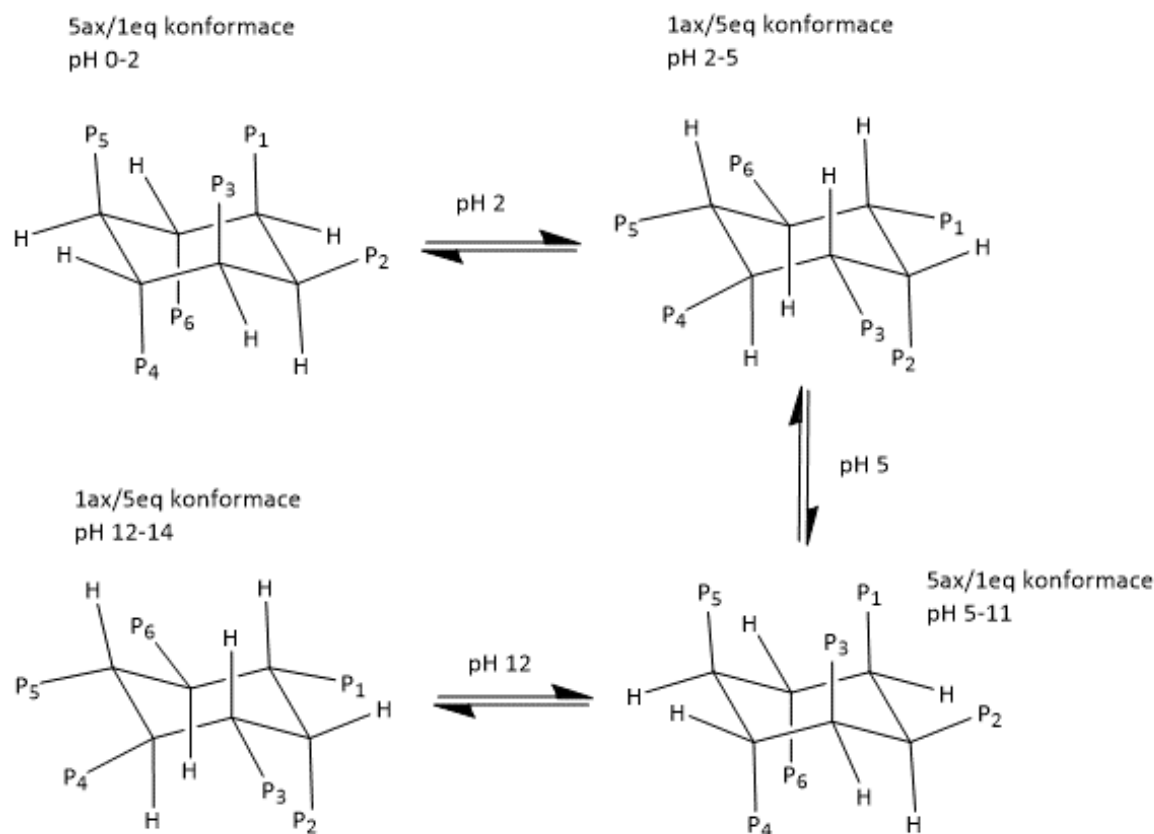
IP₆ se také nachází v krvi zvířat, kde má důležitou roli jako kofaktor hemoglobinu v regulaci transportu kyslíku v lidské krvi. Hojná přítomnost fytátu v biologických systémech zaručuje jeho vysokou biokompatibilitu.⁴

Fytázy jsou enzymy rozkládající IP₆. Jsou součástí skupiny fosfatáz, které jsou schopné katalyzovat sekvenční hydrolyzu IP₆ na inositol fosfát a v některých případech i na inositol.

Podobně jako ostatní organické fosforečnany fytát zabraňuje tvorbě zubního kazu silnou adsorpcí na povrch zubní skloviny. Další studie poukazují na schopnost fytátu předejít vzniku ledvinových kamenů, diabetes mellitus, ateroskleróze a ischemické srdeční chorobě. Kyselina fytová a její deriváty hrají důležitou roli při exportu RNA, opravě DNA rekombinací, při endocytóze a transportu přes vesikuly.⁵ Některé studie naznačují antikarcinogenní a antimutagení vlastnosti IP₆.⁶

IP₆ má vysokou vazebnou kapacitu pro kationty díky záporně nabitým fosfátovým skupinám, chelatuje vícemocné kationty kovů a brání jejich příjmu z trávicího traktu. To může vést až k nežádoucímu snížení biologické dostupnosti kovů jako jsou Zn²⁺, Fe^{2+/3+}, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ a Cu²⁺ z potravy.

Konformace IP₆ byla předmětem velkého zájmu. V pevném stavu hydratovaná sodná sůl fytové kyseliny (Na₁₂IP₆) zaujímá konformaci, která má pět fosfátů v axialní (ax) a jeden fosfát v equatorialní (eq) pozici (5ax/1eq). Důvodem pro tuto stericky bráněnou konformaci je snížení elektrostatické repulze mezi pěti dianionovým fosfáty v ekvatoriální poloze a stabilizace axialního fosfátu koordinací se sodnými ionty a vodíkovými vazbami s vodou.⁷



Obrázek 1 – 5ax/1eq a 1ax/5eq konformace kyseliny fytové a jejich změna při změnách pH. P = $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$ nebo $-\text{OPO}_3^{2-}$, záleží na protonaci fosfátové skupiny dle pH. Číslování fosfátových skupin odpovídá číslu uhlíku cyklohexanu nesoucí fosfátovou skupinu.. Upraveno podle ref.⁸.

V roztoku koexistují dvě formy, axiální (5ax/1eq) a ekvatoriální (1ax/5eq). Emsley a Niazi pomocí ^{31}P NMR studie navrhli, že ekvatoriální poloha je stabilní při pH nad 12, axiální mezi pH 11 - 5 a znovu se převrátí na ekvatoriální při pH 5 a znovu na axiální při pH 2 v závislosti na protonaci respektive náboji fosfátových skupin.^{9, 10}

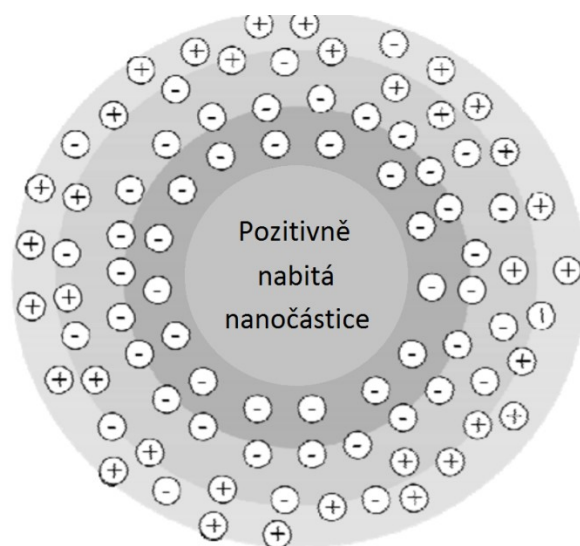
Proces disociace kyseliny doprovází konformační konverzi. Potenciometrické studie prokázaly, že IP_6 obsahuje šest silných kyselých skupin s $\text{pK}_a \sim 1,8$; dvě relativně slabě kyselé skupiny s $\text{pK}_a \sim 6,3$ a čtyři velice slabě kyselé skupiny s $\text{pK}_a \sim 9,7$.¹¹ Hodnoty pK_a 1,8; 6,3 jsou typické pro jednoduché monoestery fosfokyselin, ale třetí hodnota pK_a 9,7 je neobvykle vysoká, odrážející vodíkové vazby, které existují mezi fosfátovými skupinami.¹² Protikation má také vliv na pK_a , například studie s tetrabutylammoniem vedla k pK_a hodnotám 1,1 – 2,1 (6 protonů), 5,7 (1 proton), 6,8 – 7,6 (2 protony) a 10 - 12 (3 protony).¹³

1.1.1.1 Příprava nanočástic fytátu vápenatého

Částice fytátu vápenatého (CaIP_6) jsou nestabilní v roztoku, mají tendenci aglomerovat a srážet se téměř ihned. Proto musí být stabilizovány, tj. přitažlivé síly musí být kompenzovány odpuzujícími silami. Obecně se používají dva typy stabilizace: elektrostatická a sterická adsorpcí molekuly jako sterické překážky.

Specifická adsorpce aditiv nebo iontů na povrch částice, i v malých koncentracích, může vyvolat dramatickou změnu v zeta potenciálu. Zeta potenciál představuje rozdíl v elektrickém potenciálu mezi vrstvou iontů obklopující částici a okolní kapalinou. Elektrostatická stabilizace zahrnuje vytvoření elektrické dvojevrstvy, tvořené ionty adsorbovaných na povrchu částice a asociovanými ionty, které obklopují částici. Pokud je absolutní hodnota zeta potenciálu spojená s dvojevrstvou dostatečně vysoká (menší než -30 mV respektive větší než $+30 \text{ mV}$), Coulombické odpuzivé síly mezi částicemi zabrání jejich aglomeraci.

Stérická stabilizace může být dosažena adsorpcí velkých molekul, jako jsou např. polymery, na povrch nanočástic.



Obrázek 2 – Schematické znázornění elektrostatické stabilizace pozitivně nabitě nanočástice nabitím povrchu protiionty. Upraveno podle ¹⁴

In-situ srážení CaIP_6 se používá společně s radioaktivním značením jako disperze pro scintigrafii v játrech a slezině a je dostupný jako komerční kit značený $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Velikost těchto nanočástic je okolo 100 - 300 nm, ale stabilita je pouze okolo 6 hodin.¹⁵ Proto se hledají další způsoby přípravy nanočástic s větší stabilitou. Také koncentrace fytátu stačí pouze pro radionuklidové měření, ale není dostatečná pro MRI.

Metody přípravy koloidu nanočástic fytátu vápenatého popsal Ganesan.⁸ Přímá syntéza fytátu vápenatého smícháním vápenaté soli s fytovou kyselinou nevede ke stabilnímu koloidu, pravděpodobně kvůli agregaci.

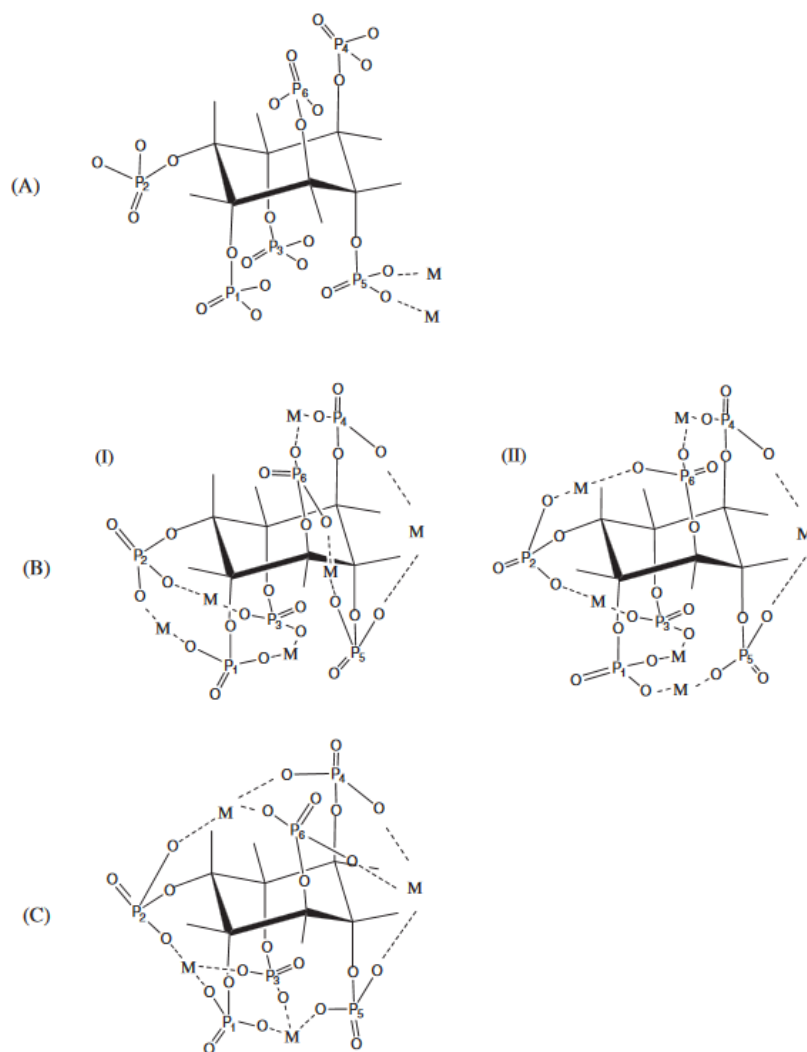
Pro přípravu stabilních fytátových koloidů byl použit fosforečnan vápenatý jako jádro částice, při reakci došlo k výměně fosforečnanu za fytát. Pro přípravu bylo použito úzké rozmezí koncentrací fosforečnanu vápenatého ku NaIP_6 . Nejlepší výsledky byly obdrženy, když byl poměr molárních koncentrací mezi 2,5:1 a 1,25:1. Touto cestou se zabránilo vytvoření nerozpustné sraženiny adsorpcí negativně nabitých fytátového aniontů na povrch nanočástic. Výsledkem byly částice s vysokým negativním nábojem na povrchu, který zabránil další aglomeraci. Tyto koloidy byly stabilní až dva týdny.

Když byl poměr vyšší, (tj. větší obsah fosforečnanu vápenatého), částice stále obsahovaly fosfát vápenatý a byly nalezeny jenom aglomerované částice, které se rychle vysrážely, pravděpodobně kvůli nedostatečné elektrostatické stabilizaci. Když byl poměr menší (větší obsah fytátu), převažoval rozpustný komplex vápník - fytát.

1.1.1.2 Soli kyseliny fytové

Struktura fytové kyseliny obsahuje 6 fosfátových skupin vázané esterovou vazbou na inositol a obsahuje dva vyměnitelné vodíky. Tyto dvě ne-esterové hydroxylové skupiny by měly předávat některé anorganické vlastnosti, což vede k interakcím fytátu s různými kovovými ionty a v prostředí se tvoří různé rozpustné nebo nerozpustné sloučeniny (fytátové soli).

V různých studiích byl zkoumán účinek kationtů (Na^+ , Ca^{2+} , Al^{3+} a Fe^{3+}) a několika organických ligandů na hydrolyzu fosfatátových skupin IP_6 . Výzkum ukázal, že Al^{3+} a Fe^{3+} inhibují fosfatázovou hydrolyzu (defosforylaci) precipitací fytátu. V závislosti na poměru kov/ligand byla tato inhibice snížena nebo zcela odstraněna přidáním organických ligandů.¹⁶



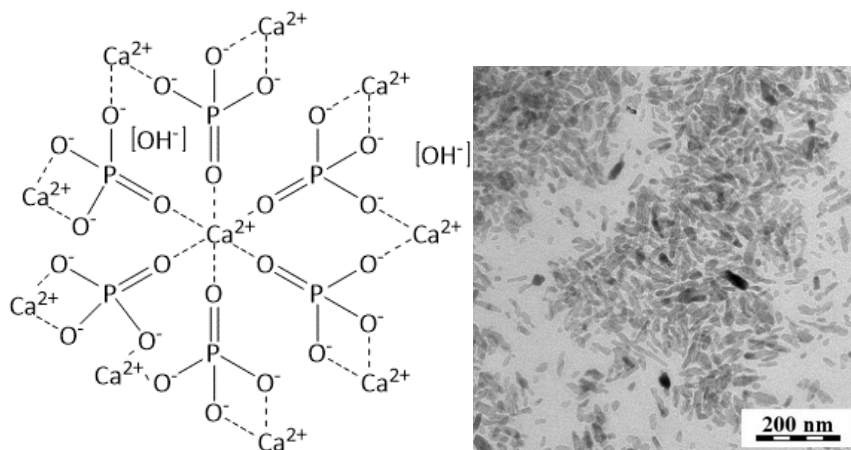
Obrázek 3 - Možné struktury fytátu kovů A) Iontová 5a/1eq konformace připisovaná struktuře Na_{12}P_6 . Pro lepší přehlednost jsou vazby kovu zobrazeny jenom na P5. B) konformace koordinační vazby M^{2+} iontu. C) Konformace koordinační vazby M^{3+} iontu. Upraveno podle ref.¹⁸.

Dříve byla popsána syntéza amorfních nestechiometrických solí fytátu s Ca^{2+} a Fe^{3+} .¹⁷ Originální židličková struktura 5a/1eq v Na_{12}P_6 se rozruší vlivem síly mezi fosfátovými skupinami a více valenčními kationty. Rozdíl je také na FTIR spektrech, kde byl viděn u lehkých divalentních kovů ostrý a široký pík u vlnočtů 1130 cm^{-1} , respektive pro trivalentní ionty kovů široký pík.¹⁸

Bertsch a col¹⁸ ukázal rozdíl, že ortofosforečnany kovů mají různé FTIR spektrální charakteristiky než fytátové analogy. Unikátní vlastnosti fytátu kovů od 1000 do 700 cm^{-1} se může použít na rozlišení fytátové sloučeniny od fosforečnanu kovů.

1.1.2 Hydroxyapatit

Hydroxyapatit (HAP) je biokompatibilní, biodegradovatelná a bioaktivní látka, která je hlavní část kalcifikovaných tkání. HAP v kostech je převážně tvořen jehlicovitými nanokrystaly o šířce přibližně 5 - 20 nm a délce 60 nm, se špatně krystalizovanou nestechiometrickou apatitovou fází obsahující CO_3^{2-} , Na^+ , F^- a ostatními ionty v matici kolagenu. Biomateriály z fosfátu vápenatého jsou široce používány v klinické praxi ve formě prášků, granulí hustých, porézních bloků a různých kompozitů. Současný výzkum se zabývá novými formulacemi HAP zaměřenými na lepší a účinnější biomedicínské aplikace, pro které je potřeba tento materiál s vlastnostmi blíže ke kosti živých organismů, zejména pokud jde o velikost a strukturu.¹⁹ Struktura a TEM obraz komerčně dostupných nanočástic hydroxyapatitu s velikostí 100 nm je na obrázku 4.



Obrázek 4 - Struktura HAP a TEM obraz komerčně dostupných nanočástic.

Existují různé metody pro přípravu HAP. Mezi ně patří mechanochemická syntéza (např. náhrada křemičitanu nebo zirkonátu za fosforečnan) a různé techniky chemie za mokra, jako je přímé srážení z vodných roztoků, elektrochemické ukládání, postup sol-gel, hydrotermální syntéza apod. Chemická precipitace z vodných roztoků poskytuje všestrannou a ekonomickou cestu. Nicméně mikrostruktura a vlastnost výsledných suspenzí HAP značně liší se syntetickými proměnnými. Hodnota pH reakčního systému je klíčová pro tvorbu HAP. Teplota, čistota výchozích látek a postup míchání reaktantů mají rovněž velký význam pro tvorbu HAP.²⁰

Hlavní nevýhodou tohoto materiálu jsou špatné mechanické vlastnosti. Pro zlepšení těchto nedostatků se zkoumalo několik přístupů, jeden z nich je dopování HAP kompozitů s různými ionty a pomocí slinování bylo prokázáno, že zlepšují mechanické vlastnosti.

Nanočástice HAP obsahující některé magnetické ionty vykazují silné feromagnetické vlastnosti. To se používá pro medicínské aplikace například po nahrazení Ca^{2+} za Fe^{3+} nebo ionty kobaltu pro zobrazování magnetickou rezonancí (jako T_2 kontrastní činidlo pro ^1H MRI), separaci buněk, drug delivery a hypertermickou léčbu nádorových onemocnění.²⁰

Příprava nanočástic HAP dopováním byla popsána v publikaci Kalkura et al.²¹ Jejich výzkum ukázal, že při dopování Fe^{3+} se zmenšila velikost částice a stupeň krystalinity spolu se značným nárůstem tvrdosti.

1.2 Neinvazivní zobrazování v medicínských aplikacích

Neinvazivní zobrazovací metody jsou široce používány v medicínských, vědeckých a technologických aplikacích, zejména kvůli jejich vizuální a intuitivní vypovídací schopnosti. Například je takto možná vizualizace celých orgánů nebo složitých biologických procesů.²²

Ačkoliv existuje mnoho zobrazovacích technik, nové a dokonalejší techniky jsou stále vyvíjeny. Nicméně, nové zobrazovací nástroje (nebo vylepšení stávajících zařízení) obvykle vyžadují velké úsilí a zdroje při vývoji než mohou být použity v laboratoři nebo v nemocnicích. Z ekonomických a praktických důvodů je proto vhodnější vyvíjet doplňky, které mohou maximalizovat schopnosti současných zařízení nebo nástrojů.

Jedním z nejúčinnějších doplňků jsou sloučeniny, označující se jako zobrazovací sondy nebo kontrastní činidla, které zlepšují kontrast obrazu.

Biomedicínské zobrazování v poslední době, budí pozornost díky své analytické a diagnostické schopnosti na molekulární nebo buněčné úrovni. Výsledkem je nový obor, "molekulární zobrazování", které kombinuje molekulární biologii s in-vivo zobrazováním.²³

Mezi zobrazovací metody se řadí rentgenová počítačová tomografie (CT), optické zobrazování, magnetická rezonance (MRI), pozitronová emisní tomografie (PET), jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT) a ultrazvuk. Tyto techniky umožňují v reálném čase vizualizaci buněčných funkcí živých organismů a souvisejících interakcí

v neinvazivním nebo minimálně invazivním režimu. Každá z těchto diagnostických metod má své výhody a nevýhody. Například MRI a CT mají vysoké prostorové rozlišení a jsou schopné poskytnout podrobné anatomické informace, ale postrádají citlivost. Naproti tomu PET a SPECT jsou vysoce citlivé, ale mají omezené rozlišení a neposkytují anatomické informace.²⁴

Prostřednictvím vývoje vysoce specializovaných a účinných kontrastních látek se MRI vyvinula ve značně univerzální techniku a stala se jedním z nejvýkonnějších neinvazivních zobrazovacích nástrojů pro biomedicínu. Vysoké rozlišení a vynikající kontrast měkkých tkání jsou jeho hlavními výhodami oproti jiným *in-vivo* zobrazovacím technikám. MRI se spoléhá na velká magnetická pole a radiové frekvence (RF) a využívá relaxačních časů protonů v mobilních molekulách, jako jsou voda, lipidy a proteiny, které jsou přítomny v orgánech při různých koncentracích, k produkci vysoce rozlišených snímků anatomie měkkých tkání.²⁵

Obrovský pokrok v nanotechnologiích vedl k vývoji nových typů sond na bázi nanočástic. Výhodou je upravitelnosti povrchu nanočástic, které mohou potenciálně prodloužit dobu cirkulace činidla v krvi nebo cílit na specifické místo v těle. Nanočástice dále mohou působit jako multimodální činidla, mohou mít dvě a více vlastností, které mohou být použity současně ve více zobrazovacích technikách.²⁶

1.2.1 Základní princip zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)

Kontrast označuje rozdíly signálu mezi sousedními oblastmi v organismu. Kontrastní činidla pro rentgenová a CT vyšetření jsou založena na rozdílu elektronové hustoty. Kontrastní mechanismus pro MRI je však složitější, protože ke zvýšení kontrastu dochází například v důsledku interakce mezi kontrastními činidly a sousedními protony vody, která může být ovlivněna mnoha vnitřními a vnějšími faktory, jako je protonová hustota a pulzní sekvence MRI. Základní princip MRI je založen na nukleární magnetické rezonanci (NMR).

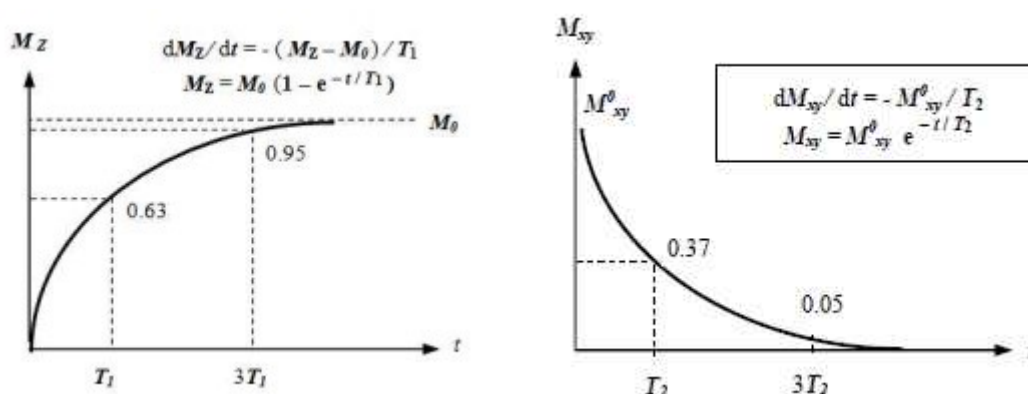
Když jsou jádra protonů vystavena silnému magnetickému poli, jejich spiny se orientují buď paralelně nebo antiparalelně vůči vnějšímu magnetickému poli. V magnetickém poli jádra s nenulovým spinem vykonávají precesní pohyb pod specifickou frekvencí, známý jako Larmorova frekvence. Když je rezonanční frekvence v RF stejná jako frekvence jader, protony absorbují energii a jsou excitovány do antiparalelního stavu. Po vymizení RF pulsu se excitovaná jádra relaxují do svého počátečního, nízkoenergetického stavu.

Jádro v daném chemickém prostředí ve skutečnosti nepociťuje aplikované magnetické pole B_0 , ale spíše lokální pole, které se liší od B_0 podle chemického okolí daného jádra. Měří se chemický posun, delta, relativní k nějakému vnějšímu nebo vnitřnímu standardu a vyjadřuje se v jednotkách ppm jako

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad (1)$$

Kde ν_{ref} je frekvence reference v hertz a ν_s je frekvencí vzorku v Hz.

Jádra po vystavení RF pulzu se vrací do svého původního stavu relaxací. Existují dvě různé relaxační cesty. Při podélné, spin-mřížkové nebo T_1 -relaxaci se obnovuje rovnovážná magnetizace v ose z (M_z). Během druhé příčné, spin-spinové nebo T_2 -relaxaci dochází k ubývání magnetizace v rovině xy. Kontrastní činidla jsou na základě svých relaxačních procesů klasifikována jako kontrastní činidla T_1 a T_2 . Komerčně dostupné kontrastní látky T_1 jsou obvykle paramagnetické komplexy, zatímco kontrastní látky T_2 jsou založeny na nanočásticích oxidu železa, které patří mezi nejpoužívanější nanočásticová činidla.



Obrázek 5 - Příčná a podélná relaxace jader po vybuzení RF pulsem. Upraveno podle ref ²⁷.

Podélná a příčná relaxace jsou nezávislé a simultánní procesy. T_2 relaxace je většinou mnohem kratší než T_1 a tento rozdíl umožňuje rozlišení tkání.

Ve většině případů kombinací vnitřní molekulové interakce sousedících molekul a heterogenity vnějšího magnetického pole pozorujeme kratší příčné relaxační časy než přirozené T_2 časy, přímo vyvolané spin-spinovými interakcemi. Aby se odstranily tyto nedostatky, používá se speciální sekvence spin-echo. Ta používá 90° puls na excitaci magnetizace a jeden nebo více 180° pulsů na refokusaci spinů, které generují signálové echo.²⁸

V současné době naprostá většina MRI vyšetření využívá zobrazení protonů vody kvůli velmi vysoké molární koncentraci vody v tkáních a z toho plynoucí vysoké citlivosti (navíc jádro ^1H má velmi výhodné parametry pro ^1H zobrazení).

1.2.2 ^{31}P NMR/MRI

Isotop ^{31}P má nenulový magnetický moment, a proto lze ho také sledovat magnetickou rezonancí. Z jader, která nemají kvadrupólový moment a mají spin $\frac{1}{2}$, má relativně velký gyromagnetický poloměr, který v kombinaci s jeho 100% přirozeným výskytem vede k dobré detekovatelnosti i při nižších intenzitách magnetického pole.

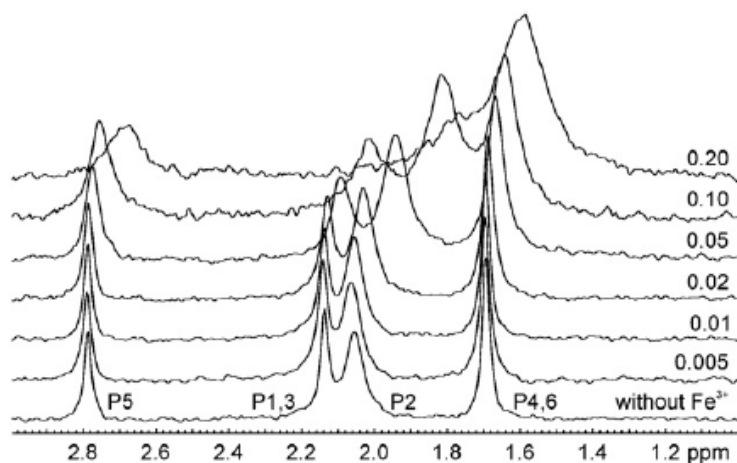
I když je protonové NMR stále citlivější, vykazuje některé významné nevýhody, zejména překrývající se rezonance v komplexních směsích nebo potřeba potlačení signálu rozpouštědla ve vodných roztocích. Navíc všudypřítomnost vody ve tkáních může vést k nedostatečnému kontrastu mezi sousedními tkáněmi.

Pro získání kvalitních ^{31}P NMR spekter se používá vodíkový dekaplink. Hlavními důvody jsou zjednodušení spekter (píky jsou lépe rozlišitelné, když je interakce s protony eliminována) a zvýšení intenzity signálu účinkem jaderného Overhauserova (NOE) efektu. Pokud ale jsou spektra analyzována kvantitativně, měla by být použita tzv. inverzní technika.

Rozsah chemický posunů látek obsahující ^{31}P je přes 700 ppm, od 500 to -200 ppm, jako reference se používá 85% H_3PO_4 .

Substituce na atomech kyslíku fosfátové skupiny ovlivňuje hustotu elektronů kolem jádra fosforu, a tím pádem i chemický posun ^{31}P . První změna může být při navázání kationtů na kyslík. Druhým důvodem může být změna pH, vyvolána jiným počtem protonů navázaných na fosfátové skupině.²⁹ Kromě toho chemický posun ^{31}P ovlivňuje teplota, iontová síla a přítomnost divalentních kationtů.

Paramagnetické ionty jako Mn^{2+} , Fe^{3+} nebo Gd^{3+} v sousedství mají velmi významný vliv na rezonanci fosfátu. Interakce s nepárovými elektrony paramagnetik může rozšířit rezonanční pík mnohonásobně, až tak, že při vysokém rozlišení a vysoké koncentraci paramagnetického iontu se signál může ztratit v šumu.³⁰



Obrázek 6 - Efekt vyšší koncentrace Fe^{3+} iontu na ^{31}P NMR signál IP_6 . Upraveno podle ref.³¹.

^{31}P NMR je jedinečným nástrojem pro detekci intracelulární vysokoenergetických fosfátů (např. ATP) a anorganických fosfátů (Pi) a využívá se pro zkoumání metabolismu mozku³² nebo fyziologii svalů. Výhodou této techniky je možnost neinvazivního sledování kinetiky důležitých metabolických reakcí, které zahrnují látky obsahující fosfor.³³

1.2.2.1 Funkční zobrazování

Zobrazování magnetickou rezonancí se považuje za jednu z nejlepších metod pro zobrazování anatomie vnitřních orgánů. Od 90 let minulého století se výzkum přesunul k funkčnímu zobrazování, k funkční magnetické rezonanci (fMRI).

Klasické funkční zobrazovací techniky jako PET a SPECT poskytují pohled na biologické chování, ale mají mnoho nevýhod. Funkční informace biodistribuce léků radioaktivně označených se zobrazují nukleárními technikami, bohužel výsledné obrazy mají špatné prostorové rozlišení a často se musí porovnávat s anatomickými obrazy pro interpretaci výsledků. Tento problém lze u MRI vyřešit spojením anatomického a funkčního zobrazování na jednom přístroji.³⁴

fMRI je založeno na klasickém MRI, které využívá klasickou NMR spojené s gradienty v magnetickém poli, aby vytvořili obrazy, které mohou zahrnout různé typy kontrastů, jako T_1 a T_2 kontrasty, rozdíly v susceptibilitě a magnetickém toku.

Hlavní výhodou fMRI je její relativně vysoké prostorové rozlišení a dostupnost. Technika je dostupná pro klinické i akademické testování, je neinvazivní a ve stejném čase

poskytuje i vysoce rozlišené anatomické sceny používané pro lokalizaci. Nevýhodou této metody je nevhodnost pro určité zobrazování, například při zobrazování mozku dochází ke ztrátě signálu způsobené rozdílem v magnetické susceptibilitě na rozhraní mozkomíšní mok/mozek.³⁵

1.2.2.2 MRI kontrastní látky

Endogenní MRI protonové kontrasty v měkkých tkáních pocházejí z místních rozdílů v hustotě protonů (koncentrace vody), což má za následek různé hodnoty T_1 a T_2 . Endogenní kontrasty závisí na chemické a fyzikální povaze tkáně. Navzdory poměrně vysoké kvalitě těchto obrazů měkkých tkání v některých případech není kontrast dostatečný pro diagnostiku sledované patologie. Nízká endogenní citlivost může být zvýšena zvýšením magnetického pole (z 3 T na 7 T a více), delším měřením nebo navržením více senzitivních sekvencí a prób. Důležitou alternativou je použití exogenních kontrastních látek.²⁵

Exogenní kontrastní látky mohou být složené z velkého množství rozličných chemických látek. Mohou to být malé mononukleární nebo polynukleární paramagnetické cheláty, metaloporfyriny, polymerní nebo makromolekulární nosiče kovalentně nebo nekovalentně vázaných paramagnetických chelátů, částicová kontrastní činidla a paramagnetické nebo superparamagnetické částice (např. oxidů železa a zeolitů značených Gd^{3+}), diamagnetické hyperpolarizační sondy (plyny a aerosoly) nebo ^{13}C - značené sloučeniny nebo ionty (např. Li^+).³⁶ Hlavní úlohou kontrastních činidel T_1 a T_2 v 1H MRI je zkrácení vybraných relaxačních časů vodních protonů, a tím poskytnutí lepšího kontrastu pro tuto oblast. Patologicky změněné tkáně jako jsou pevné nádory se metabolicky liší od zdravých tkání a kontrastní látku přijímají různými způsoby, což vede ke kontrastu v obrazech MRI. Obrazy tvořené T_1 kontrastními látkami dobře ilustrují anatomii a jsou preferovány, když je potřeba jasný obraz morfologické struktury. Obrazy T_2 kontrastních látek poskytují dobré patologické funkční informace, protože obraz abnormální tekutiny je jasnější než normální tkáňové pozadí.

První generace exogenních kontrastních činidel T_1 , označovaná také jako pozitivní kontrastní činidla, byla tvořena z paramagnetických kovových iontů s vysokým spinem, jako jsou ionty železa (Fe^{3+}), manganu (Mn^{2+}) nebo gadolinia (Gd^{3+}). Tato kontrastní činidla vytvářela velice intenzivní signál pro T_1 kontrastní obrazy. Aby se dosáhlo významných změn v relaxaci protonů, a tedy i dobrého kontrastu, musí být paramagnetický ion v těsném

kontaktu s protony okolních molekul vody. Vzhledem k toxicitě samotných iontů se většinou používají v komplexech s nízkomolekulárními chelatačními molekulami.

Jedno z omezení většiny T_1 kontrastních látek, ale zejména těch, které ovlivňují paramagnetické cheláty, je to, že jejich účinnost klesá při vyšších magnetických polích. Například při klinickém poli 3 T je T_1 relaxivita kontrastních látek na bázi Gd snížena až o jednu třetinu ve srovnání s jeho maximem a při vyšších magnetických polích klesá na nulu.

Vzhledem k jejich krátké cirkulaci krevním oběhem a obavám o toxicitu gadolinia (akumulace v mozku), se výzkum MRI posunul na kontrastní látky T_2 zejména na superparamagnetické oxidy železa.

T_2 kontrastní látky, také nazývané jako negativní kontrastní činidla, snižují intenzitu NMR signálu v oblastech, do kterých jsou podávány, a tak se postižené oblasti jeví tmavší. Jev je výsledkem heterogenicity magnetického pole okolo nanočástice přes kterou difundují částice vody. Difúze indukuje rozfázování magnetického momentů protonu, což zkrátí čas T_2 relaxace. T_2 zkrácení působí na delší vzdálenosti, zatímco T_1 vyžaduje blízkou interakci mezi molekulami vody a T_1 činidly. Nanočástice oxidů železa se nejčastěji používají jako T_2 činidla. Oxidy mohou být feromagnetické nebo superparamagnetické, záleží na velikosti jádra nanočástice a jeho krystalové struktuře.

Kromě nanočástic, jejichž jádro je zcela založeno na oxidech železa, byly zavedeny další nanosystémy s různými magnetickými jádry pro zlepšení citlivosti signálu a zvýšení diagnostiky MRI. Založené jsou na slitinách železa s různými magnetickými atomy (Mn, Zn, Co, Ni atd.), které mají vyšší relaxivitu než železité částice.

Konvenční kontrastní látky MRI jsou většinou účinné pouze v jediném zobrazovacím režimu: buď T_1 nebo T_2 . Často vedou k neuspokojivým výsledkům vyšetření, zejména pokud jsou biologické cíle malé. Kombinace současně silných kontrastních účinků T_1 a T_2 u jednoho kontrastního činidla by mohla být novým průlomem. Tato kontrastní činidla by mohla potenciálně poskytovat přesnější MRI lepší diferenciací mezi normální a nemocnou oblastí. Bohužel vytvoření takovýchto kontrastních látek se ukázalo jako velice komplikované^{25,36}

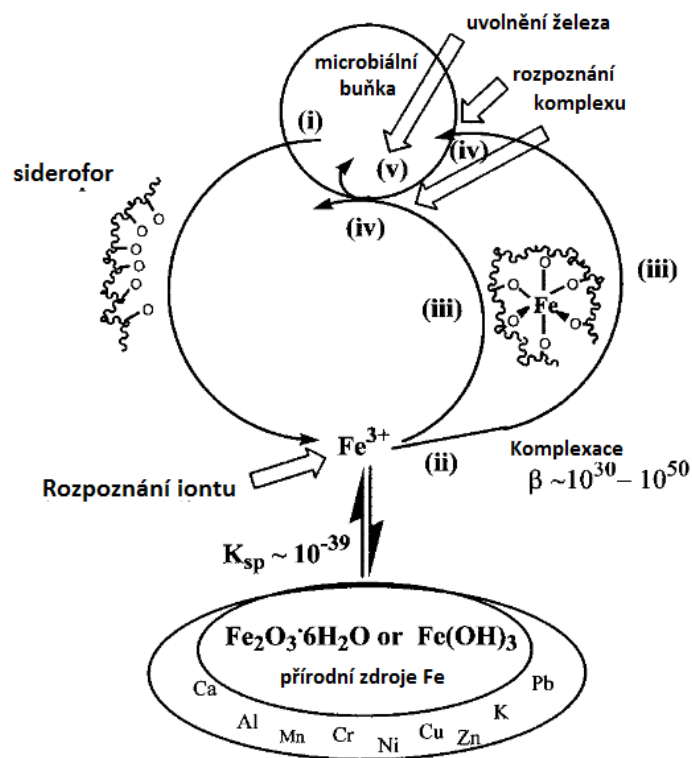
Transfer nasycenou chemickou výměnou (Chemical exchange saturation transfer, CEST) je novým typem kontrastu pro MRI. Je založen na chemické výměně protonů

rozpuštěných látek, jako jsou kontrastní látky, s okolní vodou. Řada organických a organokovových sloučenin má dostatečný počet protonů s vhodnými rychlostmi chemických výměn a specifickou MRI frekvencí, aby byly excitovány selektivně a detekovány senzitivně. RF puls, nazývaný saturační puls, se aplikuje na rezonanční frekvenci vyměnitelných protonů. Tato saturace, nebo ztráta signálu, je potom přenesena přes vyměnitelné vodíky na vodu, čímž dochází k frakčnímu snížení signálu vody.³⁷

1.3 Přírodní chelátory železa - siderofory

Siderofory (řecký výraz pro “nosiče železa”) jsou definovány jako relativně nízkomolekulární látky, chelatační činidla pro železité ionty produkované patogenními i nepatogenními bakteriemi a plísněmi rostoucími při stresu z nedostatku železa. Úlohou těchto sloučenin je zachycovat železo z okolního prostředí a zpřístupnit tento nezbytný prvek pro mikrobiální buňku. Výzkum v této oblasti začal asi před pěti desetiletími. Dnes je známo velké množství sideroforů, jelikož většina aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů syntetizuje alespoň jeden siderfor. Kromě jejich klinických aplikací mají důležitou roli v zemědělství, protože železo je klíčovou a často deficitní živinou i pro rostliny (půdní bakterie i některé jednoděložné rostliny produkují vlastní fytosiderofoty).

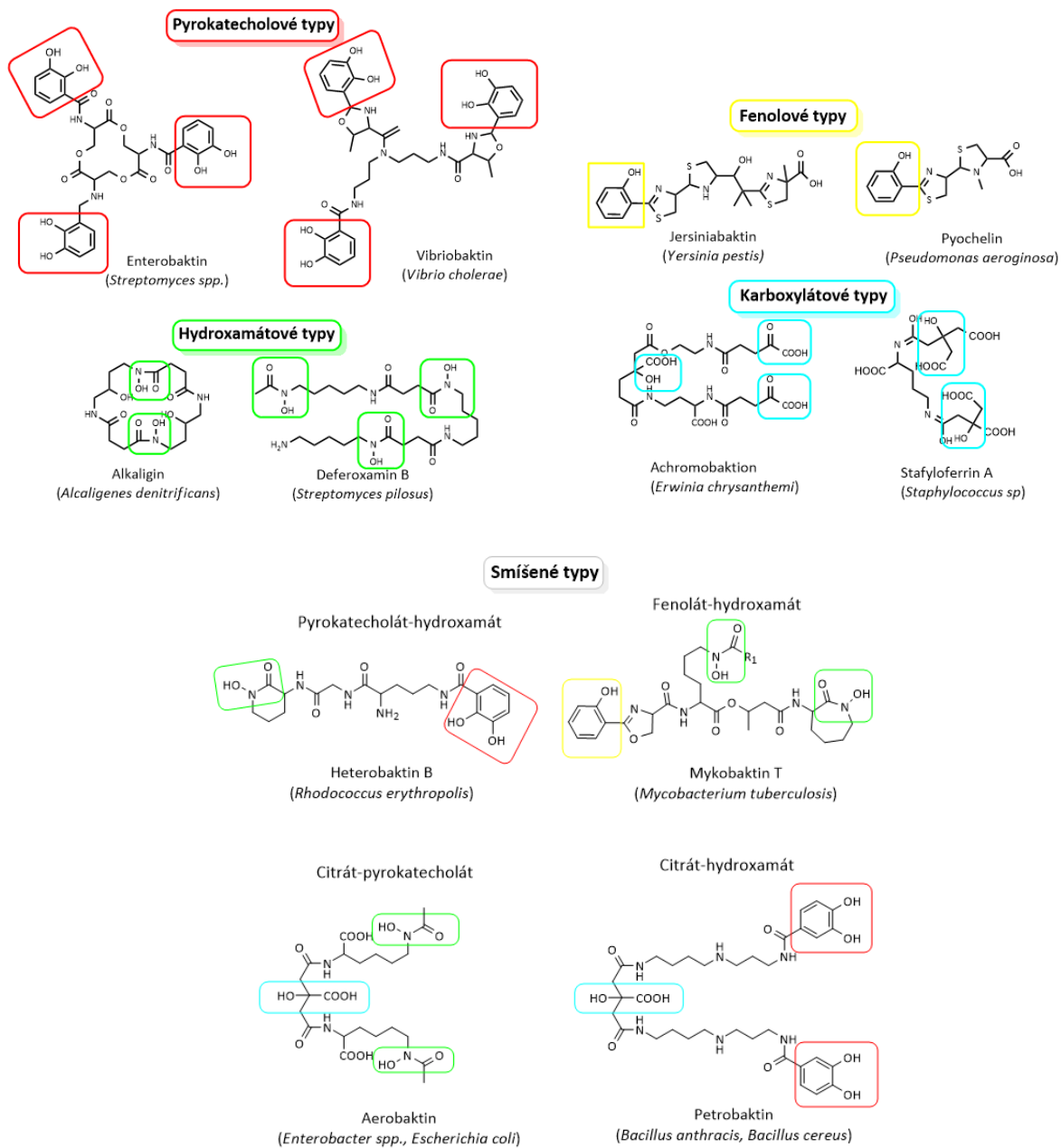
Environmentální omezení a biologické požadavky vyžadují, aby mikroorganismy tvořily specifické molekuly, které mohou účinně soutěžit s hydroxylovým iontem o železité ionty, který se sice hojně vyskytuje v přírodě, ale s obtížnou biologickou dostupností. Schéma získávání environmentálního železa zprostředkovaného sideroforem je na obrázku 7.



Obrázek 7 – Schéma sideroforem zprostředkovaného získávání environmentálního železa mikrobiálními buňkami, zahrnující: i) syntézu ligandu a uvolnění z buňky; ii) rozeznání Fe^{3+} iontu a jeho komplexace; iii) difuze na povrch buňky; iv) rozeznání komplexu siderofor- Fe^{3+} receptorem na povrchu buňky; v) uvolnění železa do buňky. Upraveno podle ref. ³⁸.

Každá bakterie si v podstatě syntetizuje vlastní druh sideroforu, a proto se siderofory podstatně liší ve struktuře.

Bylo identifikováno na 500 sloučenin, které mohou být považovány za siderofory, a ty se dělí do tří hlavních tříd v závislosti na chemické povaze ligandu pro koordinaci Fe^{3+} . Buď to jsou pyrokatecholáty (resp. fenoláty), hydroxamáty, nebo (-hydroxy-) karboxyláty. Detailnější rozdělení i s příklady je na obrázku 8. ³⁹



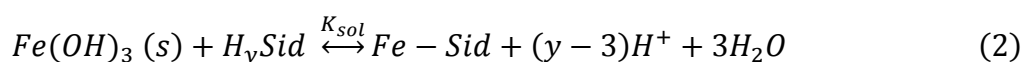
Obrázek 8 - Rozdělení sideroforů upraveno podle ref.³⁹.

1.3.1 Charakter koordinace

Siderofory tvoří kineticky labilní cheláty s železitými ionty, které se vyznačují výjimečnou termodynamickou stabilitou. Afinity sideroforů ke Gd^{3+} jsou typicky rovněž vysoké (ovšem Gd^{3+} je velmi vzácný prvek v relevantních prostředích), ale například k Al^{3+} a divalentním iontům podstatně nižší. Proto lze říct, že je siderofory jsou prakticky specifické

pro železité ionty. Fakt, že siderofory mají větší afinitu k Fe^{3+} než k Fe^{2+} , poskytuje účinný prostředek uvolňování železa prostřednictvím redukce uvnitř buňky.

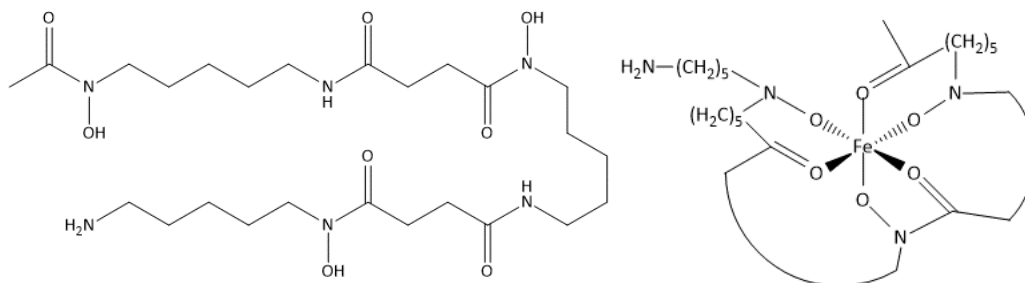
Obecně silná Lewisova kyselina Fe^{3+} je silně solvatována ve vodném roztoku oktaedrického komplexu $[Fe(H_2O)_6]^{3+}$. Zvýšením entropie donorové atomy sideroforu výhodně nahradí vodu v komplexu a obklopí Fe^{2+} ion v koordinačním stavu 6, který má obvykle oktaedrickou geometrii. Obecně má siderofor 6 donorových atomů a vytváří komplex 1:1. Podle rovnice:



Alternativně pokud obsahuje méně než 6 donorů, vakance mohou být nahrazeny kyslíkovými donory, jako jsou molekuly vody.

1.3.2 Deferoxamin

Deferoxamin je přirozeně vyskytující se trihydroxamová kyselina produkovaná *Streptomyces pilosus*.



Obrázek 5 - Struktura deferoxaminu a jeho koordinace na Fe^{3+} ion.

Používá se přes 30 let v klinické praxi u pacientů trpící nadbytkem železa, akutní otravou železem, přetížením způsobeným transfuzí krve při anemii nebo při léčbě thalassemia major (abnormální produkce hemoglobinu). Lék je obvykle relativně dobře snášen a závažné nežádoucí účinky jsou poměrně méně časté.

Jedná se o hydrofilní chelátor, který cheluje Fe^{3+} a hemosiderin v krvi za vzniku stabilního komplexu, který se poté vyloučí s močí. Tímto zabraňuje vstupu železa do Haber-Weissovy reakce, která generuje hydroxylové radikály a je zdrojem oxidativního stresu.^{40,41}

2 Experimentální část

2.1 Materiály

Tetrahydrát dusičnanu vápenatého, hydrogenfosforečnan amonný, kyselina fytová a dextran (Mr 50 000 Da) byly zakoupeny v Sigma-Aldrich, s. r. o. (Praha, Česká republika). Hydroxid sodný a vodný roztok amoniaku byly zakoupeny v Lachner s.r.o. (Neratovice, Česká republika). Membrána pro dialysu Spectra/Por (mezní molekulová hmotnost, (molecular weight cut-off, MWCO), 6-8kDa) byla zakoupena z P-LAB, a. s. (Praha, Česká republika). Všechny chemikálie byly použity bez dalšího čištění.

2.1 Syntéza CaIP₆ metodou přes nanočástice HAP

Nanočástice CaIP₆ byly syntetizovány při laboratorní teplotě přes HAP, Ca₅(PO₄)₃OH. HAP byl připraven reakcí Ca(NO₃)₂·4H₂O (18mM, pH 9) s (NH₄)₂HPO₄ (10,8 mM, pH 9), pH bylo upraveno amoniakem. Roztoky byly smíchány ve stejném objemu při laboratorní teplotě. Poměr koncentrací vápníku ku fosfátu je stejný jako u HAP, který se tvoří při takovýchto podmínkách. Průměrná velikost takto připravených nanočástic byla 100 nm a ζ potenciál byl mírně záporný při pH 7 (-13 mV).

Po několika minutách byl koloid nanočástic HAP slit společně s Na₁₂IP₆ (6 mM, pH 9) do další míchající se baňky. Oba roztoky měly stejný objem. Vzhledem k ředění během reakcí, konečná celková koncentrace Ca²⁺ iontů byla 4,5 mM, HPO₄³⁻ 2,7 mM a IP₆¹²⁻ 3 mM. Nanočástice byly poté třikrát promyty vodou po centrifugaci a usušeny ve vakuové sušičce. Když byly částice menší, koloid byl dialyzován proti vodě a nakonec lyofilizován. Pro studie DLS a měření ζ potenciálu byly nanočástice studovány jako disperze. Výsledné částice byly označeny jako **CaIP₆ 1**.

2.2 Syntéza CaIP₆ metodou srážení

CaIP₆ byla připravena reakcí Ca(NO₃)₂·4H₂O (1 M) s Na₁₂IP₆ (0,16 M) tak, aby poměr koncentrací [Ca²⁺]:[IP₆] byl 1:6. Agregát byl poté oddělen od roztoku centrifugací, třikrát promyt vodou a nakonec usušen ve vakuové sušičce při 50 °C.

Dopovaný CaIP₆ byl připraven reakcí Ca(NO₃)₂·4H₂O (1M) a FeCl₃ (1M) v různých poměrech molárních koncentrací a nakonec sražen Na₁₂IP₆ (0,16M). Sraženina byla oddělena

centrifugací, třikrát promyta vodou a nakonec usušena ve vakové sušičce při 50 °C. Výsledné částice byly označeny **CaIP₆ 2 + x% Fe³⁺**, kde procento označuje molární procenta Fe³⁺ iontů, které nahradily Ca²⁺ ve fytátu.

2.3 Úprava velikosti CaIP₆ připravené metodou srážení

Pro úpravu agregovaného CaIP₆ byla reakce Ca(NO₃)₂·4H₂O (18 mM) s Na₁₂IP₆ (3 mM) provedena v 0,1 hm% roztoku dextransu (hmotnostně střední molekulová hmotnost 50 000 Da). Stejným způsobem dopovaný agregát CaIP₆ byl připravena reakcí Ca(NO₃)₂·4H₂O (18 mM) a FeCl₃ (18 mM) ve stejném roztoku dextransu. Poměr Ca²⁺ ku Fe³⁺ se postupně snižoval. Roztok byl nakonec sražen Na₁₂IP₆ (3 mM) a ponechán 2 hodiny míchat. Sraženina byla poté oddělena od roztoku centrifugací, třikrát promyta vodou a nakonec usušena ve vakuové sušičce při 50 °C. Výsledné částice byly označeny jako **CIP₆ 3 + x% Fe³⁺**, kde procento označuje molární procenta Fe³⁺ iontů, které nahradily Ca²⁺ ve fytátu.

2.4 Dopování CaIP₆ Fe³⁺ ionty připravené metodou přes HAP

Pro přípravu dopovaných nanočástic byly použity stejné koncentrace výchozích látek jako při syntéze čisté nanočástice tj. Ca(NO₃)₂·4H₂O (18mM, pH 9) a (NH₄)₂HPO₄ (10,8 mn, pH 9) a Na₁₂IP₆ (6 mM). Pro dopování byl ještě použit roztok FeCl₃ (18mM, 9 mM nebo 6 mM).

Tři různé postupy byly aplikovány pro syntézu dopovaných nanočástic:

1. Nejříve byl syntetizován HAP podle výše popsané reakce Ca(NO₃)₂·4H₂O (18mM, pH 9) a (NH₄)₂HPO₄ (10,8 mn, pH 9), poté byly do vzniklé disperze přidány různé objemy FeCl₃ (9 mM) a nakonec byla nažloutlá disperze nalita do baňky s roztokem Na₁₂IP₆ (6 mM) a byla míchána po dobu 2 h. Objem Ca(NO₃)₂ byl postupně snižován a nahrazován FeCl₃. Výsledné částice byly označeny jako **CIP₆ 4 + x% Fe³⁺**, kde procento označuje molární procenta Fe³⁺ iontů, které nahradily Ca²⁺ ve fytátu.
2. Nejdrívě se připravil HAP syntézou Ca(NO₃)₂·4H₂O (18mM, pH 9) a (NH₄)₂HPO₄ (10,8 mn, pH 9), poté byla vzniklá disperze nalita do roztoku s Na₁₂IP₆ (6 mM, pH 9) a nakonec byly přidány různé objemy FeCl₃, směs se byla ponechána míchat po dobu 2 hodin. Objem Ca(NO₃)₂ byl postupně snižován a nahrazován FeCl₃. Výsledné částice byly označeny jako **CIP₆ 5 +x% Fe³⁺**, kde procento označuje molární procenta Fe³⁺ iontů, které nahradily Ca²⁺ ve fytátu.

3. Poslední postup byl založen na dříve popsaném dopování nanočástic HAP (18). Roztoky FeCl_3 s $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (oba dva s koncentrací 18 mM) byly smíchány v různých poměrech $\text{Ca}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$. Tento roztok se pomalu přidával do roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (10,8 mn, pH 9). Během této reakce se udržovalo amoniakem pH na 10. Vzniklá disperze byla ihned vzata a nechala se zreagovat s $\text{Na}_{12}\text{IP}_6$ (6 mM). Tato disperze se poté nechala míchat po dobu 2 hodin. Výsledné částice byly označeny jako **CIP₆ 6 + x%Fe³⁺**, kde procento označuje molární procenta Fe^{3+} iontů, které nahradily Ca^{2+} ve fyfátu.

Všechny disperze byly třikrát promyty, nanočástice byly sebrány centrifugací při 7830 otáčkách a vysušeny ve vakuové sušičce při 60 °C. Pro studie DLS a měření ζ potenciálu byly nanočástice studovány jako disperze.

2.4.1.1 Charakterizace

$^1\text{H-NMR}$, $^{31}\text{P-NMR}$ spektra, byly zaznamenány na spektrometru Bruker Avance DPX-300 (Bruker Co., Rakousko). Šířka 90° pulsu byla 10 μs , relaxační zpoždění 10 s, doba pořízení 2,18 s a 1600 skenů. Před měřením byly vzorky ekvilibrovány na po dobu nejméně 10 minut.

Měření infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) bylo provedeno na spektrometru Perkin-Elmer Paragon 1000PC (Perkin-Elmer Co., USA) systémem Specac MKII Golden Gate s jednoduchým zeslabeným totálním odrazem (ATR) (Perkin-Elmer Co., USA). Práškový vzorek byl umístěn na diamantovém krystalu a spektra byla měřena v rozsahu $450 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ s krokem 2 cm^{-1} v režimu odrazu v úhlu dopadu 45° .

Elementární analýza byla provedena na analyzátoru Perkin-Elmer Series II CHNS / O Analyzer 2400 (PE Systems Ltd., Česká republika). Experimenty širokouhlého rentgenového rozptylu (Wide-angle light scattering, WAXS) byly prováděny s použitím „pinhole“ kamery (Molecular Metrology Systém, Rigaku, Japonsko) připojené k mikrofokusevanému generátoru rentgenového záření (Osmic MicroMax 002) pracující při 45 kV a 0,66 mA (30 W). Kamera byla vybavena odnímatelnou a vyměnitelnou zobrazovací deskou 23x25 cm (Fujifilm). Experimentální nastavení pokrývalo rozsah momentu přenosu (q) $0,25-3,5 \text{ \AA}^{-1}$, s $q=(4\pi/\lambda)\sin(\theta)$, kde $\lambda=1,54 \text{ \AA}$ je vlnová délka a 2θ je rozptylový úhel. Vzorky byly měřeny v transmisním režimu.

Velikost částic byla stanovena v roztoku o koncentraci 2,5 mg/ml za použití dynamického rozptylu světla, měřena na přístroji Zetasizer Nano-ZS, model ZEN3600 (Malvern Instruments, UK) při úhlu rozptylu $\theta = 173$ při teplotě 25 °C (pomocí softwaru DTS - verze 6.20 pro vyhodnocování dat). Měření ζ potenciálu bylo provedeno na stejném přístroji a vyhodnoceno stejným softwarem. Velikost byla také ověřena Transmisním elektronovým mikroskopem na přístroji Tecnai Spirit G2 transmission electron microscope (TEM, FEI Brno, Česká republika). Kapka disperze vzorku byla umístěna na uhlíkem potaženou měděnou mřížku a usušena při laboratorních podmínkách.

Komplexace fyátu s deferoxaminem byla zkoumána na UV spektroskopu Thermo Scientific, model Evolution 220 (Fisher Scientific, Česká republika). Měřena byla absorbance při fixní vlnové délce, $\lambda=526$ nm.

3 Cíle práce

Cílem diplomové práce je vývoj nového funkčního kontrastu pro ^{31}P MRI založeného na nanočásticích CaP_6 dopovaných paramagnetickými Fe^{3+} ionty. Toto paramagnetikum rozšíří ^{31}P signál fytátu až je téměř nerozlišitelný od šumu. V přítomnosti bakterií produkujících siderofory, které mají větší afinitu k železu než fytát, rekomplexují železo z fytátu a ^{31}P signál se obnoví. Tímto způsobem se dají detekovat léze bakterií v trávicím traktu nebo na implantátech.

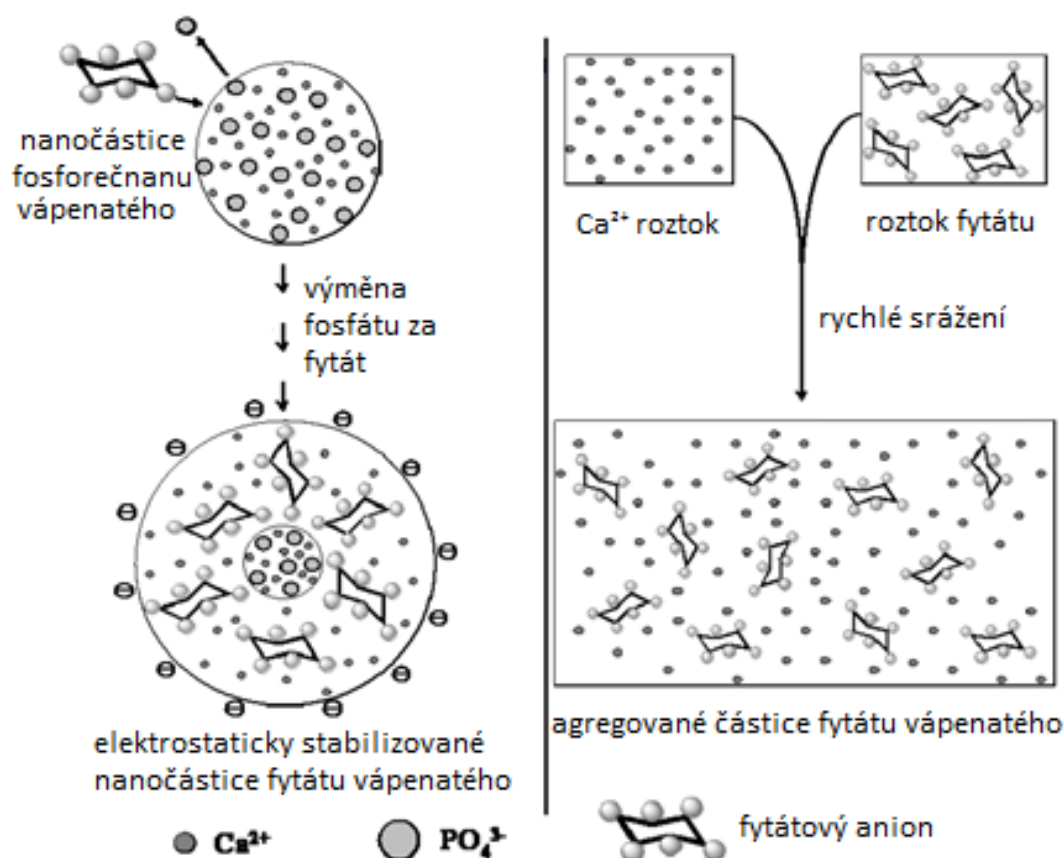
1. Syntéza nanočástic CaP_6 , jejíž velikost je mezi 100 - 300 nm.
2. Dopování těchto nanočástic Fe^{3+} ionty v různých koncentracích, tak aby se našla minimální koncentrace Fe^{3+} iontu, která rozšíří ^{31}P NMR signál natolik, že se ztratí v šumu.
3. Poté změřit kinetiku uvolnění Fe^{3+} iontu z nanočástice rekomplexací s deferoxaminem jako modelem bakteriosideroforu.
4. MRI studie a EPR byly dělány ve spolupráci s Institutem klinické a experimentální medicíny (IKEM).

4 Výsledky a diskuze

4.1 Syntéza a charakterizace

Nanočástice byly připraveny přes jádro hydroxyapatitu výměnou aniotu fosfátu za fytát, vytvoření elektrostasticky stabilních nanočástic CaIP₆. Agregované částice CaIP₆ byly připraveny sražením fytátu vápenatou solí.

Obecný způsob syntézy nanočástic a agregátu je na obrázku 6. Úspěšně jsme připravovali čtyři vzorky nedopovaných částic a šest druhů dopovaných částic pro studie rozšíření NMR signálu na závislosti koncentraci Fe³⁺ iontů v nanočástici.



Obrázek 6 - Schéma přípravy nanočástic (nalevo) a agregátu fytátu vápenatého (napravo). Upraveno podle ref.⁸.

4.1.1 Nanočástice CaIP₆ připravené metodou přes HAP

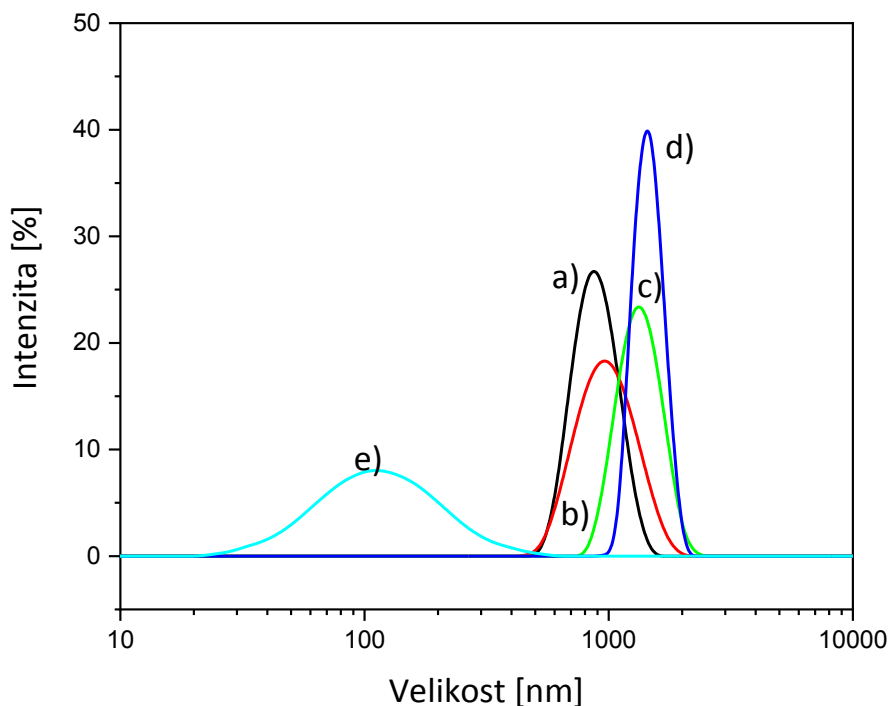
Nedopované částice byly připraveny v různých poměrech koncentrací Ca²⁺ ku fytátu. Vlastnosti získané z měření DLS jsou v tabulce 1

Tabulka 1 - Vlastnosti částic fytátu vápenatého získané DLS měřením. Ve všech případech byly uvedeny efektivní koncentrace v roztoku po ředění.

Označení vzorku	[Ca ²⁺] / [mM]	[PO ₄ ³⁻] / [mM]	[fytát] / [nM]	[Ca ²⁺] : [fytát]	Velikost částice / [nm]	ζ potenciál, pH 7 / [mV]
CaIP ₆ 1.1	6,5	3,9	6,5	1:1	~1000	+ 2
CaIP ₆ 1.2	6,5	3,9	8,13	1:1,25	~1000	-7,66
CaIP ₆ 1.3	6,5	3,9	9,75	1:1,5	~1000	-10,3
CaIP ₆ 1.4	6,5	3,9	11,4	1:1,75	~1000	-29,7
CaIP ₆ 1.5	4,5	2,7	3	1,5:1	115,4	-43,7

Částice s nejmenší velikostí byly připraveny při poměru 1,5:1 Ca²⁺ ku fytátu. Tyto částice měly vysoký záporný náboj, který stabilizuje nanočástice elektrostaticky. Když byl poměr obrácený (vyšší koncentrace fytátu než Ca²⁺), částice byly veliké, okolo jednoho 1 μm, pravděpodobně díky nedostatečné stabilaci vznikaly veliké částice.

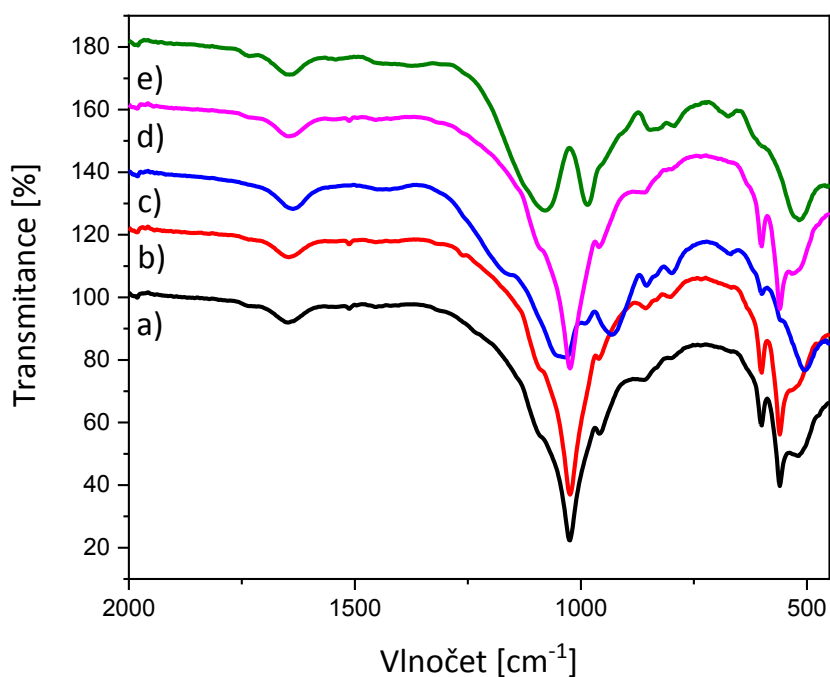
Na obrázku 7 jsou znázorněny distribuce velikostí všech vzorků CaIP₆ 1. Úzká distribuce velikostí byla změřena pro vzorky s větší koncentrací fytátu, ale průměrná velikost byla okolo 1000 nm. U vzorku s vyšší koncentrací [Ca²⁺] byla distribuce sice široká, ale průměrná velikost byla okolo 100 nm.



Obrázek 7 - Distribuce velikostí získané z měření DLS. a) CaIP₆ 1.1; b) CaIP₆ 1.2; c) CaIP₆ 1.3; d) CaIP₆ 1.4 ; e) CaIP₆ 1.5

Na obrázku 8 je FTIR spektrum nanočástic připravených syntézou přes hydroxyapatit. Charakteristické pásy hydroxyapatitu (1105, 1022, 602 a 563 cm⁻¹) byly detekovány při vyšší koncentraci fytátu k Ca²⁺, tj. u aglomerovaných částic, viz tabulka 2. U těchto vzorků byly také pozorovány pásy kyseliny fytové (979, 897, 849 a 793 cm⁻¹), tyto pásy byly zvláště silné u vzorku CaIP₆ 1.3 (viz. obrázek 8c), indikující přítomnost adsorbované fytové kyseliny na částici. Z toho lze vyvodit strukturu jádro-obal, kde jádrem je HAP a Ca²⁺-fytát/fytová kyselina je jako obal částice.

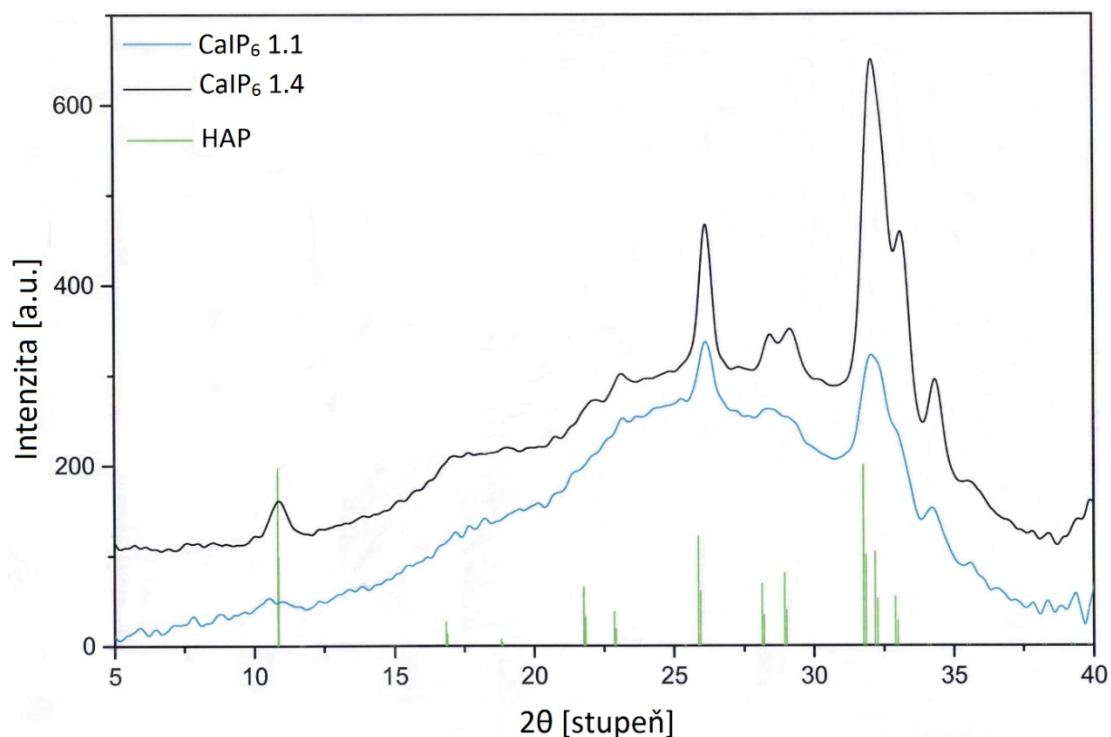
FTIR spektrum nanočástic CaIP₆ 1.5 zobrazené na obrázku 8e obsahují charakteristické pásy fytátu vápenatého. Adsorbované molekuly vody poskytují slabý absorpční pás kolem 1645 cm⁻¹ (deformační vibrace) a široký absorpční pás okolo 3400 cm⁻¹ (valenční vibrace). Dva široké pásy okolo 1076 a 517 cm⁻¹ byly přiřazeny PO₄²⁻ skupině. Pásy 983, 908, 842 a 792 cm⁻¹ jsou přiřazeny vibraci C-O-P konformace 5ax/1eq fytátu. Široký pás s vlnočtem 1367 cm⁻¹ byl přiřazen valenční vibraci C-O.¹⁴



Obrázek 8 – FTIR spektra nanočástic připraveny v různých poměrech koncentrací a) CaIP₆ 1.1; b) CaIP₆ 1.2; c) CaIP₆ 1.3; d) CaIP₆ 1.4; e) CaIP₆ 1.5

V porovnání nanočástic s nejvyšším obsahem fytátu (obrázek 8c a 8e) lze vidět posun absorpčních pásů, pravděpodobně způsobený různou koncentrací vápníku ve vzorcích.

Aby byla ověřena struktura částic jádro-obal, u dvou vzorků (CaIP₆ 1.1 a CaIP₆ 1.4) byla změřena rentgenová difrakce. Ve spektru (obrázek 9) jsou pozorovány intenzivní HAP píky zejména velice silný pás ~ 32° a slabší pásy ~ 11°, 25°, 33°, což ukazuje na krystalické jádro HAP. Široký pás od 20° po 35° je typický pro málo krystalický fytát vápenatý.



Obrázek 9 - WAXS spektrum vybraných vzorků. Očekávaný difraktogram HAP je pro referenci uveden v dolní části grafu.

4.1.2 Dopované částice CaIP₆ připravené metodou srážení

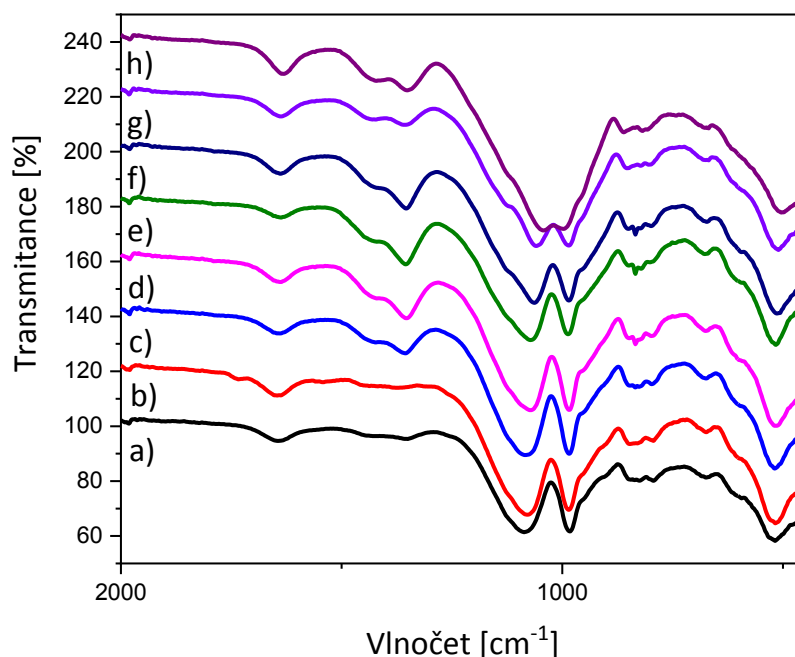
Základní vlastnosti dopovaných částic připravené srážením fytátu s vápenatou solí jsou shrnuty v tabulce 2. Procento u názvu vzorku označuje molární procenta Ca²⁺ nahrazené Fe³⁺.

Tabulka 2 - Poměr koncentrací Ca²⁺/Fe³⁺ a efektivní koncentrace Ca²⁺, Fe³⁺, fytátu při přípravě dopovaného fytátu metodou přímého srážení fytátu vápenatou solí.

Označení vzorku	[Ca ²⁺] / [M]	[Fe ³⁺] / [mM]	[fytát] / [mM]	[Ca ²⁺] : [Fe ³⁺]
CaIP ₆ 2	0,5	0	80	-
CaIP ₆ 2 +1% Fe ³⁺	0,495	5	80	99:1
CaIP ₆ 2 +2% Fe ³⁺	0,488	12,5	80	39:1
CaIP ₆ 2 +5% Fe ³⁺	0,475	25	80	19:1
CaIP ₆ 2 +10% Fe ³⁺	0,45	50	80	9:1
CaIP ₆ 2 +20% Fe ³⁺	0,4	100	80	4:1
CaIP ₆ 2 +50% Fe ³⁺	0,25	250	80	1:1

Obrázek 10 ukazuje FTIR spektra CaIP₆ 2 v porovnání s větším přívkem Fe³⁺ a s nedopovanou částicí CaIP₆ 1.5 připravené metodou přes HAP. S větším přidavkem Fe³⁺ iontů se mění tvar některých pásů. U některých vzorků (obrázky 10c, 10d, 10e, 10f) je více patrný pás s vlnočtem 1367 cm⁻¹, valenční vibrace C-O. Což je dané změnou pásů okolo (1076 cm⁻¹). Také dva pásy okolo 1000 cm⁻¹ (983 a 1076 cm⁻¹) mění svůj tvar s přidavkem Fe³⁺. Čím více železitých iontů, tím méně jsou pásy oddělené od sebe a více splývají. Což ukazuje na to, že Fe³⁺ ionty ovlivňují PO₄²⁻ a C-O-P vibrace. Tento trend je v souladu s dříve publikovanými železitými částicemi fytátu.¹⁸

Druhé porovnání je mezi nedopovanou částicí připravenou metodou srážení a s částicí CaIP₆ 1.5, která byla připravena metodou přes HAP. Vlnočty jednotlivých pásů jsou v podstatě stejné a přiřazují se stejně jako v minulém případě. Dva široké pásy okolo 1076 a 517 cm⁻¹ byly přiřazeny vibracím PO₄²⁻ skupině. Pásy 983, 908, 842 a 792 cm⁻¹ jsou přiřazeny vibraci C-O-P konformace 5ax/1eq fytátu. Široký pás s vlnočtem 1367 cm⁻¹ byl přiřazen valenční vibraci C-O.



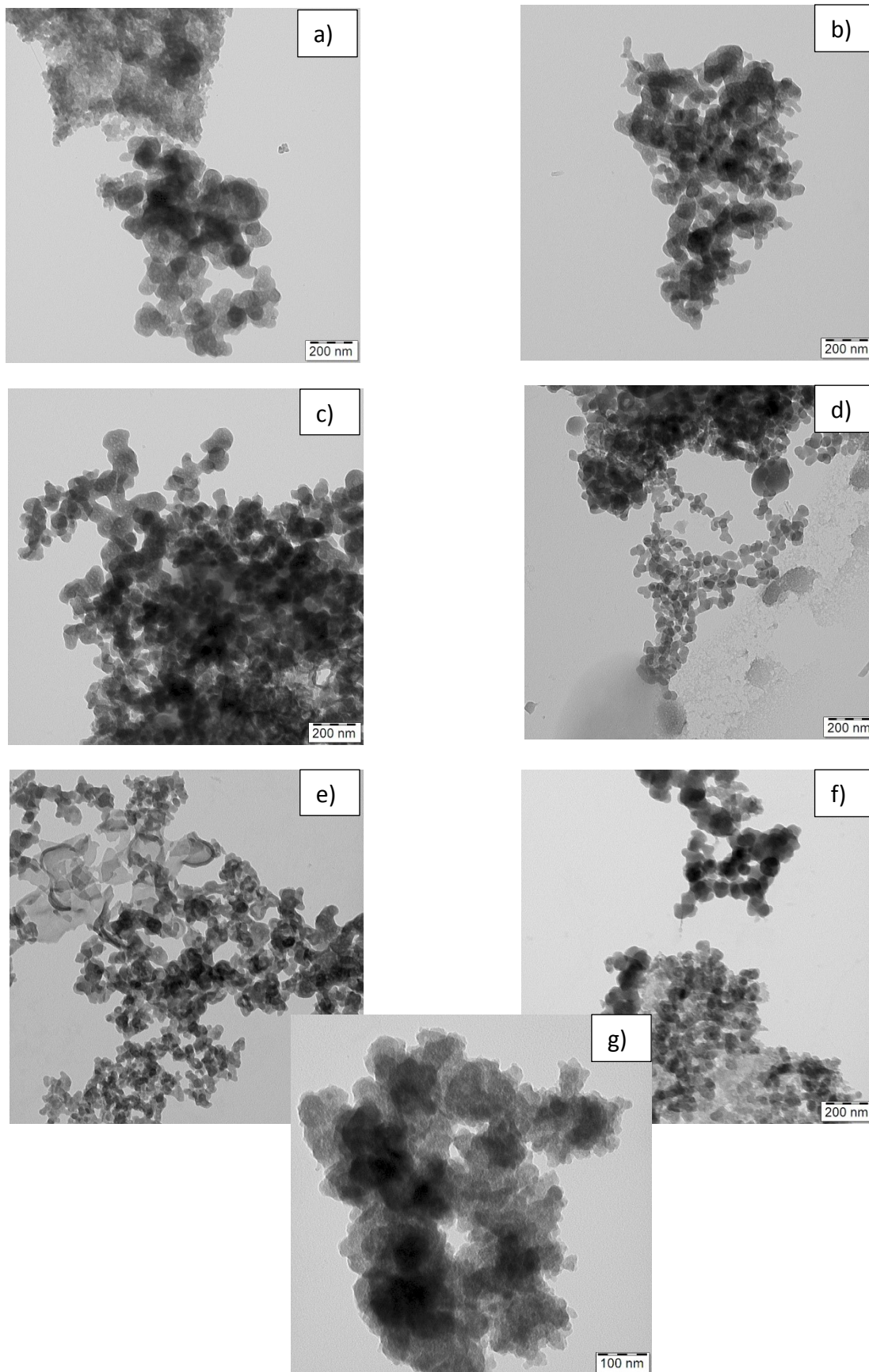
Obrázek 10 - FTIR spektra částic CaIP₆ 2 připravené metodou srážení a) CaIP₆ 2; b) CaIP₆ 2 +1% Fe³⁺; c) CaIP₆ 2 +1% Fe³⁺; d) CaIP₆ 2 +5% Fe³⁺; e) CaIP₆ 2 +10% Fe³⁺; f) CaIP₆ 2 +20% Fe³⁺; g) CaIP₆ 2 +50% Fe³⁺ v porovnání se spektrem nanočástice připravené metodou přes HAP h) CaIP₆ 1.5

Tabulka 3 - Elementární analýza vzorků CaIP₆ 2.

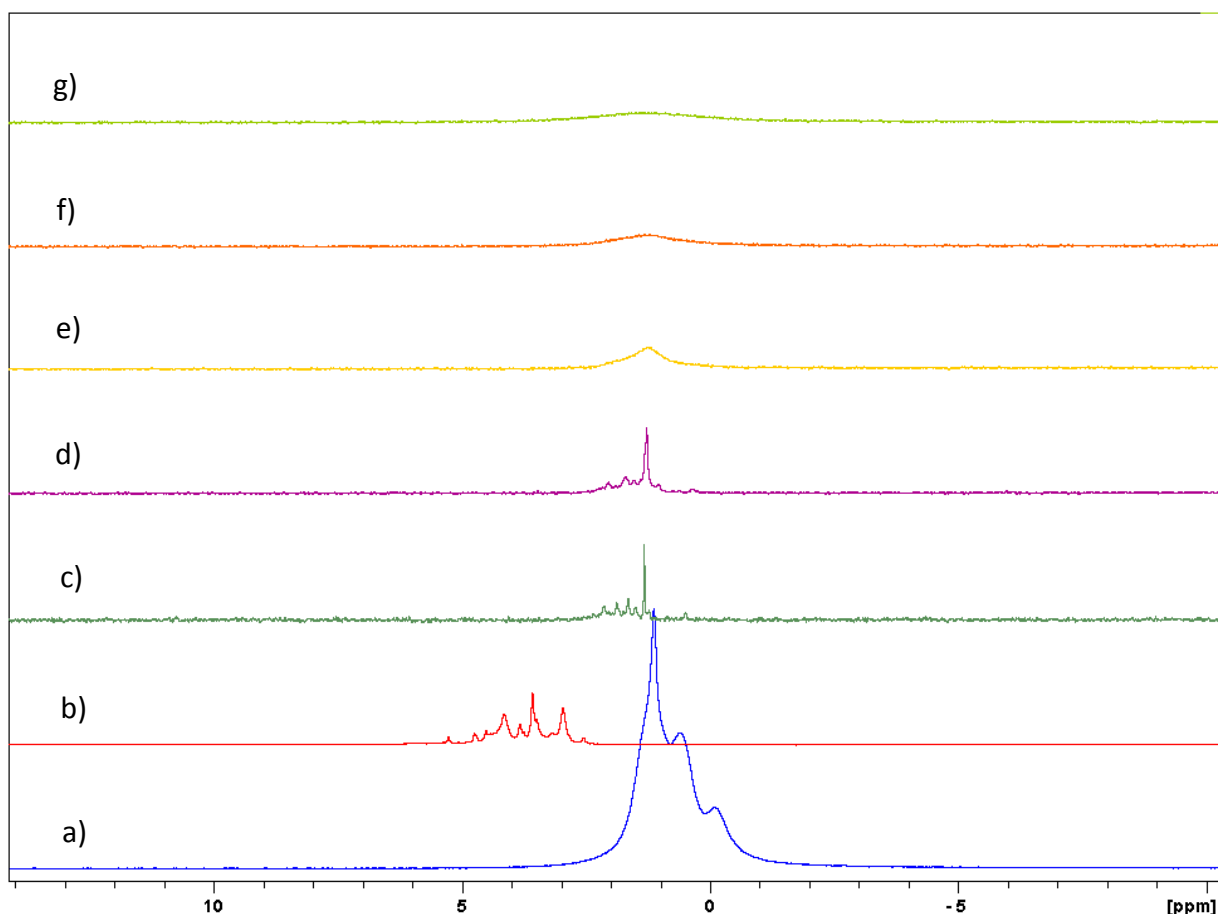
Označení vzorku	C / [mol%]	P / [mol%]	Ca / [mol%]	Fe / [mol%]	N / [mol%]	Fe : Ca	Struktura
CaIP₆ 2	21,76	22,31	12,43	0	6,84	0	C ₆ H ₆ P ₆ O ₂₄ Ca _{3,4} ·1,9NO ₃ ²⁻ ·2H ₂ O
CaIP₆ 2 +1% Fe³⁺	15,61	23,22	13,41	0,17	3,44	0,01	C ₆ H ₆ P ₉ O ₂₄ Ca _{5,1} Fe _{0,1} ·1,3NO ₃ ²⁻ ·5H ₂ O
CaIP₆ 2 +2% Fe³⁺	18,45	22,61	12,63	0,58	6,57	0,05	C ₆ H ₆ P _{7,4} O ₂₄ Ca _{4,1} Fe _{0,2} ·2,1NO ₃ ²⁻ ·4H ₂ O
CaIP₆ 2 +5% Fe³⁺	17,26	27,60	10,67	0,98	5,11	0,09	C ₆ H ₆ P _{9,6} O ₂₄ Ca _{3,7} Fe _{0,3} ·1,8NO ₃ ²⁻ ·4H ₂ O
CaIP₆ 2 +10% Fe³⁺	18,99	22,73	9,79	2,11	6,77	0,22	C ₆ H ₆ P _{7,2} O ₂₄ Ca _{3,1} Fe _{0,7} ·2,1NO ₃ ²⁻ ·3H ₂ O
CaIP₆ 2 +20% Fe³⁺	15,00	23,89	8,44	5,08	3,63	0,60	C ₆ H ₆ P _{9,6} O ₂₄ Ca _{3,4} Fe _{2,0} ·1,5NO ₃ ²⁻ ·6H ₂ O
CaIP₆ 2 +50% Fe³⁺	17,97	20,66	2,73	8,91	3,95	3,26	C ₆ H ₆ P _{6,9} O ₂₄ Ca _{0,9} Fe _{1,3} ·3NO ₃ ²⁻ ·4,5H ₂ O

Z elementární analýzy (tabulka 3) je patrný nestechiometrický poměr mezi fytátem a protionty Ca²⁺ a Fe³⁺. Také bylo detekováno malé množství dusíku, což ukazuje na zabudovaný dusičnan z výchozí látky ve struktuře. Poměry železitých a vápenatých iontů neodpovídali poměru vstupních látek, fytát měl větší afinitu k Fe³⁺ než k Ca²⁺.

Tvary částic byly ověřeny transmisním elektronovým mikroskopem. Na obrázcích 11 je jejich struktura. Z nich je patrná nepravidelná struktura agregátů.



Obrázek 11 - TEM obrázky agregovaných CaIP₆ 2. a) CaIP₆ 2; b) CaIP₆ 2 + 1% Fe³⁺; c) CaIP₆ 2 + 2% Fe³⁺; d) CaIP₆ 2 + 5% Fe³⁺; e) CaIP₆ 2 + 10% Fe³⁺; f) CaIP₆ 2 + 20% Fe³⁺; g) CaIP₆ 2 + 50% Fe³⁺



Obrázek 12 – NMR spektra vzorků série CaIP₆ 2. a) kyselina fytová; b) Na₁₂IP₆; c) nedopovaný CaIP₆ 2; d) CaIP₆ 2 + 1% Fe³⁺; e) CaIP₆ 2 + 2% Fe³⁺; f) CaIP₆ 2 + 5% Fe³⁺; g) CaIP₆ 2 + 10% Fe³⁺.

NMR spektra jsou na obrázku 12. Výrazná změna v chemických posunech vzorků Na₁₂IP₆ oproti CaIP₆ 2 je dána pH změnou, tj. změnou protonace fosfátových skupin. Vyšší pH je u vyšších chemických posunů (Na₁₂IP₆ má pH 9) a nižší pH u nižších chemických posunů (série CaIP₆ 2 má pH 7).

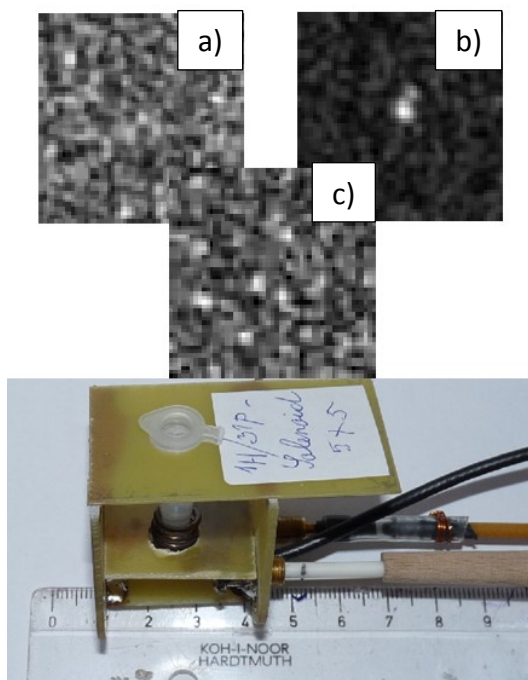
Hlavní změnou je ale rozšíření signálu s větším přidavkem Fe³⁺ iontů. Paramagnetické ionty rozšiřují tak silně signál, že už u vzorku CaIP₆ 2 + 10% Fe³⁺ je signál tak rozšířený, že už není oproti šumu, patrný. Z elementární analýzy se potom dá zjistit, jaká je přesná koncentrace železitých iontů, tj. 2,2 mol% Fe³⁺. Zbytek vzorků už poté nemělo cenu měřit, jelikož signál by už byl natolik rozšířený, že by nešel rozlišit od šumu.

Pro MRI měření byla koncentrace vzorků upravena tak, aby všude byla stejná koncentrace ³¹P (c = 1mM), podle získaného obsahu fosforu z elementární analýzy. Měřili se relaxační časy T₁ (tabulka 4) a MRI zobrazení. Z měření je patrné, že relaxační časy rostou

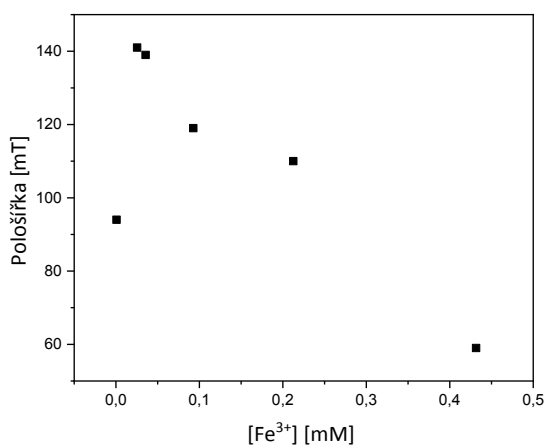
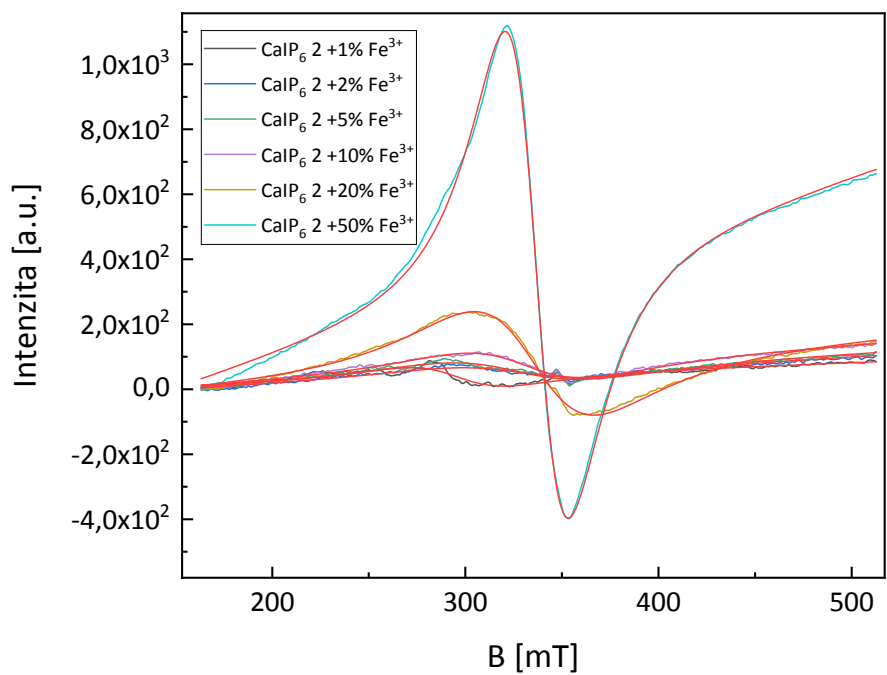
s větším přídatkem železa. Jedině u vzorku a $\text{CaIP}_6 + 20\% \text{Fe}^{3+}$ je malý nárůst signálu a snížení relaxačního času. Pravděpodobným důvodem bude nedokonalé vyčištění vzorku, kde každá nečistota má vliv. Podobný trend je i pro intenzity signálů, tam má jednu z nejmenší intenzit vzorek bez železa, dále (až na jednu výjimku) klesá. Důvod, proč intenzita signálu je tak nízká pro vzorek bez železa, je dán tvarem spektra, kde je více píků s nižší intenzitou oproti ostatním spektrům, kde je pík jeden.

Tabulka 4 - Koncentrace železa, T_1 relaxace a intenzita MRI signálu.

Označení vzorku	$[\text{Fe}^{3+}] / [\text{M}]$	$T_1 / [\text{ms}]$	Intenzita signálu
CaIP₆ 2	0	1027	86
CaIP₆ 2 +1% Fe³⁺	$7,17 \cdot 10^{-7}$	1085	277
CaIP₆ 2 +2% Fe³⁺	$2,54 \cdot 10^{-5}$	1394	341
CaIP₆ 2 +5% Fe³⁺	$3,56 \cdot 10^{-5}$	1437	256
CaIP₆ 2 +10% Fe³⁺	$9,28 \cdot 10^{-5}$	1808	62
CaIP₆ 2 +20% Fe³⁺	$2,13 \cdot 10^{-4}$	1694	191
CaIP₆ 2 +50% Fe³⁺	$4,32 \cdot 10^{-4}$	3947	44



Obrázek 12 - ^{31}P MRI měření vzorků a) CaIP_6 2; b) CaIP_6 2 +1% Fe^{3+} ; c) CaIP_6 2 +50% Fe^{3+} . Dole je obrázek měřicí cívky.



Obrázek 13 – EPR signál vzorků CalP₆ 2 v daném magnetickém poli nahoře. Dole je graf pološířek těchto čar.

EPR spektrum těchto vzorků (obrázek 13) zobrazuje jeden široký pás pro všechny vzorky. Amplitudy nelze porovnávat kvůli sedimentaci částic a rozdílnému objemu. Co lze porovnat je pološířka píku, kde až na vzorek CalP₆ + 1% Fe³⁺, který má druhou nejnižší pološířku, lze pozorovat klesající trend.

4.1.3 Úprava velikosti dopovaného CaIP₆ připravené metodou srážení

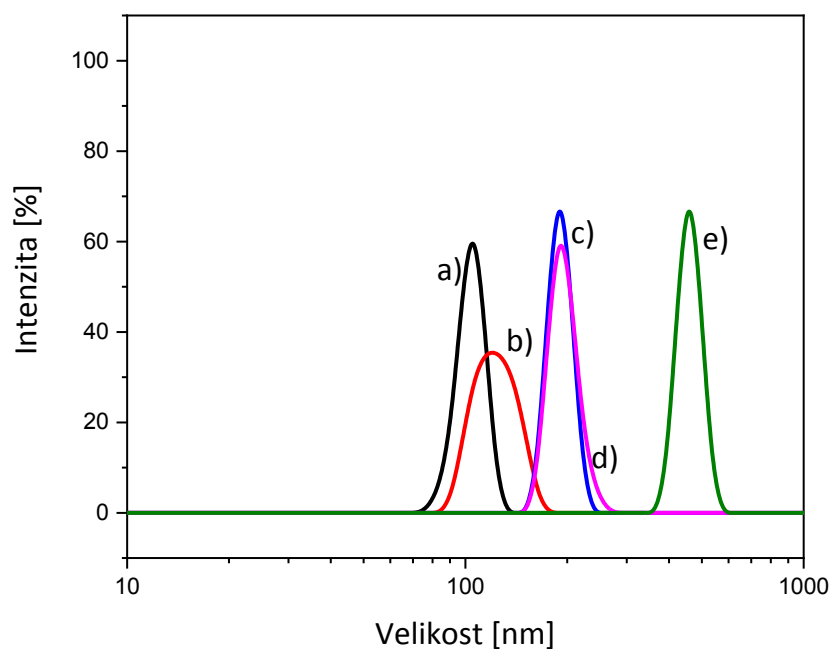
Vzhledem k nedostatečnému tvaru a velikosti částic syntetizované srážecí reakcí byla tato reakce provedena v 0,1 hm% roztoku dextransu jako polymerního koloidní stabilizátoru. Důležité vlastnosti vzorků jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5 - Efektivní koncentrace Ca²⁺, Fe³⁺ a fytátu vzorků CaIP₆ 3 připravené metodou srážení fytátu sodnou solí. Velikost a ζ potenciál získané z měření DLS.

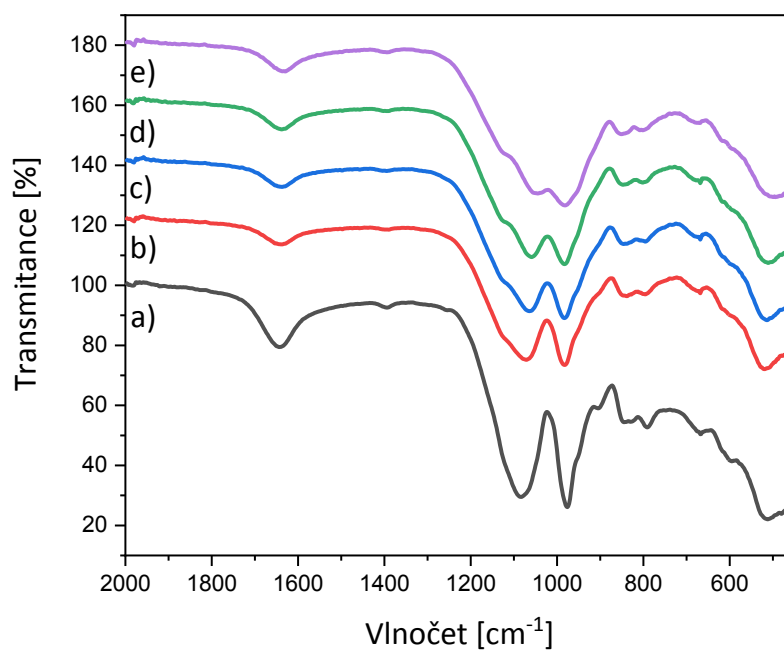
Označení vzorku	[Ca ²⁺] / [mM]	[Fe ³⁺] / [mM]	[fyát] / [mM]	[Ca ²⁺] : [Fe ³⁺]	Velikost / [nm]	ζ -potenciál, pH 7 / [mV]
CaIP ₆ 3	9	0	1,5	-	103,6	-47,4
CaIP ₆ 3 +5% Fe ³⁺	8,5	0,45	1,5	5,67:1	125,5	-44,2
CaIP ₆ 3 +7,5% Fe ³⁺	8,3	0,67	1,5	5,53:1	190,1	-42,8
CaIP ₆ 3 +10% Fe ³⁺	8,1	0,90	1,5	5,4:1	194,8	-40,3
CaIP ₆ 3 +15% Fe ³⁺	7,6	1,27	1,5	5,07:1	458,7	-38,1

Velikost částice rostla s větší koncentrací železitých iontů v částici. Naopak ζ potenciál klesal, vyšší koncentrace Fe³⁺ iontů vyrovnávala protináboj fytátu v částici. Distribuce velikostí částic, jak je patrné z obrázku 14, byla úžší než u nestabilizovaných částic (částice CaIP₆ 2) s PDI (polydispertní index) mezi 0,6-0,8 pro většinu vzorků.

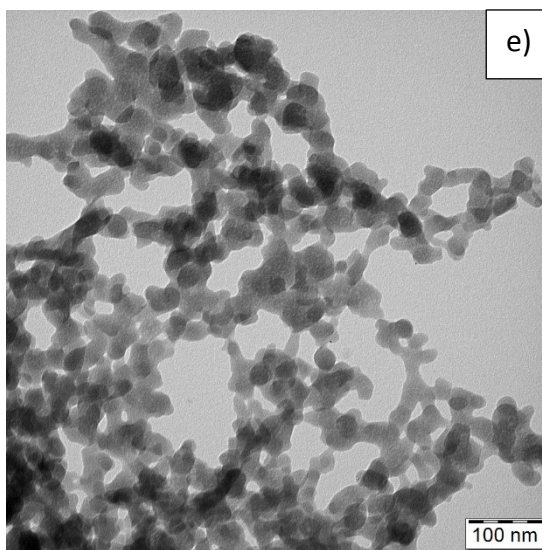
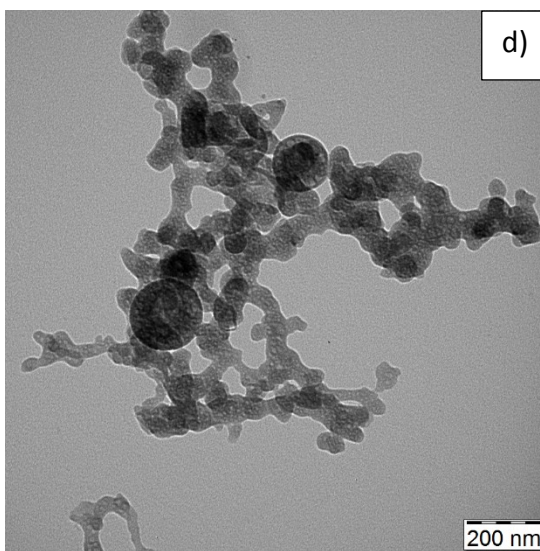
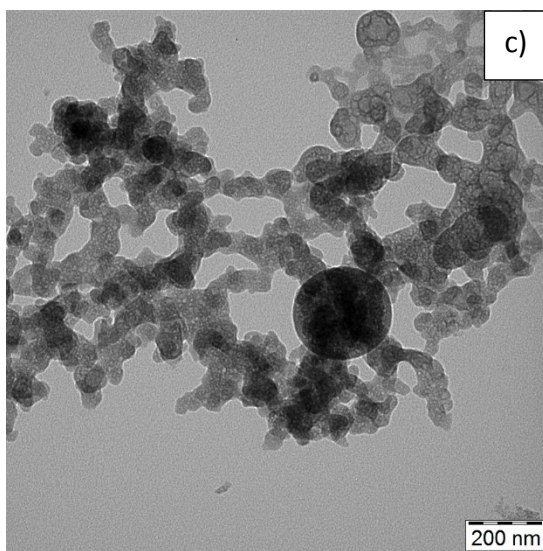
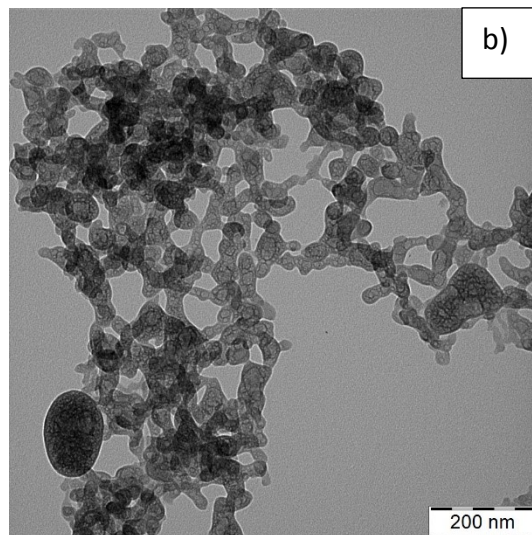
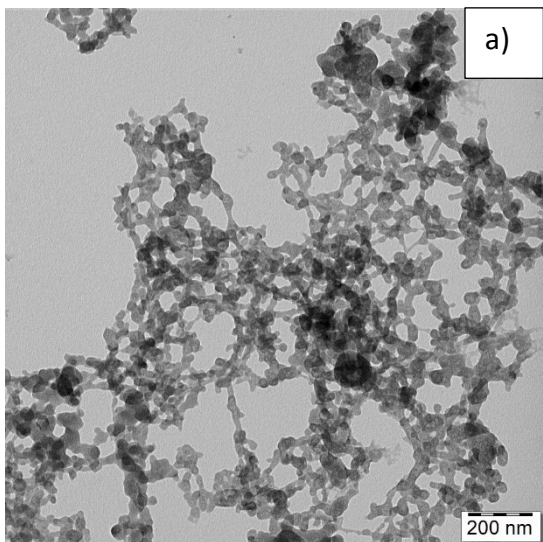
Na obrázku 15 je FTIR spektrum těchto částic. Z nich je patrné, že při přidavku železa se mění tvar dvou pásů u vlnočtů 1000 cm⁻¹, což jsou pásy fosfátové skupiny respektive skupiny C-O-P vibrace. To ukazuje na to, že jsou Fe³⁺ ionty přítomny ve struktuře a ovlivňují tyto vibrace. Přiřazení ostatních pásů je stejné jako v předešlých případech pro vzorky CaIP₆ 1, 2.



Obrázek 14 - Distribuce velikostí vzorků CaIP₆ 3 upravených koloidním stabilizátorem. a) CaIP₆ 3; b) CaIP₆ 3 + 5% Fe³⁺; c) CaIP₆ 3 + 7,5% Fe³⁺; d) CaIP₆ 3 + 10% Fe³⁺; e) CaIP₆ 3 + 15% Fe³⁺

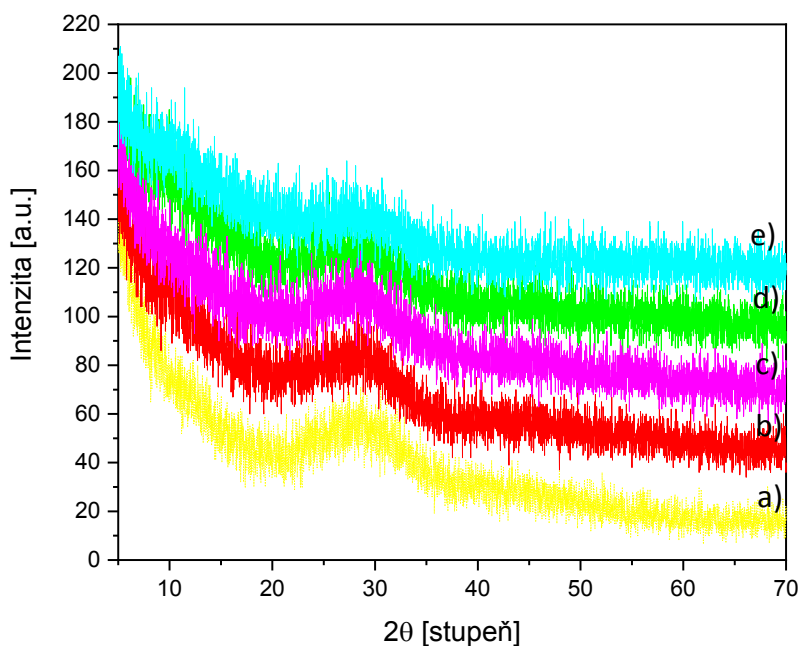


Obrázek 15 - FTIR spektra vzorků CaIP₆ 3 a) CaIP₆ 3; b) CaIP₆ 3 + 5% Fe³⁺; c) CaIP₆ 3 + 7,5% Fe³⁺; d) CaIP₆ 3 + 10% Fe³⁺; e) CaIP₆ 3 + 15% Fe³⁺.



Obrázek 16 - TEM grafy vzorků CaIP₆ 3 připravené metodou srážení v roztoku dextranu a) CaIP₆ 3; b) CaIP₆ 3 + 5% Fe³⁺; c) CaIP₆ 3 + 7,5% Fe³⁺; d) CaIP₆ 3 + 10% Fe³⁺; e) CaIP₆ 3 + 15% Fe³⁺.

Na obrázku 16 jsou TEM grafy vzorků CaIP₆ 3. Na nich jsou vidět hlavně nepravidelné agregáty. Kromě toho, jsou tam vidět kulovité částice s velikostí podobnou získané z DLS měření. Hodnota velikosti sraženiny nebyla z DLS měření získána, protože jsou to velikosti nad 5000 nm, které se na přístroji nezměří. Až na poslední vzorek, kde nebyla vidět žádná kulovitá částice, což také vysvětluje větší velikost získanou z DLS měření.



Obrázek 17 - WAXS měření vzorků CaIP₆ 3 připravené metodou srážení fytátu vápenatou solí. a) CaIP₆; b) CaIP₆ 3 + 5% Fe³⁺; c) CaIP₆ 3 + 7,5% Fe³⁺; d) CaIP₆ 3 + 10% Fe³⁺; e) CaIP₆ 3 + 15% Fe³⁺.

WAXS měření vzorků CaIP₆ série 3 ukázalo (obrázek 17), že žádná krystalická fáze ve vzorcích nebyla přítomna. Jediný viditelný široký pás od 20-35° připadá na málo krystalický fytát vápenatý. Stejný pás byl pozorován i pro vzorky CaIP₆ 1, viz obrázek 9.

NMR se v době odevzdání diplomové práce teprve měřilo, a proto nebude součástí této práce. Očekáváme stejný vývoj ve tvaru spekter jako pro vzorek CaIP₆ 2, jenom s malými výkyvy, které se budou odvíjet od zastoupení železitých iontů v částici.

4.1.4 Dopované nanočástice CaIP₆ připravené metodou přes HAP

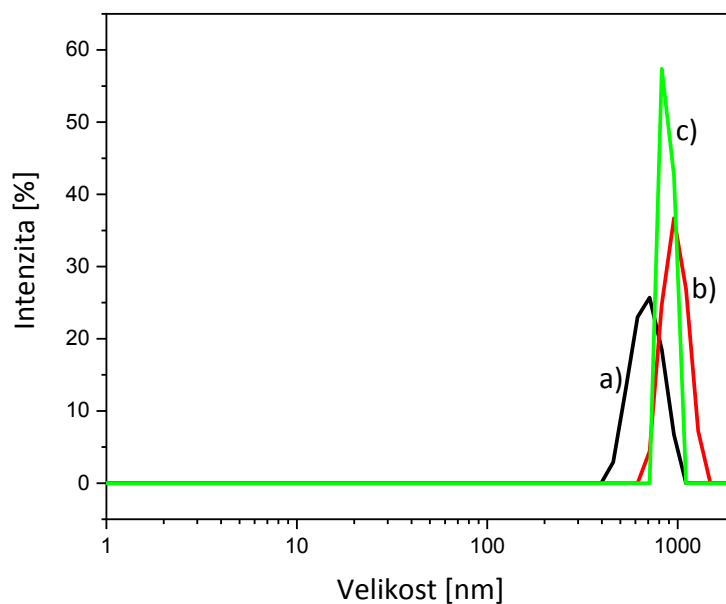
4.1.4.1 Syntéza CaIP₆ 4

Částice CaIP₆ 4, byly připraveny reakcí Ca(NO₃)₂ s (NH₄)₂HPO₄, tento koloid se poté nechal zreagovat s FeCl₃ a nakonec se nahradil fosfát fytátem. Vlastnosti těchto částic jsou shrnuty v tabulce 6.

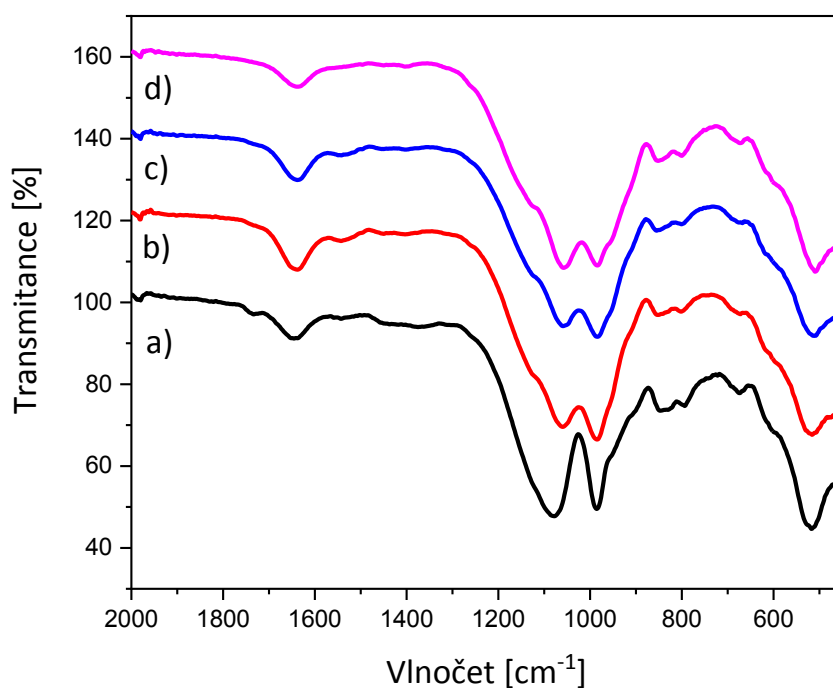
Tabulka 6 - Efektivní koncentrace Ca²⁺, Fe³⁺ a fytátu po ředění vzorků CaIP₆ série 4. Velikost a ζ potenciál získané z měření DLS.

Označení vzorku	[Ca ²⁺] / [mM]	[fytát] / [mM]	[Fe ³⁺] / [mM]	[Ca ²⁺] : [Fe ³⁺]	Velikost [nm]	ζ-potenciál, pH 7 / [mV]
CaIP ₆ 4 + 5% Fe ³⁺	4,28	3	0,225	38:1	712	-45,6
CaIP ₆ 4 + 10% Fe ³⁺	4,05	3	0,450	18:1	924	-39,6
CaIP ₆ 4 + 20% Fe ³⁺	3,60	3	0,900	8:1	880	-26,3

Velikosti částic připravených tímto způsobem byly od 700 - 900 nm a rostly s větší koncentrací železitých iontů. Naopak ζ-potenciál výrazně klesal. To pravděpodobně ukazuje na to, že protionty Fe³⁺ jsou na obalu částice, a proto výrazně klesá potenciál. Distribuce velikostí, viz obrázek 18, byla úzká, částice měly relativně uniformní tvar.



Obrázek 18 - Distribuce velikostí vzorků CaIP₆ 4 a) CaIP₆ 4 + 5% Fe³⁺; b) CaIP₆ 4 + 10% Fe³⁺; c) CaIP₆ 4 + 20% Fe³⁺.



Obrázek 19 - FTIR Spektra dopovaných vzorků CaIP₆ 4 b) CaIP₆ 4 + 5% Fe³⁺; c) CaIP₆ 4 + 10% Fe³⁺; d) CaIP₆ 4 + 10% Fe³⁺ v porovnání s nedopovaným vzorkem a) CaIP₆ 1.5.

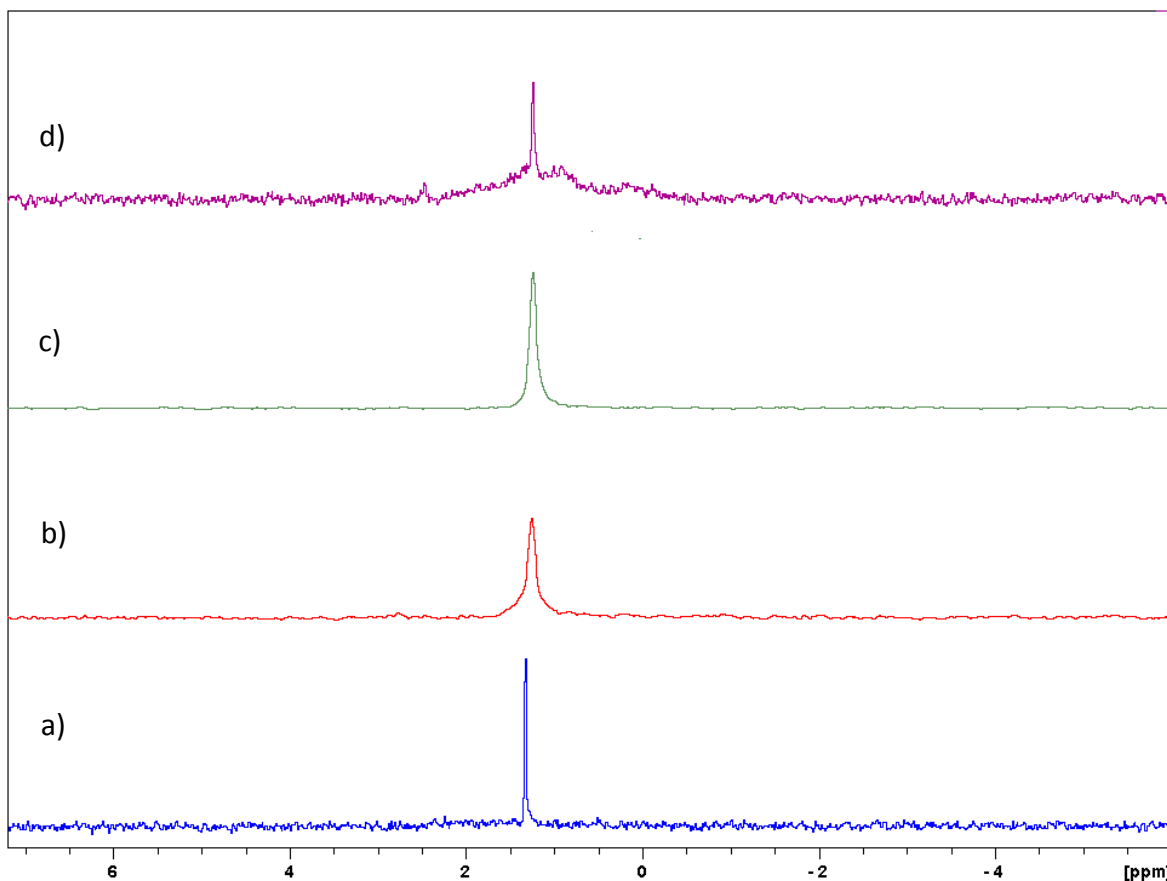
Při porovnání FTIR spekter dopovaných a nedopovaných částic, viz obrázek 19, lze vidět, že pásy jsou si v podstatě podobné. Jediná větší změna je u dvou pásů okolo 1000 cm⁻¹,

kde se vyrovnávají intenzity obou pásů a zároveň šířka pásu 1075 cm^{-1} se snižuje. Dva pásy s podobnou transmitancí v této oblasti jsou typické pro železnaté a železité sloučeniny fytátu.

Z elementární analýzy (tabulka 7) je patrné jako v předchozím případě (tabulka 3) nestechiometrický poměr mezi aniontem fytátu a protionty Ca^{2+} a Fe^{3+} a přítomnost adsorbované vody, která byla už potvrzena z FTIR měření. Rozdíl je však v molárních procentech nadopovaných Fe^{3+} iontů. U vzorků CaIP_6 2 se procentuálně komplexovalo více železitých iontů. U částic připravených druhým způsobem (syntézou přes HAP) se jenom malé procento Fe^{3+} iontů komplexovalo v částici, větší část Fe^{3+} byla odstraněna ve formě hydroxidu železitého při čištění.

Tabulka 7 - Elementární analýza vzorků CaIP_6 série 4 a pravděpodobná struktura těchto částic.

Označení vzorku	C / [mol%]	P / [mol%]	Ca / [mol%]	Fe / [mol%]	Fe : Ca	Struktura
CaIP_6 4 + 5% Fe^{3+}	10,73	14,27	9,97	0,19	0,02	$\text{C}_6\text{H}_6\text{P}_6\text{O}_{24}\text{Ca}_{5,6}\text{Fe}_{0,1} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
CaIP_6 4 + 10% Fe^{3+}	11,13	12,86	8,71	0,32	0,04	$\text{C}_6\text{H}_6\text{P}_7\text{O}_{24}\text{Ca}_{4,7}\text{Fe}_{0,2} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
CaIP_6 4 + 20% Fe^{3+}	12,3	11,67	7,41	0,59	0,08	$\text{C}_6\text{H}_6\text{P}_6\text{O}_{24}\text{Ca}_{3,6}\text{Fe}_{0,3} \cdot \text{H}_2\text{O}$



Obrázek 20 - ^{31}P NMR spektrum CaIP_6 4 a) nedopované CaIP_6 1.5; b) CaIP_6 4 + 5% Fe^{3+} ; c) CaIP_6 4 + 10% Fe^{3+} ; d) CaIP_6 4 + 20% Fe^{3+} .

Na obrázku 20 je NMR spektrum těchto částic. Žádné rozšíření signálu nebylo pozorováno. Z toho usuzujeme, že Fe^{3+} se nenachází v blízkosti fosforu fytátu. Což lze také vysvětlit postupem syntézy, železité ionty jsou na jádře HAP a neovlivňují fytát. Koncentrace železa v částici podle elementární analýzy byla malá, i proto viditelně neovlivnila spektrum.

4.1.4.2 Syntéza CaIP_6 5

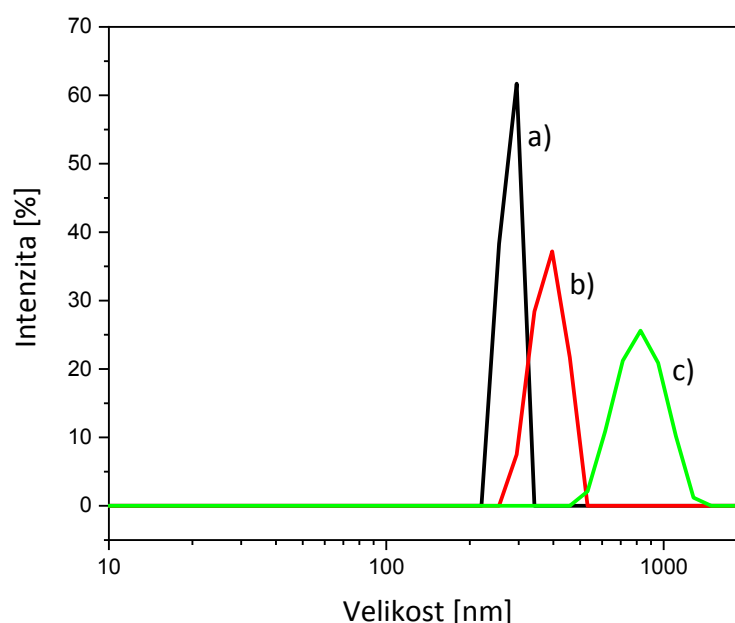
Syntéza dopovaných nanočástic CaIP_6 , kde se železité ionty přidávaly až po reakci HAP (připravené reakcí $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ s $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) s fytátem, vytvořila částice jejichž vlastnosti jsou zhrnuty v tabulce 8.

Z tabulky je patrné, že částice byly velké a jejich velikost rostla s větším přidavkem Fe^{3+} iontů. ζ potenciál částic byl záporný, ale oproti jiným syntetizovaným částicím je tento náboj nízký.

Tabulka 8 - Efektivní koncentrace Ca^{2+} , Fe^{3+} a fytátu vzorků CaIP_6 5. Velikost a ζ potenciál získané z měření DLS.

Označení vzorku	$[\text{Ca}^{2+}] / [\text{mM}]$	$[\text{fytát}] / [\text{mM}]$	$[\text{Fe}^{3+}] / [\text{mM}]$	$[\text{Ca}^{2+}] : [\text{Fe}^{3+}]$	Velikost / [nm]	ζ -potenciál, pH 7 / [mV]
CaIP_6 5 + 5% Fe^{3+}	4,28	3	0,15	28,5:1	297	-19,4
CaIP_6 5 + 10% Fe^{3+}	4,05	3	0,3	13,5:1	394	-27,1
CaIP_6 5 + 20% Fe^{3+}	3,60	3	0,6	6:1	835	-10,7

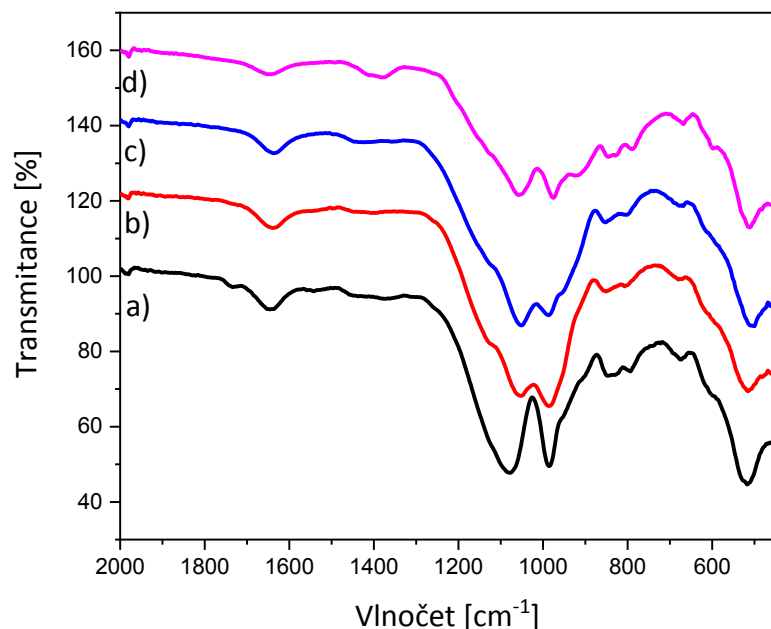
Z distribuce velikostí měřené DLS (obrázek 21) je patrná relativně úzká distribuce pro první dva vzorky (CaIP_6 5 + 5% Fe^{3+} a CaIP_6 5 + 10% Fe^{3+}) a širší distribuci pro částice s větší koncentrací železitých iontů, které zvětšovaly částice.



Obrázek 21 - Distribuce velikostí pro vzorky CaIP_6 5 a) CaIP_6 5 + 5% Fe^{3+} ; b) CaIP_6 5 + 10% Fe^{3+} ; c) CaIP_6 5 + 15% Fe^{3+} .

Na obrázku 22 je FTIR spektrum vzorků CaIP_6 5. Při porovnání dopovaných vzorků 22b, 22c, 22d s nedopovaným vzorkem 22a je vidět, že základní pásy mají podobná maxima.

Největší rozdíl je v pásech okolo 1100-900 cm^{-1} , kde jsou více patrné pásy HAP (1105 cm^{-1}) a pásy 1075 a 979 cm^{-1} jsou užší a intenzity jednotlivých pásů se mění při různých koncentracích Fe^{3+} iontů, což je typické pro sloučiny fytátu se železem.



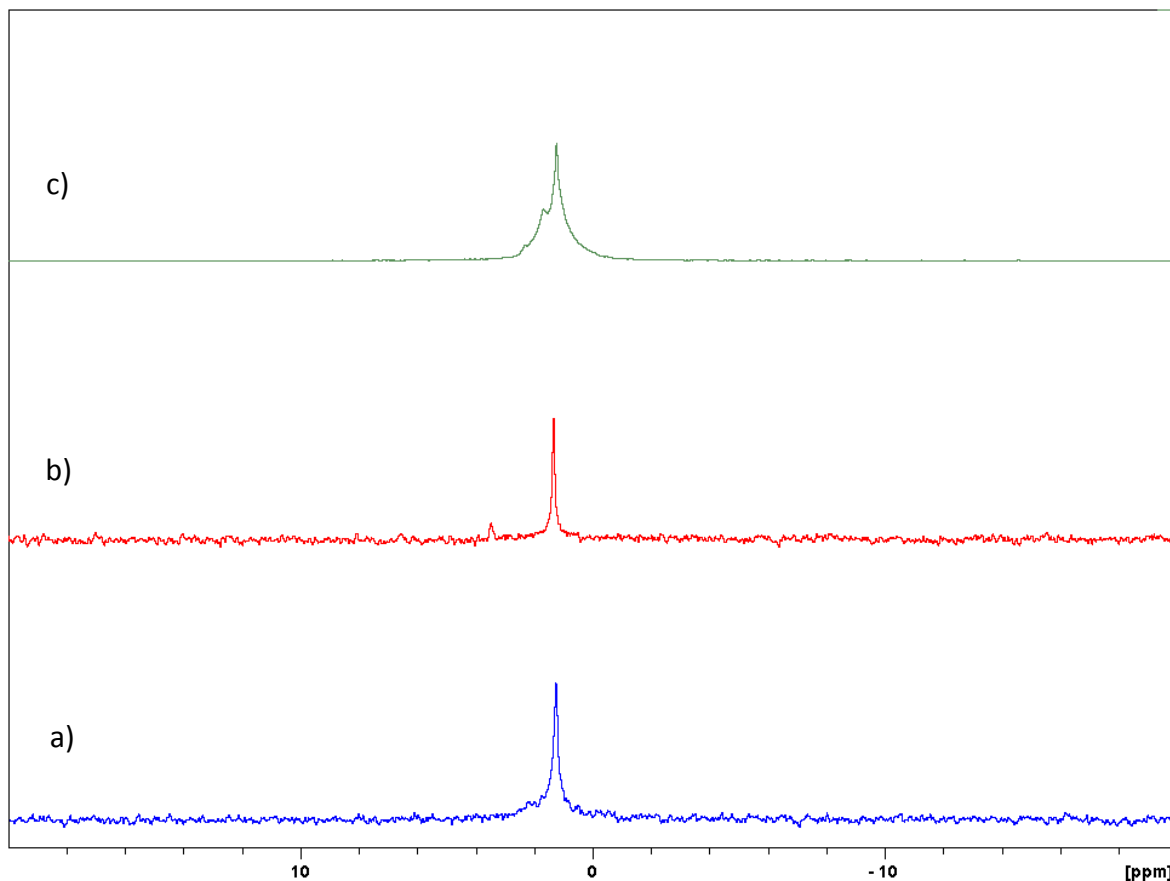
Obrázek 22 - FTIR spektra dopovaných vzorků CaIP₆ 5 v porovnání se nedopovaným vzorkem CaIP₆ 1.5. a) CaIP₆ 1.5; b) CaIP₆ 5 + 5% Fe^{3+} ; c) CaIP₆ 5 + 10% Fe^{3+} ; d) CaIP₆ 5 + 15% Fe^{3+} .

Tabulka 9 - Elementární analýza vzorků CaIP₆ série 5 a jejich pravděpodobná struktura.

Označení vzorku	C / [mol%]	P / [mol%]	Ca / [mol%]	Fe / [mol%]	Fe : Ca	Struktura
CaIP ₆ 5 + 5% Fe^{3+}	10,55	10,27	9,78	0,09	0,01	$\text{C}_6\text{H}_6\text{P}_6\text{O}_{24}\text{Ca}_{5,6}\text{Fe}_{0,05} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
CaIP ₆ 5 + 10% Fe^{3+}	9,88	12,00	8,32	0,34	0,04	$\text{C}_6\text{H}_6\text{P}_7\text{O}_{24}\text{Ca}_{5,04}\text{Fe}_{0,2} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
CaIP ₆ 5 + 20% Fe^{3+}	9,33	7,17	5,93	0,35	0,09	$\text{C}_6\text{H}_6\text{P}_7\text{O}_{24}\text{Ca}_{3,8}\text{Fe}_{0,35} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$

Z elementární analýzy (tabulka 9) je zřejmé jako v ostatních případech (tabulky 3, 7) nestechiometrický poměr mezi fytátem a protionty Fe^{3+} a Ca^{2+} a adsorbovaná voda na částici.

Stejně jako v předešlé syntéze částic přes HAP (série CaIP₆ 4) jenom malá část Fe³⁺ iontů z výchozí látky se zakomponovala do konečné částice. Domníváme se, že vysvětlení je stejné, vytvořila se sraženina Fe(OH)₃, která se poté odstranila při čištění.



Obrázek 23 - NMR spektrum částic CaIP₆ 5 a) CaIP₆ + 5% Fe³⁺; b) CaIP₆ + 10% Fe³⁺; c) CaIP₆ + 20% Fe³⁺.

Na obrázku 23 je NMR spektrum těchto částic CaIP₆ 5. Žádné rozšíření signálu nebylo, jako v případě CaIP₆ 4, pozorováno. Z toho usuzujeme, že Fe³⁺ se nenachází v blízkosti fosforu fytátu. Nerozšíření signálu lze vysvětlit postupem syntézy. Domníváme se, že železité ionty zaprvé měly malou koncentraci (viz elementární analýza, tabulka 8), aby ovlivnily spektrum (zreagovaly za vzniku Fe(OH)₃, které se odstranilo při čištění). A za druhé Fe³⁺ ionty byly na povrchu už předem vytvořené částice, nepronikly do částice, a proto se efekt rozšíření neprojevil.

4.2 Syntéza CaIP₆ 6

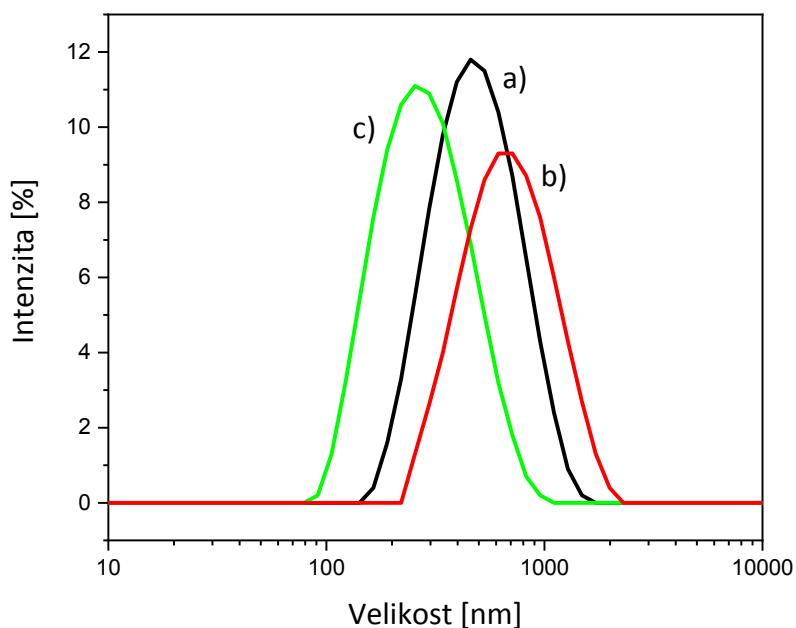
Poslením způsobem dopování CaIP₆ je metoda, kdy se Fe³⁺ ionty přidávají do reakční směsi před vznikem HAP. Přidával se FeCl₃ do roztoku Ca(NO₃)₂, vzniklý roztok se potom pomalu přidal do roztoku (NH₄)₂HPO₄. Reakce se udržovala na pH 10 amoniakem. Nakonec se nechala směs reagovat s fytátem za vzniku CaIP₆. Vlastnosti takto vyrobených částic jsou zhrnuty v tabulce 10.

Střední velikost částic pro všechny vzorky je okolo 500 nm a nebyl pozorován žádný trend pro velikosti. ζ potenciál klesal při přidavku Fe³⁺ iontů, ale klesání nebylo tak dramatické, částice byly relativně stabilní, právě díky takto vysokému zápornému ζ potenciálu.

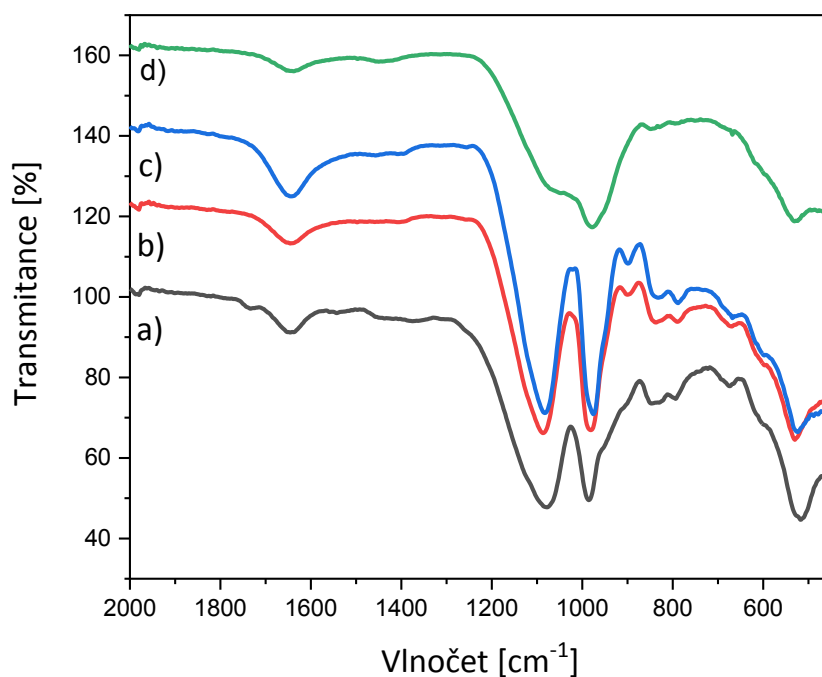
Tabulka 10 - Efektivní koncentrace Ca²⁺, Fe³⁺ a fytátu vzorků CaIP₆ 6. Velikost a ζ potenciál získané z měření DLS.

Označení vzorku	[Ca ²⁺] / [mM]	[Fe ³⁺] / [mM]	[fytát] / [mM]	[Ca ²⁺] : [Fe ³⁺]	Velikost [nm]	ζ -potenciál, pH 7, [mV]
CaIP ₆ 6 + 5% Fe ³⁺	4,275	0,075	3	57:1	462	-45,25
CaIP ₆ 6 + 10% Fe ³⁺	4,05	0,15	3	27:1	526	-40,05
CaIP ₆ 6 + 20% Fe ³⁺	3,6	0,3	3	12:1	262	-39,65

Distribuce velikostí částic je široká (obrázek 24), částice mají velikost od 100 až po 1200 nm, což není ideální velikost pro naše účely, ale je postačující. Pro trávicí trakt není nutná nanometrová velikost, jediný problém může nastat při rekomplexaci se siderofory, kde reakce může být pomalejší.



Obrázek 24 - Distribuce velikostí vzorků CaIP₆ 6 a) CaIP₆ 6 + 5% Fe³⁺ b) CaIP₆ 6 + 10% Fe³⁺ c) CaIP₆ 6 + 20% Fe³⁺.

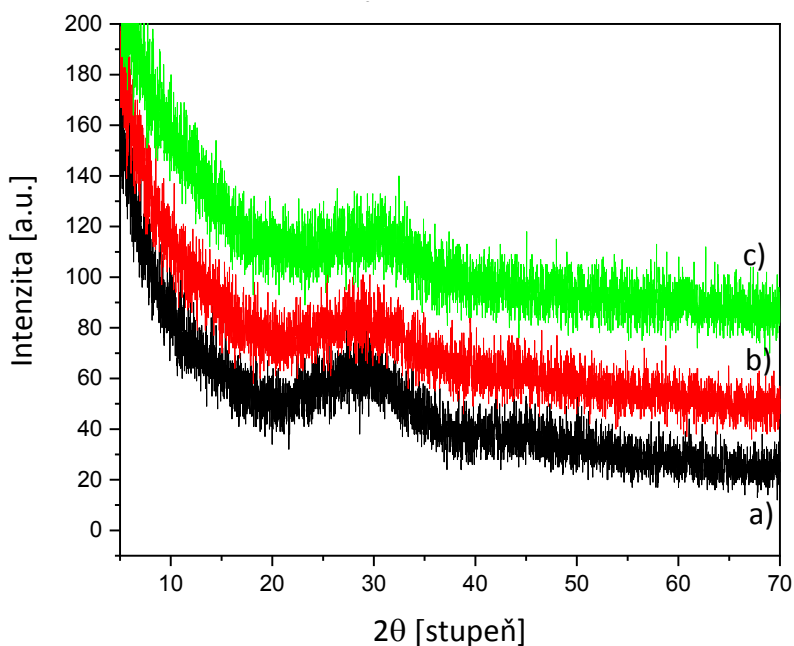


Obrázek 25 - FTIR spektra vzorků serie CaIP₆ 6 b) CaIP₆ 6 + 5% Fe³⁺; c) CaIP₆ 6 + 10% Fe³⁺; d) CaIP₆ 6 + 20% Fe³⁺ v porovnání s nedopovaným a) CaIP₆ 1.5.

U této série vzorků je nejvíce patrný rozdíl mezi FTIR spektry nedopovaného CaIP₆ a dopovaných vzorků. Spektra pro CaIP₆ 6 + 5% Fe³⁺ a + 10% Fe³⁺ (viz obrázek 25b, 25c) jsou

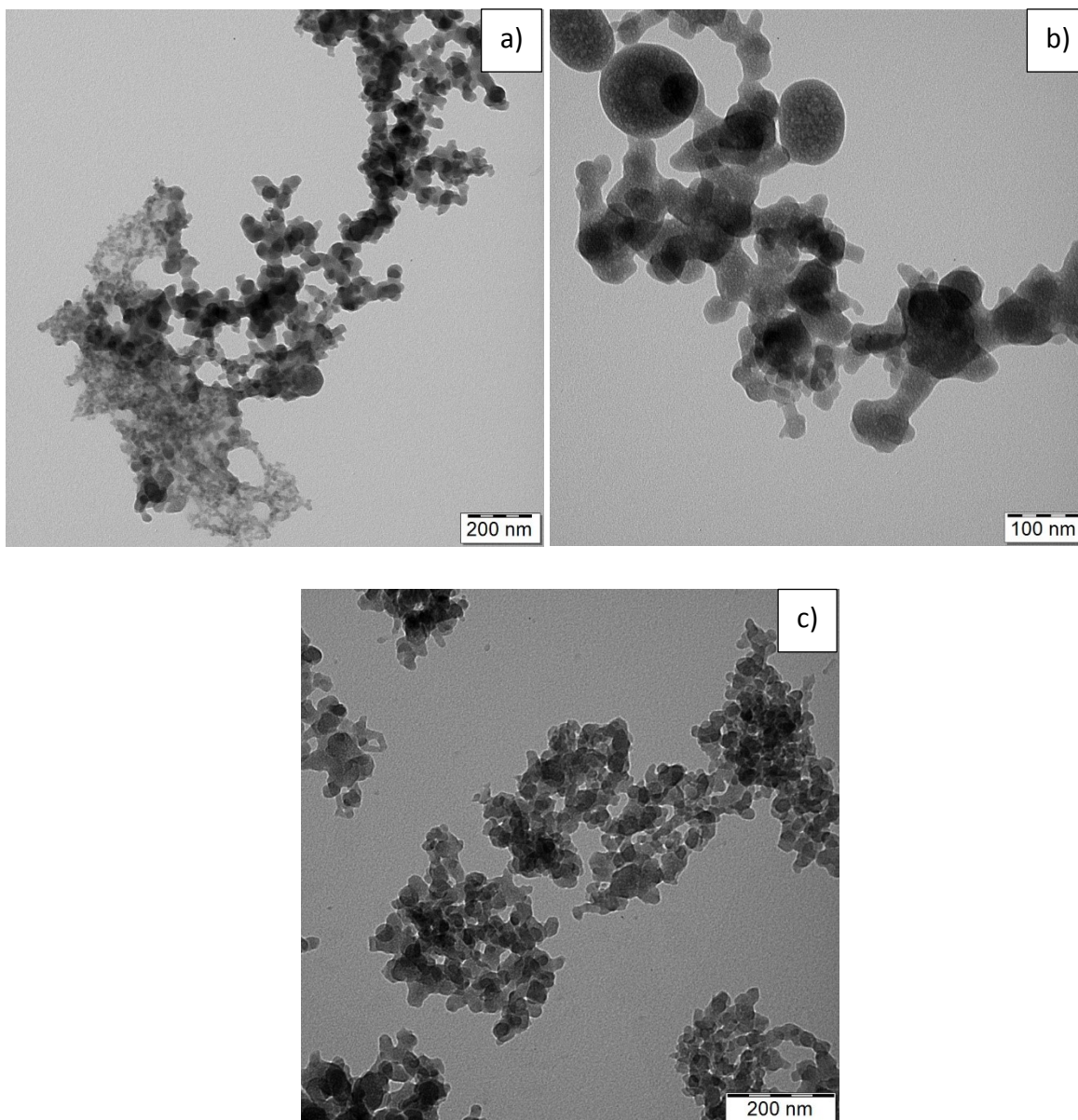
v podstatě totožná a nedochází u nich žádné výraznější změně oproti neopovanému vzorku (20a). Jediný výraznější rozdíl je, že je výraznější pás 900 cm^{-1} přiřazený vibraci C-O-P. Zato u třetího vzorku $\text{CaIP}_6 + 20\% \text{Fe}^{3+}$ (25d) pozorujeme výraznou změnu u pásů 1074 a 974 cm^{-1} . Tyto pásy se nejvíce podobají dříve popsaným spektrům železitých sloučenin fytátu,¹⁸ kde nejsou tak výrazně oddělené jako u vápenaté soli. Domníváme se, že důvodem proč došlo k takové výrazné změně spekter, je větší konečná koncentrace železa v částici, oproti ostatním vzorkům.

V porovnání s vzorkem CaIP_6 3 (obrázek 10), což je stejná částice pouze připravena metodou srážení, lze vidět, že trend je podobný. První dva vzorky s 5% a 10% přídavkem Fe^{3+} mají podobný tvar a velikost a s větším přídavkem Fe^{3+} se tvar dvou hlavních píků mění stejným trendem jako u vzorků CaIP_6 6.



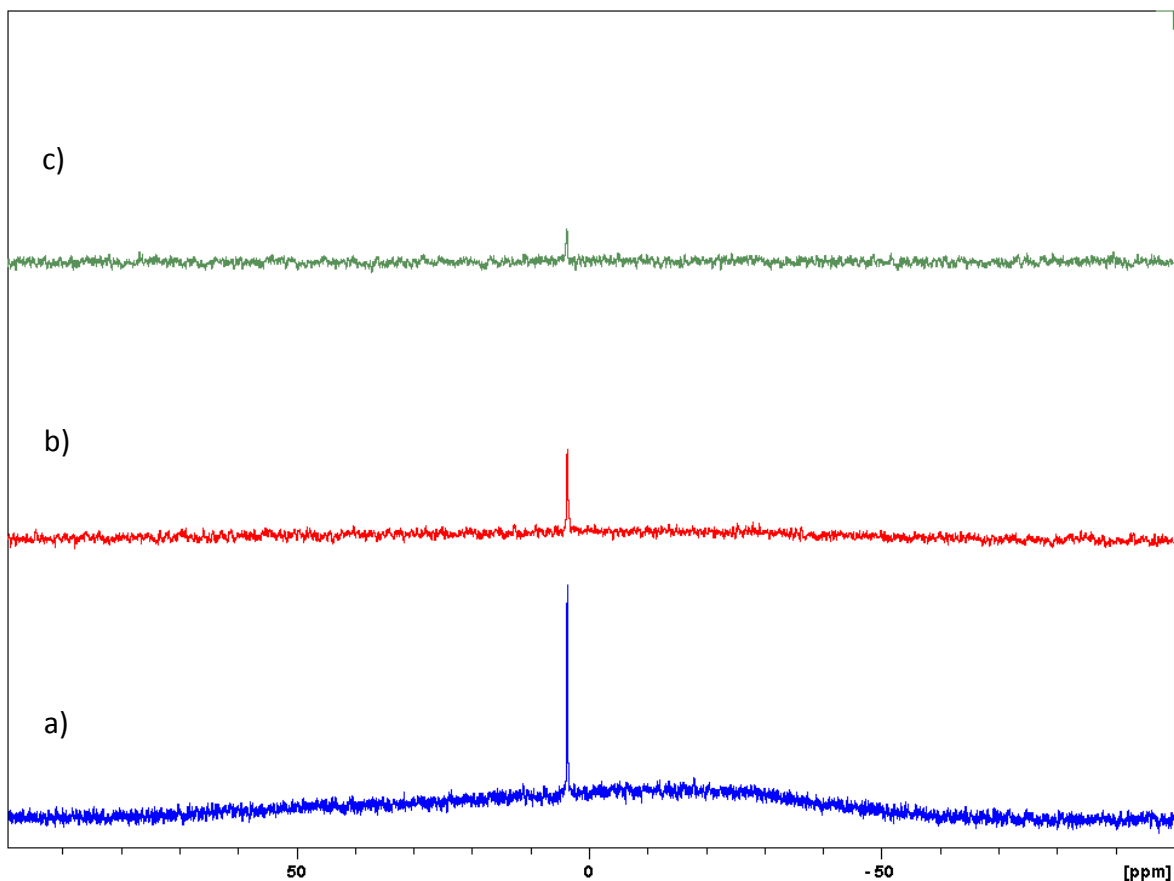
Obrázek 26 - WAXS měření vzorků CaIP_6 6 připravené metodou přes HAP. a) CaIP_6 6 + 5% Fe^{3+} ; b) CaIP_6 6 + 10% Fe^{3+} ; c) CaIP_6 6 + 15% Fe^{3+} .

Z WAXS měření (obrázek 26) je vidět, že žádná krystalická fáze se v částicích nevyskytovala, výměna fosfátu za fytát byla kvantitativní. Široký pás od 20 - 30° je pás málo krystalického fytátu vápenatého.



Obrázek 27 - TEM obrázky vzorků CaIP₆ 6 syntetizované přes HAP, a) CaIP₆ 6 + 5% Fe³⁺; b) CaIP₆ 6 + 10% Fe³⁺; c) CaIP₆ 6 + 20% Fe³⁺.

Na obrázku 27 jsou zobrazeny částice CaIP₆ 6 pomocí transmisního elektronového mikroskopu. Na prvních dvou obrázcích (vzorky CaIP₆ 6 + 5% Fe³⁺ a CaIP₆ 6 + 10% Fe³⁺) je vidět pár kulovitých částic velikosti 100 nm. Většina částic má však nepravidelný tvar, což je pravděpodobně výsledek dopování částic železitými ionty. Nepravidelnost částic také ovlivnilo měření DLS, a proto podle toho měření jsou částice veliké.



Obrázek 28 - NMR spektrum částic CaIP₆ připravené metodou přes HAP a) CaIP₆ 6 + 5% Fe³⁺; b) CaIP₆ 6 + 10% Fe³⁺; c) CaIP₆ 6 + 20% Fe³⁺.

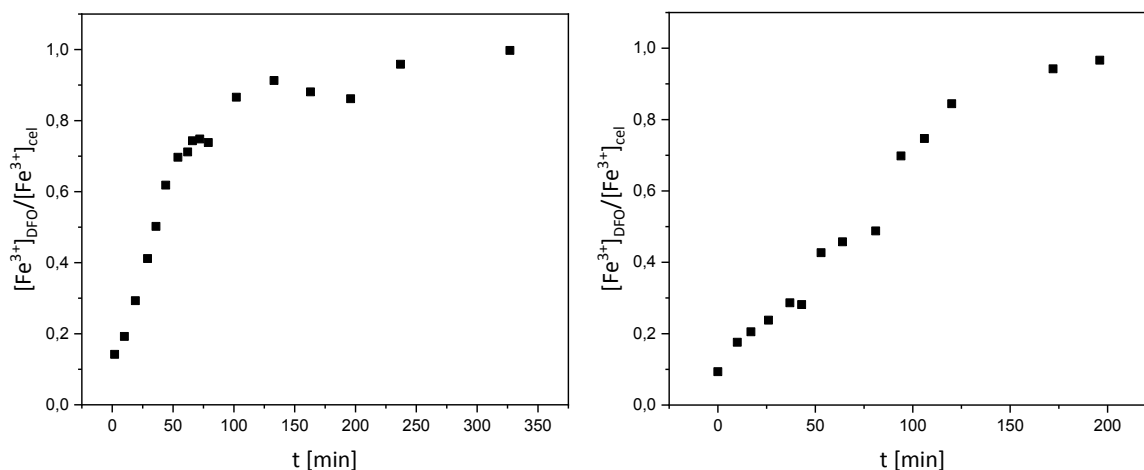
Na obrázku 28 je NMR spektrum částic CaIP₆ 6 připravené metodou přes hydroxyapatit. Z nich je patrné, že jsou přítomné dvě frakce. Oba dva tyto píky s větší koncentrací železitých iontů mají nižší intenzitu. Rozšíření širšího píku bylo už dostatečné pro vzorek CaIP₆ 6 + 10% Fe³⁺. Užší pík pravděpodobně odpovídá kulatým částicím fytátu a širší pík nepravidelně tvarovaným částicím. Domníváme se, že koncentrace Fe³⁺ iontů bude podobná jako pro vzorky CaIP₆ 2, kde 2,11 mol% Fe³⁺ dostatečně rozšířilo signál.

4.3 Rekomplexace Fe³⁺ iontu v částici s deferoxaminem

Fe³⁺ ionty mají větší afinitu k DFO než k CaIP₆, a protože je DFO-Fe³⁺ komplex barevný, tato reakce se dá sledovat UV/VIS spektroskopií.

Pro zkoumání komplexace Fe³⁺ s DFO byly vybrány vzorky CaIP₆ 2 (respektive CaIP₆ 2 + 10% Fe³⁺ a CaIP₆ 2 + 50% Fe³⁺) pro jejich jinak optimální vlastnosti, hlavně velikost a stabilitu.

Na obrázku 29 vpravo je časová závislost absorbance pro vzorek CaIP₆ 2 + 50% Fe³⁺, když koncentrace DFO byla desetkrát větší než koncentrace fytátu. Z něho je patrné, že zhruba po 90 minutách bylo přes 80 % Fe³⁺ v komplexu s DFO, rychlost reakce v lineární oblasti byla 6,0 nM/min.

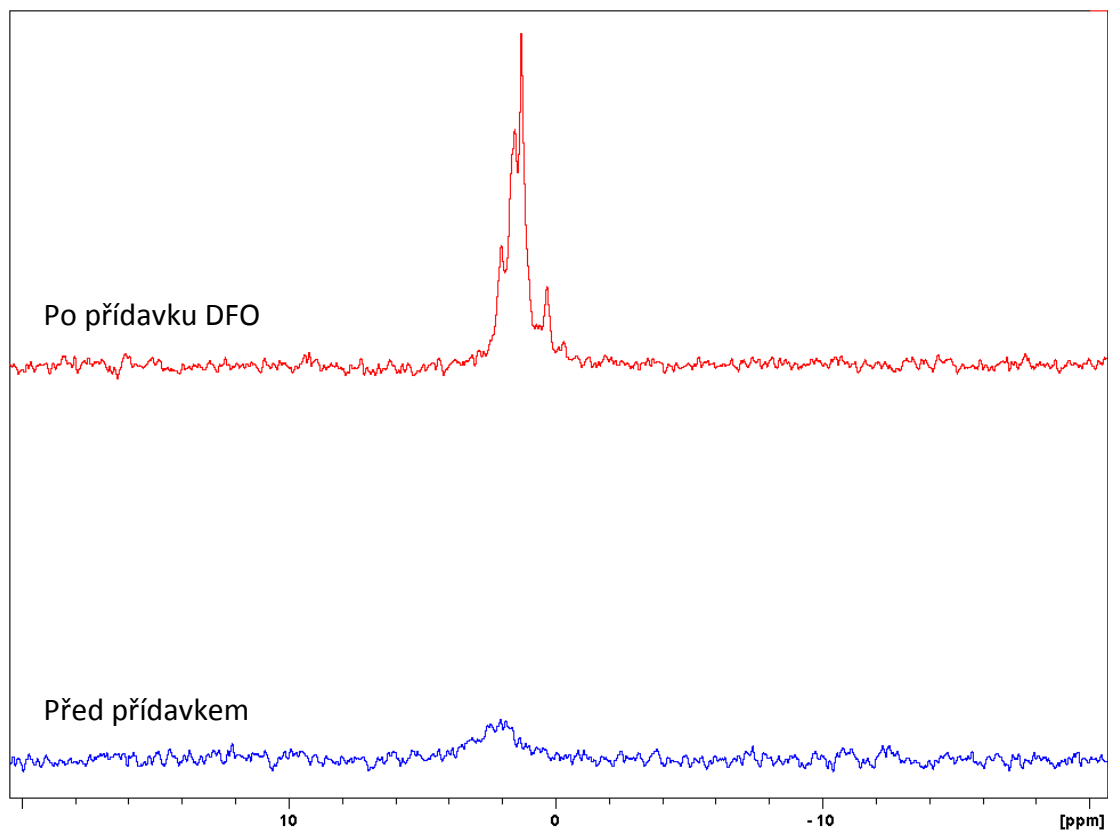


Obrázek 29 - Vývoj v čase poměru koncentrací Fe³⁺ iontů v DFO vůči celkové koncentraci pro vzorek CaIP₆ 2 + 50% Fe³⁺ vlevo a pro vzorek CaIP₆ 2 + 10% Fe³⁺, poměr [DFO]:[CaIP₆] byl 10:1.

Pro vzorek CaIP₆ 2+10% Fe³⁺ (obrázek 30 vlevo) byla rychlost reakce pomalejší při stejných poměrech koncentrací, jenom 2 nM·min⁻¹ a 80 % Fe³⁺ iontů bylo uvolněno v fytátu až po 110 minutách.

Domníváme se, že uvolňování Fe³⁺ iontů ze vzorku je silně ovlivněno tím jak jsou Fe³⁺ ionty přístupné. Proto i vzorek s větším obsahem Fe³⁺ může mít rychlejší reakci uvolňování, protože jsou ionty více přístupné pro DFO. V každém případě je rychlost dekomplexace dostatečná pro zobrazení bakteriální mikroflóry produkující bakteriosiderofory.

Na obrázku 30 je vidět obnova ³¹P NMR signálu po přidavku DFO ke vzorku CaIP₆ 2 + 10% Fe³⁺, kde poměr koncentrací CaIP₆ ku DFO byl 1:1. Ze spekter je patrné velký nárůst signálu po rekomplexaci železitých iontů sideroforem.



Obrázek 30 - NMR spektrum CaIP₆ 2 + 10% Fe³⁺ před a po přidavku DFO.

5 Závěr

V diplomové práci byly syntetizovány částice fytátu vápenatého dopované Fe^{3+} ionty. Byly navrženy a vyzkoušeny čtyři metody syntézy. Většina metod vedla k příliš velikým částicím pro praktické použití a některé metody neposkytovaly pro naše potřeby důležité rozšíření signálu.

Metody syntézy dopovaných částic přes HAP se ukázaly jako nevhodné. Částice označené jako CaIP₆ 4, které se dopovaly železitými ionty až po reakci $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ s $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (vytvoření HAP nanočástic) a nakonec zreagované s fytátem, byly příliš velké, ale hlavně neposkytovaly důležité rozšíření signálu. Stejně tak částice označené CaIP₆ 5, které se dopovaly Fe^{3+} ionty až po vytvoření fytátu vápenatého, neposkytovaly rozšíření signálu a neměly správnou velikost. Ani třetí postup syntézy přes HAP neposkytoval správně velké částice, ale rozšíření signálu se objevilo. Tyto částice, označené jako CaIP₆ 6 se dopovaly Fe^{3+} ionty hned před syntézou HAP, kdy se nechal zreagovat FeCl_3 s $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, poté se vytvořily částice HAP reakcí s $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a nakonec se vytvořil fytát vápenatý dopovaný Fe^{3+} reakcí s fytátem sodným.

Nejlepší metodou se ukázala metoda srážení fytátu vápenatou solí. Tyto vzorky, označené jako CaIP₆ 2, měly dostatečné rozšíření signálu při obsahu Fe^{3+} 2,1 mol%. Dva vzorky z této série (s obsahem železa 2,1 mol% a 8,91 mol%) byly rekomplexovány deferoxaminem, kde u obou vzorků po dvou hodinách byly všechny Fe^{3+} ionty uvolněny z fytátu. Nakonec se i ověřila obnova ^{31}P NMR signálu s přidavkem DFO, kde byl viditelný nárůst signálu oproti vzorku před přidavkem DFO. Tyto částice (CaIP₆ 2) byly také měřeny na MRI. Kde bylo také pozorováno snížení signálu s přidavkem Fe^{3+} v částici a zároveň zvýšení relaxačních časů.

6 Zdroje

¹ Nanoparticle. *ScienceDaily*. <https://www.sciencedaily.com/terms/nanoparticle.html> (cit. 7.4.2019).

² Dobson, P.; Jarvie, Helen; King, Stephen. Nanoparticle. *Encyklopedia britannica*, 2019. <https://www.britannica.com/science/nanoparticle.html> (cit. 7.4.2019).

³ Sokolova, V.; Epple, M. Inorganic Nanoparticles as Carriers of Nucleic Acids into Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (8), 1382–1395. <https://doi.org/10.1002/anie.200703039>.

⁴ Harland, B. F.; Morris, E. R. Phytate: A Good or a Bad Food Component? *Nutrition Research* **1995**, *15* (5), 733–754. [https://doi.org/10.1016/0271-5317\(95\)00040-P](https://doi.org/10.1016/0271-5317(95)00040-P).

⁵ Raboy, V. Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-Hexakisphosphate. *Phytochemistry* **2003**, *64* (6), 1033–1043. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00446-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00446-1).

⁶ Harland, B. F.; Narula, G. Food Phytate and Its Hydrolysis Products. *Nutrition Research* **1999**, *19* (6), 947–961. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(99\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00055-X).

⁷ Isbrandt, L. R.; Oertel, R. P. Conformational States of Myo-Inositol Hexakis(Phosphate) in Aqueous Solution. A Carbon-13 NMR, Phosphorus-31 NMR, and Raman Spectroscopic Investigation. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (9), 3144–3148. <https://doi.org/10.1021/ja00529a043>.

⁸ Ganesan, K.; Epple, M. Calcium Phosphate Nanoparticles as Nuclei for the Preparation of Colloidal Calcium Phytate. *New J. Chem.* **2008**, *32* (8), 1326. <https://doi.org/10.1039/b803903h>.

⁹ Brigando, C.; Mossoyan, J. C.; Favier, F.; Benlian, D. Conformational Preferences and Protonation Sequence of Myo-Inositol Hexaphosphate in Aqueous Solution; Potentiometric and Multinuclear Magnetic Resonance Studies. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, No. 4, 575. <https://doi.org/10.1039/dt9950000575>.

¹⁰ Bieth, H.; Spiess, B. A Comparative Study of the Protonation of Myo-Inositol Hexakis(Phosphate). *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1986**, *82* (6), 1935. <https://doi.org/10.1039/f19868201935>.

¹¹ Barre, R.; Courtois, J. E.; Wormser, G. Study of the structure of phytic acid by means of its titration curves and by means of the conductivity of its solutions. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **1954**, *36* (4–5), 455–474. ISSN: 0037-9042.

¹² Kumler, W. D.; Eiler, J. J. The Acid Strength of Mono and Diesters of Phosphoric Acid. The n-Alkyl Esters from Methyl to Butyl, the Esters of Biological Importance, and the Natural Guanidine Phosphoric Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65* (12), 2355–2361. <https://doi.org/10.1021/ja01252a028>.

¹³ Costello, A. J. R.; Glonek, T.; Myers, T. C. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance PH Titrations of Myo-Inositol Hexaphosphate. *Carbohydrate Research* **1976**, *46* (2), 159–171. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84287-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84287-1).

¹⁴ Genesan, K. Functionalization of Calcium Phosphate Nanoparticles with Organic Phosphates. Dissertation thesis, Universität Duisburg-Essen: Essen, 2008.

¹⁵ Imam, S.; Killingsworth, M. Radiopharmacy: Search for an Optimal Colloid for Sentinel Node Imaging. *World J Nucl Med* **2005**, *4* (3), 179–183. ISSN: 1450-1147.

¹⁶ Dao, T. H. Polyvalent Cation Effects on Myo-Inositol Hexakis Dihydrogenphosphate Enzymatic Dephosphorylation in Dairy Wastewater. *J. Environ. Qual.* **2003**, *32* (2), 694–701. ISSN: 0047-2425.

¹⁷ Evans, W. J.; Pierce, A. G. Interaction of Phytic Acid with the Metal Ions, Copper (II), Cobalt (II), Iron (III), Magnesium (II), and Manganese (II). *J Food Science* **1982**, *47* (3), 1014–1015. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb12769.x>.

¹⁸ He, Z.; Honeycutt, C. W.; Zhang, T.; Bertsch, P. M. Preparation and FT-IR Characterization of Metal Phytate Compounds. *Journal of Environment Quality* **2006**, *35* (4), 1319. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0008>.

¹⁹ Ferraz, M. P.; Monteiro, F. J.; Manuel, C. M. Hydroxyapatite Nanoparticles: A Review of Preparation Methodologies. *J Appl Biomater Biomech* **2004**, *2* (2), 74–80. ISSN: 1722-6899.

²⁰ Pang, Y. X.; Bao, X. Influence of Temperature, Ripening Time and Calcination on the Morphology and Crystallinity of Hydroxyapatite Nanoparticles. *Journal of the European Ceramic Society* **2003**, *23* (10), 1697–1704. [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(02\)00413-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(02)00413-2).

²¹ Sarath Chandra, V.; Baskar, G.; Suganthi, R. V.; Elayaraja, K.; Ahymah Joshy, M. I.; Sofi Beaula, W.; Mythili, R.; Venkatraman, G.; Narayana Kalkura, S. Blood Compatibility of Iron-Doped Nanosize Hydroxyapatite and Its Drug Release. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2012**, *4* (3), 1200–1210. <https://doi.org/10.1021/am300140q>.

²² Deshmukh, K.; Shaik, M. M.; Ramanan, S. R.; Kowshik, M. Self-Activated Fluorescent Hydroxyapatite Nanoparticles: A Promising Agent for Bioimaging and Biolabeling. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2016**, *2* (8), 1257–1264. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00169>.

²³ Weissleder, R.; Mahmood, U. Molecular Imaging. *Radiology* **2001**, *219* (2), 316–333. <https://doi.org/10.1148/radiology.219.2.r01ma19316>.

²⁴ Cherry, S. R. Multimodality in Vivo Imaging Systems: Twice the Power or Double the Trouble? *Annual Review of Biomedical Engineering* **2006**, *8* (1), 35–62. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095728>.

²⁵ Busquets, M. A.; Estelrich, J.; Sánchez-Martín, M. J. Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging: From Simple to Dual Contrast Agents. *International Journal of Nanomedicine* **2015**, 1727. <https://doi.org/10.2147/IJN.S76501>.

²⁶ Na, H. B.; Song, I. C.; Hyeon, T. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Advanced Materials* **2009**, *21* (21), 2133–2148. <https://doi.org/10.1002/adma.200802366>.

²⁷ Dračinský, M. Relaxace. *NMR, Jaderná magnetická rezonance*, 2019. <http://www.studiumchemie.wz.cz/NMR/index.php?stranka=skripta&kapitola=11>, (cit. 15.4.2019).

²⁹ Spyros, A.; Dais, P. 31P NMR Spectroscopy in Food Analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2009**, *54* (3–4), 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2008.09.002>.

³⁰ Burt, C. T.; Cohen, S. M.; Barany, M. Analysis of Intact Tissue with ³¹P NMR. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **1979**, *8* (1), 1–25.

<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.08.060179.000245>.

³¹ Šala, M.; Makuc, D.; Kolar, J.; Plavec, J.; Pihlar, B. Potentiometric and ³¹P NMR Studies on Inositol Phosphates and Their Interaction with Iron(III) Ions. *Carbohydrate Research* **2011**, *346* (4), 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.021>.

³² Brown, R.; Lakshmanan, K.; Madelin, G.; Parasoglou, P. A Nested Phosphorus and Proton Coil Array for Brain Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. *NeuroImage* **2016**, *124*, 602–611. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.08.066>.

³³ Luyten, P. R.; Bruntink, G.; Sloff, F. M.; Vermeulen, J. W. A. H.; Van Der Heijden, J. I.; Den Hollander, J. A.; Heerschap, A. Broadband Proton Decoupling in Human ³¹P NMR Spectroscopy. *NMR in Biomedicine* **1989**, *1* (4), 177–183. <https://doi.org/10.1002/nbm.1940010405>.

³⁴ Glover, G. H. Overview of Functional Magnetic Resonance Imaging. *Neurosurgery Clinics of North America* **2011**, *22* (2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2010.11.001>.

³⁵ Histed, S. N.; Lindenberg, M. L.; Mena, E.; Turkbey, B.; Choyke, P. L.; Kurdziel, K. A. Review of Functional/Anatomical Imaging in Oncology: *Nuclear Medicine Communications* **2012**, *33* (4), 349–361. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e32834ec8a5>.

³⁶ Geraldès, C. F. G. C.; Laurent, S. Classification and Basic Properties of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2009**, *4* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1002/cmml.265>.

³⁷ Gilad, A. A.; Ziv, K.; McMahon, M. T.; van Zijl, P. C. M.; Neeman, M.; Bulte, J. W. M. MRI Reporter Genes. *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, *49* (12), 1905–1908. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.053520>.

³⁸ Boukhalfa, H.; Crumbliss, A. L. Chemical Aspects of Siderophore Mediated Iron Transport. *BioMetals* **2002**, *15* (4), 325–339. <https://doi.org/10.1023/A:1020218608266>.

³⁹ Miethke, M.; Marahiel, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2007**, *71* (3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>.

⁴⁰ Brittenham, G. M.; Griffith, P. M.; Nienhuis, A. W.; McLaren, C. E.; Young, N. S.; Tucker, E. E.; Allen, C. J.; Farrell, D. E.; Harris, J. W. Efficacy of Deferoxamine in Preventing Complications of Iron Overload in Patients with Thalassemia Major. *New England Journal of Medicine* **1994**, *331* (9), 567–573. <https://doi.org/10.1056/NEJM199409013310902>.

⁴¹ Selim, M. Deferoxamine Mesylate: A New Hope for Intracerebral Hemorrhage: From Bench to Clinical Trials. *Stroke* **2009**, *40* (3, Supplement 1), S90–S91. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.533125>.