

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Martin HLADÍK

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE NANOČÁSTIC PRO *IN*
VITRO BUNĚČNÉ STUDIE**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES
FOR IN VITRO CELL STUDIES**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Peter Černocho, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 17. 08. 2015

.....

podpis

Tímto bych srdečně poděkoval Mgr. Peteru Černochovi, Phd. a Mgr. Martinovi Hrubému, Phd. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé diplomové práce. Dále bych rád poděkoval všem členům oddělení rentgenové a neutronové strukturní analýzy za veškerou pomoc a získávání výsledků, RNDr. Petru Štěpánkovi, DrSc., za umožnění pracovat na Ústavu makromolekulární chemie a všem členům oddělení nadmolekulárních polymerních systémů.

Klíčová slova:

nanočástice

wolframan vápenatý

pokrytí polysacharidem

transmisní elektronová mikroskopie

maloúhlový rozptyl rentgenového záření

dvoufotonová konfokální mikroskopie

Key words:

nanoparticles

calcium tungstate

coverage by polysaccharide

transmission electron microscopy

small angle X-ray scattering

two-photon confocal microscopy

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá přípravou, metodami charakterizace a *in vitro* zobrazováním nanočástic s velký potenciál pro lékařskou diagnostiku. Klíčovou roli v této práci zaujímají nanočástice tvořené jádrem z wolframanu vápenatého, CaWO_4 , pokryté přírodním polysacharidem dohromady sloužící jako vhodný model kontrastní látky pro buněčné zobrazovací techniky. Přirozené vlastnosti CaWO_4 , jako je pohlcování rentgenové záření, přirozené fluorescenční schopnosti a možnosti dopování fluorescenčně aktivními lanthanoidy, vytváří z nanočástic vhodné kandidáty na pozici kontrastních činidel pro zobrazovací metody v diagnostice onkologických onemocnění. Navíc pokrytím anorganického jádra přírodním polysacharidem dosahují nanočástice požadované velikosti a možnosti aktivního cílení se specifickými nebo nespecifickými interakcemi s buněčnou membránou, které jsou rozhodujícími faktory při *in vitro* buněčných studiích.

Byla nalezena nejvhodnější syntéza jak dopovaného tak i nedopovaného jádra tohoto modelu dosahující tvorby sférických částic koloidních rozměrů. Dopování bylo realizováno červeně fluoreskujícím trojmocným europiem, Eu^{3+} , a zeleně fluoreskujícím trojmocným terbiem, Tb^{3+} , a ani jeden z těchto dopantů neovlivnil původní krystalickou strukturu CaWO_4 . V další etapě byly tyto fluorescenční jádra úspěšně dispergovány v roztoku čtyř vybraných přírodních polysacharidů (alginátu sodného, guaru, mananu a dextranu) při třech různých pH (5; 6,5 a 7,4) pomocí HEPES pufru a byla prokázána určitá časová stabilita. V závěrečné fázi byly s Tb^{3+} dopovanými částicemi provedeny *in vitro* experimenty na buněčné linii hepatocelulárního karcinomu, HepG2, a osteosarkomu, MG-63. Bylo potvrzeno, že guar je cílený pouze na HepG2, protože na rozdíl od MG-63 mají na povrchu asialoglykoproteinový receptor. Vlastnosti nanočástic byly studovány metodami rastrovací a transmisní elektronové mikroskopie (SEM a TEM), širokouhlé difrakce rentgenového záření (WAXD), dynamického rozptylu světla (DLS), malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS) a dvoufotonové konfokální mikroskopie (2PCM).

Abstract

This thesis deals with the preparation, characterization methods and *in vitro* imaging of nanoparticles with great potential for medical diagnostics. A key role in this work occupy nanoparticles comprising a core of calcium tungstate, CaWO_4 , covered by a natural polysaccharide together serve as a suitable model contrast agent for cell imaging techniques. CaWO_4 natural properties such as the absorption of X-rays, natural fluorescence capabilities and capacities for doping fluorescently active lanthanides, makes from nanoparticles suitable candidates for the position of contrast agents for imaging in the diagnosis of oncological diseases. Moreover, by coverage of the inorganic core by natural polysaccharide nanoparticles reach the desired size and the possibility of active targeting to specific or nonspecific interactions with the cell membrane, which are key factors in *in vitro* cell studies.

It was found the most suitable synthesis both doped and undoped core of this model reaching the formation of spherical particles of colloidal dimensions. Doping was realized by red fluorescent trivalent europium, Eu^{3+} , and green fluorescent trivalent terbium, Tb^{3+} , and neither of these dopants affected the original crystalline structure CaWO_4 . In the next stage, these fluorescent nuclei successfully dispersed in the solution of the four selected natural polysaccharides (sodium alginate, guar, dextran and mannan) at three different pH values (5; 6.5 and 7.4) with HEPES buffer and was demonstrated certain stability over time. In the final stage were performed *in vitro* experiments with the Tb^{3+} doped particles conducted on cell line hepatocellular carcinoma HepG2 and osteosarcoma MG-63. It was confirmed that guar is targeted only to HepG2, because unlike to MG-63 have at surface a asialoglycoprotein receptor. Properties of nanoparticles were studied by scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM), X-ray wide angle diffraction radiation (WAXD), dynamic light scattering (DLS), small-angle x-ray scattering (SAXS), confocal microscopy and two-photon (DPCM).

Obsah

1	Úvod	15
2	Cíl práce	16
3	Literární přehled	17
3.1	Metody neinvazivního zobrazování	17
3.1.1	Fluorescenční zobrazování	20
3.2	Modelová kontrastní látka nanočástice CaWO_4 pokryté přírodním polysacharidem	23
3.2.1	CaWO_4 – jádro nanočástice	23
3.2.1	CaWO_4 – jádro nanočástice	23
3.2.2	Přírodní polysacharid – obal nanočástice	29
4	Princip použitých metod	30
4.1	Elektronová mikroskopie (EM)	30
4.1.1	Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)	31
4.1.2	Transmisní elektronová mikroskopie	32
4.1.2.1	Zobrazování ve světlém poli (TEM/BF)	34
4.1.2.2	Elektronová difrakce se selekční clonou (TEM/SAED)	35
4.1.2.3	Energiově-disperzní rentgenová spektroskopie (TEM/EDX)	35
4.2	Dynamický rozptyl světla (DLS)	36

4.3	Širokoúhlá difrakce & širokoúhlý rozptyl rentgenového záření (WAXD & WAXS)	39
4.4	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)	41
4.6	Fluorescenční konfokální mikroskopie (FCM)	43
4.6.1	Konfokální laserová skenovací mikroskopie (LSCM)	43
4.6.2	Dvoufotonová konfokální mikroskopie (DPCM)	44
5	Experimentální část	46
5.1	Použité chemikálie	46
5.2	Příprava vzorků CaWO ₄	47
5.2.1	Syntetické postupy	47
5.2.1.1	Syntéza CaWO ₄ v různých stabilizátorech	47
5.2.1.2	Syntéza CaWO ₄ ve směsi ethylen glykol – voda v poměru 5:1 (v/v)	50
5.2.1.3	Syntéza Ln ³⁺ :CaWO ₄ ve směsi ethylen glykol – voda v poměru 5:1 (v/v)	51
5.2.1	Homogenizační postupy	52
5.3	<i>in vitro</i> buněčné studie	52
5.4	Instrumentace	54

5.4.1	Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)	54
5.4.2	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	54
5.4.3	Dynamický rozptyl světla (DLS)	55
5.4.4	Širokoúhlá difrakce rentgenového záření (WAXD)	56
5.4.5	Širokoúhlý & Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (WAXD & SAXS)	57
5.4.5	Dvoufotonová konfokální mikroskopie (DPCM)	57
6	Charakterizace nanočástic	58
6.1	Charakterizace jádra nanočástic – CaWO ₄	58
6.1.1	Nejvhodnější syntéza	59
6.1.2	Optimalizace nejvhodnější syntézy	61
6.1.3	Celková TEM analýza CaWO ₄	63
6.1.4	Dopování CaWO ₄ , charakterizace Ln ³⁺ :CaWO ₄	65
6.2	Charakterizace a stabilizace polysacharidem pokrytého CaWO ₄ a Ln ³⁺ :CaWO ₄	69
6.2.1	Stabilizace ve vodném roztoku monosacharidu	69

6.2.1	Stabilizace ve vodném roztoku polysacharidu o daném pH	70
6.2.1	Stabilizace ve vodném roztoku polysacharidu o daném pH	71
6.2.2	SAXS analýza časové stability nanočástic	75
6.2.2	DLS analýza časové stability nanočástic v mananu	79
7	<i>In vitro</i> buněčné studie	81
6	Závěr	85
	Seznam použité literatury	86

Seznam použitých zkratk

ASGPR	Asialoglycoprotein receptor	Asialoglykoproteinový receptor
BF	Bright field	
BMT	Bioluminescence molecular tomography	Bioluminiscenční molekulární tomografie
BR pufr	Britton-Robinson buffer	Britton-Robinsonův pufr
BSE	Back-scattered electrons	Zpětně rozptýlené elektrony
CM	Confocal microscopy	Konfokální mikroskopie
CT	Computer tomography	Počítačová tomografie
DLS	Dynamic light scattering	Dynamický rozptyl světla
DPCM	Double-photon confocal microscopy	Dvoufotonová konfokální mikroskopie
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy	Energiově-disperzní rentgenová spektroskopie
EM	Electron microscopy	Elektronová mikroskopie
FDG	Fluorodeoxyglucose	Fluorodeoxyglukóza
fMRI	functional Magnetic resonance imaging	funkční Magnetická rezonance
FMT	Fluorescence molecular tomography	Fluorescenční molekulární tomografie
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	/

HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HFUS	High frequency ultrasound	Vysokofrekvenční ultrazvuk
Hep G2	Hepatocellular carcinoma cell line	Buněčná linie hepatocelulárního karcinomu
HRTEM	High-resolution TEM	TEM s vysokým rozlišením
LMCT	Ligand-to-metal charge transfer	Přenos náboje z ligandu na kov
MEM	Minimal Essential Medium	
LSCM	Laser scanning confocal microscopy	Laserová skenovací konfokální mikroskopie
McI pufr	McIlvaine buffer	McIlvainův pufr
MG-63	Osteosarcoma cell line	Buněčná linie osteosarkomu
MLCT	Metal-to-ligand charge transfer	Přenos náboje z kovu na ligand
MPCM	Multi-photon confocal microscopy	Multifotonová konfokální mikroskopie
MRI	Magnetic resonance imaging	Magnetická rezonance
NIR	Near-infrared radiation	Záření v blízké infračervené oblasti
NMR	Nuclear magnetic resonance	Nukleární magnetická rezonance
PBS	Phosphate buffered saline solution	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok

PE	Primary electrons	Primární elektrony
PET	Positron emission tomography	Pozitronová emisní tomografie
RTG	X-ray	Rentgenové záření
SAED	Selected area electron diffraction	Elektronová difrakce se selekční clonou
SAXS	Small angle X-ray scattering	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření
SE	Secondary electrons	
SEM	Scanning electron microscopy	Rastrovací elektronová mikroskopie
SPECT	Single photon emission computed tomography	Jednofotonová emisní počítačová tomografie
SPIO	Superparamagnetic iron oxide nanoparticle	Superparamagnetická nanočástice oxidu železitého
TEM	Transmission electron microscopy	Transmisní elektronová mikroskopie
US	Ultrasonography	Ultrasonografie
UV	Ultraviolet radiation	Ultrafialové záření
VIS	Visible radiation	Viditelné záření
WAXD	Wide angle X-ray diffraction	Širokoúhlá difrakce rentgenových paprsků
WAXS	Wide angle X-ray scattering	Širokoúhlý rozptyl rentgenového záření
XPD	X-ray powder diffraction	Rentgenová prášková difrakce

Seznam použitých symbolů

β	faktor stupně prostorové koherence rozptýleného světla
Γ	relaxační rychlost
$\Delta\omega_{1/2}$	rozšíření spektrální čáry
λ	vlnová délka elektromagnetického záření/ elektronu
η_0	dynamická viskozita rozpouštědla
θ	difrakční/ rozptylový úhel
τ	relaxační čas
τ_c	korelační čas
1A_1	termové označení základního elektronického stavu pro tetrahedrální bodovou grupu symetrie T_d
$A(\tau)$	distribuce relaxačních časů
${}^1B({}^1T_2)$	termové označení prvního excitovaného elektronického stavu pro tetrahedrální bodovou grupu symetrie T_d
c	rychlost světla ve vakuu ($3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$)

C_{4h}^6	bodová grupa náležící $I4_1/a$
D	translační difuzní koeficient
D_{VD}	vzdálenost mezi vzorkem a plochou detektoru
5D_J	termové označení elektronického stavu atomu s celkovým elektronovým orbitálním momentem hybnosti rovno dvěma a spinovou multiplicitou rovno pěti
d_{klm}	vzdálenost mezi rovinami charakterizované Millerovými indexy (klm)
e	elementárního náboje ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C)
$E_{K,e}$	kinetická energie elektronu
$E_{rel,e}$	celková relativistická energie elektronu
$E_S(\mathbf{q}, 0)/E_S(\mathbf{q}, \tau)$	intenzita elektrického pole rozptýleného světla v čase 0/ v čase τ
7F_J	termové označení elektronického stavu atomu s celkovým elektronovým orbitálním momentem hybnosti rovno třem a spinovou multiplicitou rovno sedmi
$G^{(1)}(q, \tau)$	časová autokorelační funkce intenzity elektrického pole rozptýleného světla
$g^{(1)}(q, \tau)$	normalizovaná $G^{(1)}(q, \tau)$
$G^{(2)}(q, \tau)$	časová autokorelační funkce intenzity rozptýleného světla

$g^{(2)}(q, \tau)$	normalizovaná $G^{(2)}(q, \tau)$
h	rozptylový vektor
h_p	Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$)
$I(0)$	intenzita rozptýleného světla při nulovém úhlu
$I4_1/a$	prostorová grupa symetrie (No. 88)
$I(h)$	intenzity rozptýlených rentgenových paprsků
$I_S(q, t)$	okamžitá časová hodnota intenzity rozptýleného světla
$\langle I_S(q) \rangle$	časové střední hodnota intenzity rozptýleného světla
J	kvantové číslo celkového elektronového momentu hybnosti
k_B	Boltzmannova konstanta ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
m_e	klidová hmota elektronu
n	hlavní kvantové číslo
n_0	index lomu rozpouštědla
p_e	hybnost elektronu
$p(r)$	radiální distribuční funkce elektronů

R	vzdálenost na ploše detektoru mezi primárním a difraktovaným paprskem
R_G	gyrační poloměr
R_H	hydrodynmaický poloměr
s	řád difrakce
T_d	bodová grupa symetrie s tetrahedrál ní strukturou
U	vnější urychlující napětí
v_e	rychlost elektronu

1 Úvod

Nanočástice jsou nanostrukturní objekty, které svou velikostí ve všech třech rozměrech spadají do oblasti 1 až 100 nm. V nanotechnologii jsou vůči svým transportním a vnitřním vlastnostem definovány jako ucelené jednotky, které jsou vzhledem ke své velikosti tvořeny souborem přibližně 10 až 10^5 atomů [1]. Jejich intenzivní výzkum začal koncem 20. století uplatňující se v oblasti funkčních nanomateriálů (např. nanokompozity, nanoporézní materiály, nanovrstvy, nanosensory aj.) [2]. Díky následnému podstatnému vývoji obou hlavních přístupů výroby nanostruktur (angl. „top down” a „bottom up”) nanočástice přispěli ke vzniku a rozvoji nanofotoniky a nanoelektroniky [3] a v posledních letech také navíc ke zcela novému oboru nanorobotiky [4]. Přesto se ale v současnosti hlavní výzkum nanočástic týká biomedikálních aplikací [4] a to zejména v diagnostice a terapii nádorových onemocnění, poněvadž na základě nejnovějších statistik ve výskytu rakoviny a celosvětové úmrtnosti se během jednoho roku vyskytne zhruba 14 miliónů nových případů a 8,2 miliónů úmrtí [5].

V oboru terapeutiky nanočástice fungují jako nanonosiče schopné transportovat léčiva do primárních a metastázovaných ložisek nádorových buněk a to s pomocí pasivního a/nebo aktivního cílení. [6]

V oblasti diagnostiky onkologických onemocnění hlavní roli zaujímají metody neinvazivního zobrazování. Slouží k vizualizaci anatomické struktury a monitorování funkčních vlastností a dynamiky na buněčné a molekulární úrovni [4,7-9]. Veškeré informace jsou uloženy v kontrastu výsledných zobrazení, přičemž je možné je dodatečně zvýšit zavedením vhodného vnějšího činitele ve formě kontrastní látky [4].

Tato diplomová práce se zabývá přípravou, charakterizací a *in vitro* aplikací nanočástic, jejichž jádro je tvořeno z wolframátu vápenatého, CaWO_4 , krystalické látky známé svými přirozenými luminiscenčními vlastnostmi [10-15] vhodné pro zobrazovací techniky využívající fluorescence. Jádra jsou pokryta přírodními polysacharidy kovalentně vázané pomocí kyslíkových atomů [16]. Toto pokrytí funkcionalizuje povrch nanočástic, čímž vytváří aktivní cílení důležité pro specifické rozpoznání a navázání na povrchu nádorových buněk [17-19].

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce lze rozdělit na tři hlavní etapy:

Nalézt co nejvhodnější syntézu dopovaných a nedopovaných nanočástic wolframanu vápenatého dosahující tvorby sférických částic koloidních rozměrů.

Nalézt co nejlepší stabilizační systém (ve formě přírodních polysacharidů) pro převedení nanočástic wolframanu vápenatého do roztoku.

Úspěšně stabilizovaný systém nanočástic aplikovat jako kontrastní činidlo pro *in vitro* buněčné studie v oblasti fluorescenčního zobrazování.

3 Literární přehled

V této kapitole je podán ucelený přehled do neinvazivních zobrazovacích metod využívaných v lékařství pro diagnostické a terapeutické účely. Poté následuje teoretický úvod do problematiky nanočástic CaWO_4 pokryté přírodním polysacharidem, které jsou v této diplomové práci studovány jako kontrastní činidla pro *in vitro* fluorescenční zobrazování nádorových buněk.

3.1 Metody neinvazivního zobrazování

Využití fyzikálních vlastností jako je radioaktivní rozpad; absorpance nebo odrazivost viditelného světla, zvuku, rentgenového záření; a chování v magnetickém poli vede k realizaci různých zobrazovacích technik umožňující vizualizovat anatomické struktury, biologické funkce a molekulární procesy v živém organismu bez nutnosti porušení jeho integrity, tedy neinvazivně. Uplatňují se v diagnostických a terapeutických studiích, kde nedílnou úlohu hrají nanočástice jako zdroje kontrastu, zásobárny veškerých informací. [4, 8, 20-24]

V následující tab. 3.1 je stručný přehled těch nejběžněji využívaných metod [8, 20-25] rozdělené do skupin podle výše zmíněných využívaných fyzikálních dějů [20].

Tab. 3.1

Přehled nejdůležitějších zobrazovacích metod v lékařství (rozdělené dle literatury [20]).

optické	rentgenové	akustické	pro nukleární medicína	s magnetickou rezonancí
BMT	CT	US	SPECT	MRI
FMT			PET	fMRI
LSCM				
MP/ DPCM				

Uvedené techniky lze rozdělit do dvou hlavních skupin na anatomicky (strukturně) a funkčně zobrazovací metody. Anatomicky zobrazovací metody poskytují informaci o struktuře a uložení tkání a orgánů. Funkčně zobrazovací metody pak informují například

o metabolismu v jednotlivých orgánech. Každá z nich má své výhody i nevýhody, přičemž žádná technika nedokáže poskytnout všechny informace. Navzájem se liší například citlivostí, časovým a prostorovým rozlišením či hloubkou průniku [8, 21-24]. Tyto fakta jsou shrnuta v následující tab. 3.2.

Tab. 3.2

Souhrn rozdílů mezi zobrazovacími metodami (převzato z literatury [8, 21-24]).

metoda	prostorové rozlišení μm	hloubka průniku mm	časové rozlišení	citlivost mol dm^{-3}
BMT	3000 - 5000	1 - 2	s - min	10^{-15} - 10^{-17}
FMT	1000 - 2000	< 100	s - min	10^{-9}
LSCM	0,2 - 1	0,2 – 0,3	ms - s	$< 10^{-9}$
MP/ DPCM	0,015 - 1	0,3 – 0,4	s	$< 10^{-9}$
PET	1000 - 2000	neomezeno	s	10^{-11} - 10^{-12}
SPECT	500 - 1000	neomezeno	min	10^{-10} - 10^{-11}
US	50 - 500	10^0 - 10^1	s	10^{-1} - 10^{-4}
CT	12 - 50	neomezeno	min	10^{-1} - 10^{-4}
MRI	4 - 100	neomezeno	min – hod	10^{-3} - 10^{-5}

Do strukturně zobrazovacích technik spadají metody s vysokým prostorovým rozlišením (tab 3.2, přibližně pod 1 mm) mezi něž patří magnetická rezonance (MRI), počítačová tomografie (CT), ultrasonografie (US) a skupina metod konfokální mikroskopie (CM) v podobě laserové skenovací (LSCM) a multifotonové/dvoufotonové (MP/ DPCM). Metody s nízkým prostorovým rozlišením (tab 3.1) naopak patří do skupiny technik funkčně zobrazovacích, kam se řadí pozitronová emisní tomografie (PET) a jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT), metody vhodné třeba k zobrazování metabolismu ale oproti typicky strukturním metodám, jako je třeba MRI a CT, se studiu struktury nehodí. [4, 8, 21, 22]

Metody MRI, CT, PET, SPECT a s trochou tolerance i US se vyznačují neomezenou prostupností skrz živou tkáň jako je třeba lidské tělo [26]. To z nich dělá nejrozšířenější zobrazovací metody v oblasti zdravotnictví a *in vivo* aplikacích v medicíně [8]. Naopak mikroskopické metody LSCM a DPCM mají nevýhodu omezené penetrace, ale oproti

MRI mají ve směs prostorové rozlišení o 1 až 2 řády vyšší (tab 3.2) [27]. Proto jde o metody vhodné ke studiu strukturních vlastností např. buněčných linií v *in vitro* experimentech [8].

Ve spojitosti ještě s MRI je díky svému velkému prostorovému rozlišení a neomezenou hloubkou průniku velmi atraktivní metodou ale její hlavní nevýhoda leží v nízké citlivosti, což je pro studium dynamických procesů neadekvátní. Pozdější strategie založené na použití vysoce paramagnetických nanočástic složené buď z oxidů železitého, nebo gadolinia(III) (Gd^{3+}) použité na začátku 21. století vedly ke zlepšení odezvových vlastností [28, 29].

Souhrnný přehled využití zobrazovacích metod spolu s příslušnými kontrastními činidly [4, 8, 30, 31] je shrnut v tab. 3.3.

Tab. 3.3

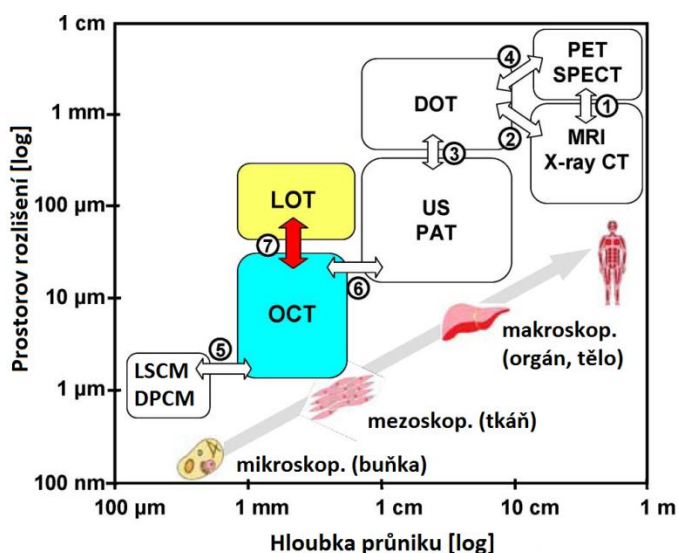
Souhrnný přehled využití zobrazovacích metod s kontrastními činidly [4, 8, 30, 31] a oblasti vlnových délek zdroje signálu [32].

metoda	zdroj signálu λ [m]	kontrastní činidlo	využití
MRI	radiové vlny $> 10^{-1}$	Gd^{3+} , Dy^{3+} , SPIO	anatomické zobrazení celého těla
CT	RTG $10^{-8} - 10^{-11}$	Kr, Xe, I, Ba	zobrazení karcinomu kostí, plic a mozku, popis koronárních tepen
PET	γ záření $< 10^{-11}$	^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu , FDG	metabolické zobrazení
SPECT	γ záření $< 10^{-11}$	^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I	
US	HFUS	mikrobubliny, nanočástice jódu	cévní zobrazení, prenatální prohlídky
CM	VIS a NIR $10^{-5} - 3,5 \cdot 10^{-7}$	fluoreskující proteiny, bariva, nanočástice citlivé na světlo, amid rhodamínu, kvantové tečky	vizualizace buněčných struktur, zánětů

Závislost zobrazovacích metod na dvou výše zmíněných faktorech, prostorovém rozlišení a hloubkou průniku, je znázorněn na obr. 3.1 (převzato z [33]), který navíc

podotýká skutečnosti multimodálního zobrazení (na obr 3.1 označeno: \Leftrightarrow), který vede k využití výhod více zobrazovacích metod a omezení nedostatků jako je třeba nízké rozlišení a citlivost. Kombinace více modalit v systému umožňuje citlivější a variabilnější detekci nádorů, zejména pokud jsou kombinovány modalities anatomické s modalitami funkčními. Typickým příkladem a je kombinace MRI s PET [34, 35]. Například zkombinováním značeného radionuklidu a fluorescenční sondou umožňuje efektivní předoperační diagnostiku pomocí detekce radionuklidu. Fluorescenční sonda pak může být posléze využita při operaci k přesné lokalizaci. Takto lze obejít i hlavní problém fluorescenčních mikroskopických technik, notoricky známá neprůchodnost světla větší vrstvou tkáně [36].

Obr. 3.1 Škálové zobrazení zobrazovacích metod s možnostmi multimodálního zobrazování (označeno: \Leftrightarrow); (převzato z literatury [30]).

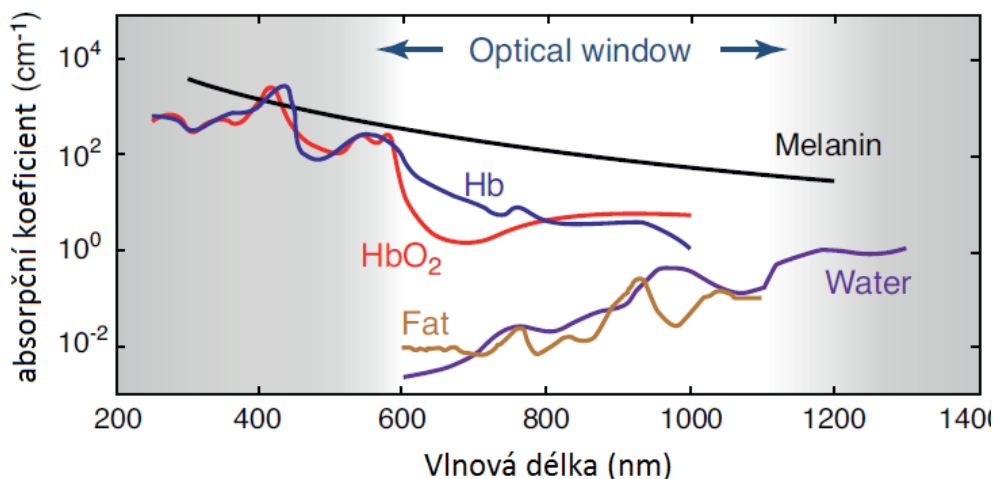


Nanočástice popsané v této diplomové práci slouží jako kontrastní látky pro fluorescenční zobrazování a tedy bude popsána pouze tato metoda.

3.1.1 Fluorescenční zobrazování

Fluorescenční techniky se využívají pro celotělové zobrazování malých zvířat a ke studiu struktur buněčných linií. Při použití *in vivo* experimentech je nutné, na rozdíl od *in vitro*, překonat problém absorpce excitujícího a popřípadě emitujícího světla v tkáni, tudíž neschopnost proniknutí a zobrazení hlouběji uložených struktur. Fluorescenční zobrazování tedy nelze použít ke studiu např. celého lidského těla. Tento problém lze částečně omezit použitím NIR, kde většina tkání má absorpci omezenou na minimum,

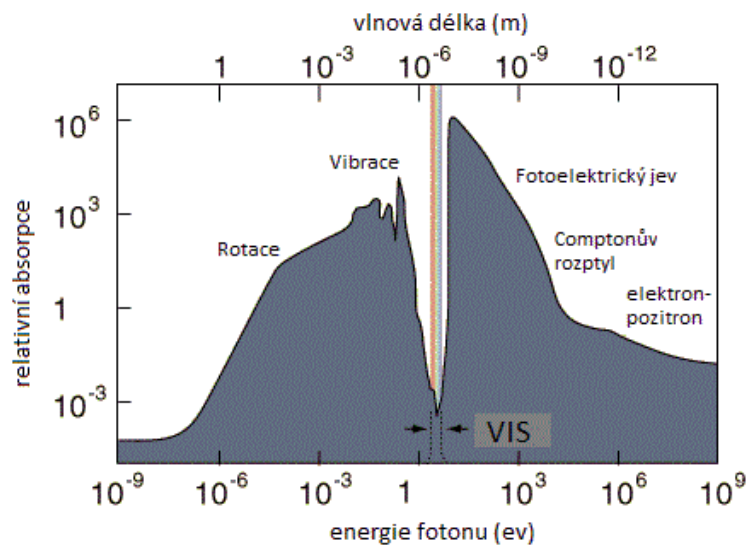
tzv. optické okno [37]. Tomu odpovídá rozmezí vlnových délek cca 700 - 1000 nm [38]. Na obr. 3.2 je zobrazeno absorpční spektrum těch nejsilněji absorbujících endogenních chromoforů v živé tkáni [37].



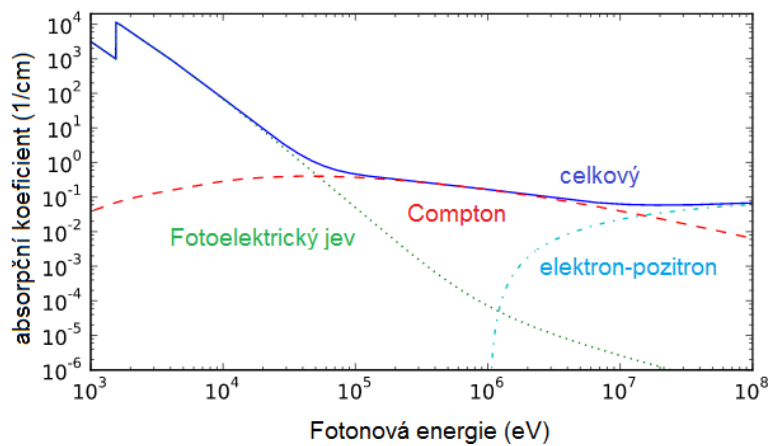
Obr. 3.2 Absorpční spektrum nejsilněji absorbujících endogenních chromoforů v živé tkáni. Těmito chromofory jsou: hemoglobin (Hb), deoxyhemoglobin (HbO₂), melanin, voda a tuková tkáň. Optické okno (oblasti NIR) je oblast vlnových délek, kde absorpce tkáně je minimální. (převzato z [37])

Takové metody jako je MRI, CT a nukleární medicína těmito nedostatky netrpí, protože jejich excitační oblast se nachází v oblastech (tab. 3.3) již pro živou tkáň neabsorbovatelnou. Tuto skutečnost potvrzuje průběh absorpčního spektra vody (obr. 3.3), sloučeniny, které se v živém organismu vyskytuje nejvíce a má při tom ze všech látek toto spektrum nejširší. Rádiové vlny, zdroje signálu v MRI, jejichž vlnová délka bývá delší než 10^{-1} m, nejsou vodou absorbovány a mají tedy neomezenou penetraci. Naopak RTG a γ záření, zdroje signálu v CT a nukleární medicíně resp., při interakci s hmotou projevují více svůj korpuskulární charakter a jejich absorpce je čistě řízena třemi procesy. V oblasti „měkkého“ rentgenu ($\lambda = 10^{-8} - 10^{-10}$ m) je (bez ohledu na prahové energii) dominantní fotoelektrický jev, na pomezí „tvrdého“ rentgenu a γ záření ($\lambda = 10^{-11} - 10^{-12}$ m) dominuje Comptonův rozptyl a při velmi silném γ záření ($\lambda < 10^{-12}$ m) již fotoelektrický a Comptonův jev pozbývají na významu a vytváří se silná pravděpodobnost vzniku elektron-pozitronových párů [40, 41]. Názorný grafický příklad závislosti absorpce RTG a γ záření na jejich fotonové energii je znázorněno na obr. 3.4. (absorpční koeficient je pro hliník, $Z=13$, převzato z [42]).

Obr. 3.3 Absorpční spektrum vody (převzato z literatury [39]).



Obr. 3.4 Závislost absorpce hliníku ($Z = 13$) na energii fotonu (převzato z [42]).



3.2 Modelová kontrastní látka – nanočástice

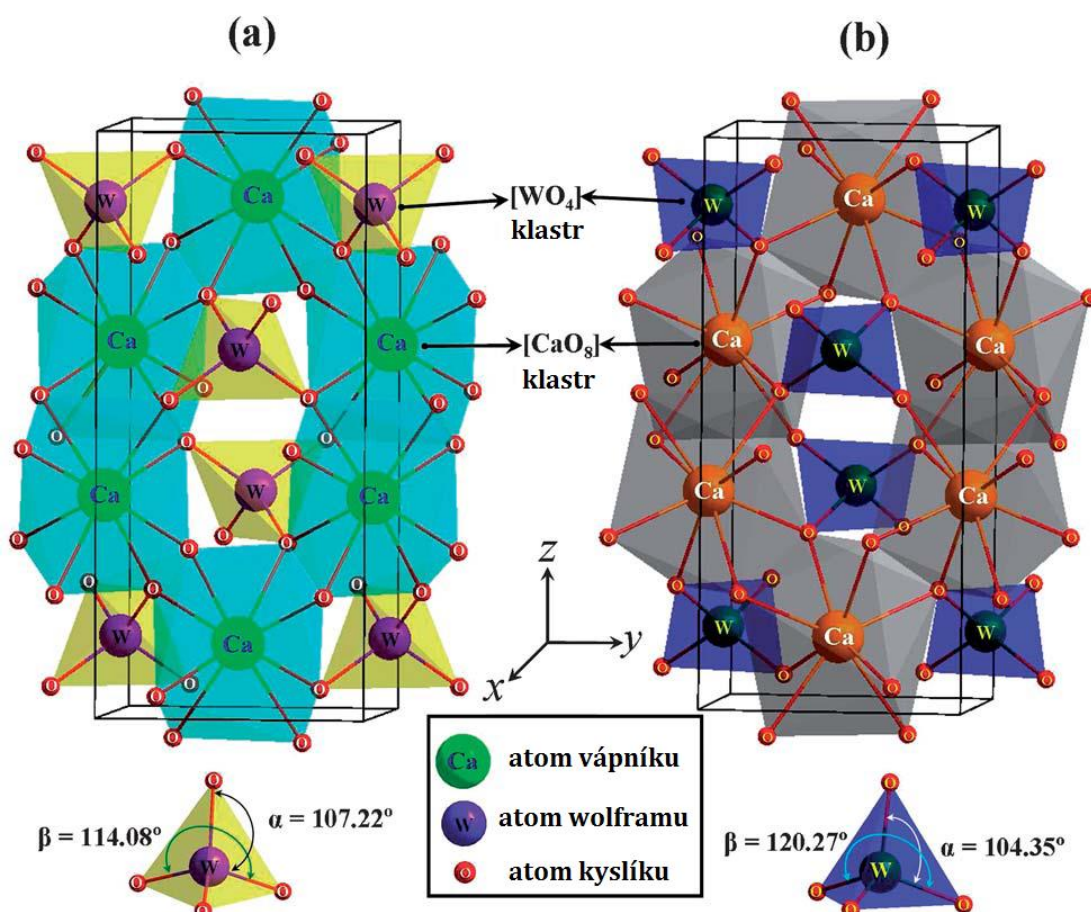
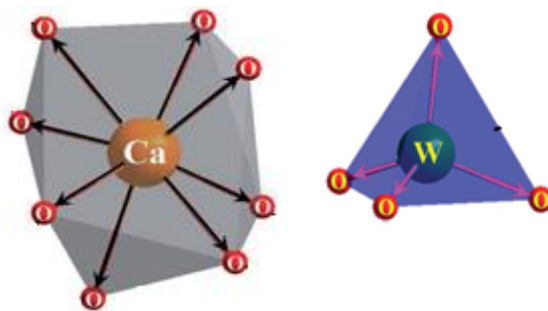
CaWO₄ pokryté přírodním polysacharidem

3.2.1 CaWO₄ – jádro nanočástice

Wolframan vápenatý, CaWO₄, je krystalickým anorganickým materiálem s vysokým potenciálem pro široké spektrum aplikací. Jeho přirozené luminiscenční [10-15, 43] a optické [44-46] vlastnosti byly již použity v nejrůznějších oborech fyziky pevných látek. Příkladem je třeba využití v oblasti rentgenových metod jako luminiscenční materiál [47, 48], scintilátory [49, 50, 51], součásti pulsních [52], pevnolátkových [53, 54] nebo mikrovlnných maserových laserů [55], optických vláken [56] a další optoelektronická využití. Další využití jsou také biomedikální a biochemické aplikace [57-59], využití v biochemické [60] a chemické katalýze [61] a fotokatalýze [62].

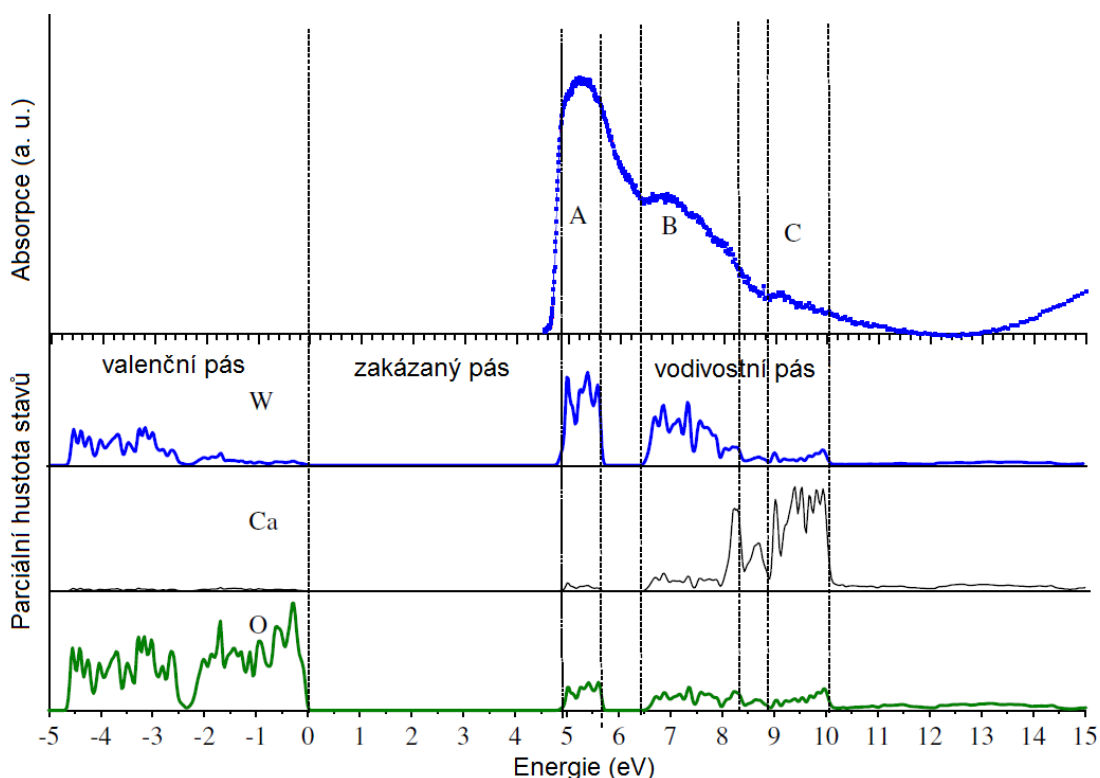
Minerál Scheelit je přírodně se vyskytující forma CaWO₄ s tetragonální strukturou WO₄²⁻ náležící bodové grupě T_d . Spolu s Ca²⁺ v příslušném krystalu tvoří bodovou grupou C_{4h}^6 [63] uspořádané do prostorové grupy symetrie $I4_1/a$ [63 -65]. Základní buňka krystalu se skládá ze dvou molekulárních jednotek s mřížkovými parametry $a = b = 5,24 \text{ \AA}$ a $c = 11,37 \text{ \AA}$ (převzato z [63], změřeno rentgenovou práškovou difrakcí (XPD) při 298 K). Molekulárními jednotkami základní buňky je tetrahedrální klastr [WO₄] a 12-stěnný deltahedrální klastr [CaO₈] jejichž struktura je znázorněna na obr. 3.5. Nahrazením Ca²⁺ za jiný typ kationtu (např. Pb²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺) se struktura klastru nezmění [66-70]. Mezi [WO₄] a [CaO₈] se v krystalu vyskytují velmi silné vazby, jejichž vibrační spektra poskytují informace o struktuře a stupních neuspořádanosti v mřížce krystalu [71, 72]. Tyto strukturální defekty mohou ovlivňovat elektronickou strukturu wolframanu a tedy jeho luminiscenční vlastnosti [72, 73]. To samé platí i v případě velikosti krystalu kdy bylo experimentálně dokázáno [74], že krystaly CaWO₄ nanostrukturálních velikostí vykazují intenzivnější luminiscenci než odpovídající mikrokrystaly, což bylo spojeno s menším zakázaným pásem pro případ nanokrystalu. Na obr. 3.6 je prezentována krystalická struktura CaWO₄ a ovlivnění její struktury výslednou velikostí krystalu připravené dle [74].

Obr. 3.5 Struktura klastru $[\text{WO}_4]$ a $[\text{CaO}_8]$. Tvar tetraedrálního $[\text{WO}_4]$ má 4 vrcholy, 4 stěny a 6 hran; tvar $[\text{CaO}_8]$ má 8 vrcholů, 12 stěn a 18 hran (převzato z [74]).



Obr. 3.6 Schéma uspořádání základní buňky ve výsledném (a) mikrokrystalu a (b) nanokrystalu CaWO_4 syntetizován postupy popsané v [74] (převzato z [74]).

Excitace wolframanu lze popsat mechanismem přenosu náboje z atomu kyslíku na centrálního atomu kovu [75, 76, 77], ve zkratce LMCT (přenos náboje z ligandu na kov), čímž se vysvětluje existence širokého absorpčního pásu v blízké UV oblasti (dle [12, 75, 77, 78] kolem 250 nm) a k jeho objasnění slouží následující obr. 3.7 [79], kde je průběh p-stavů kyslíku a d-stavů wolframu a vápníku. Valenční pás CaWO_4 se převážně skládá z 2p stavů kyslíku.

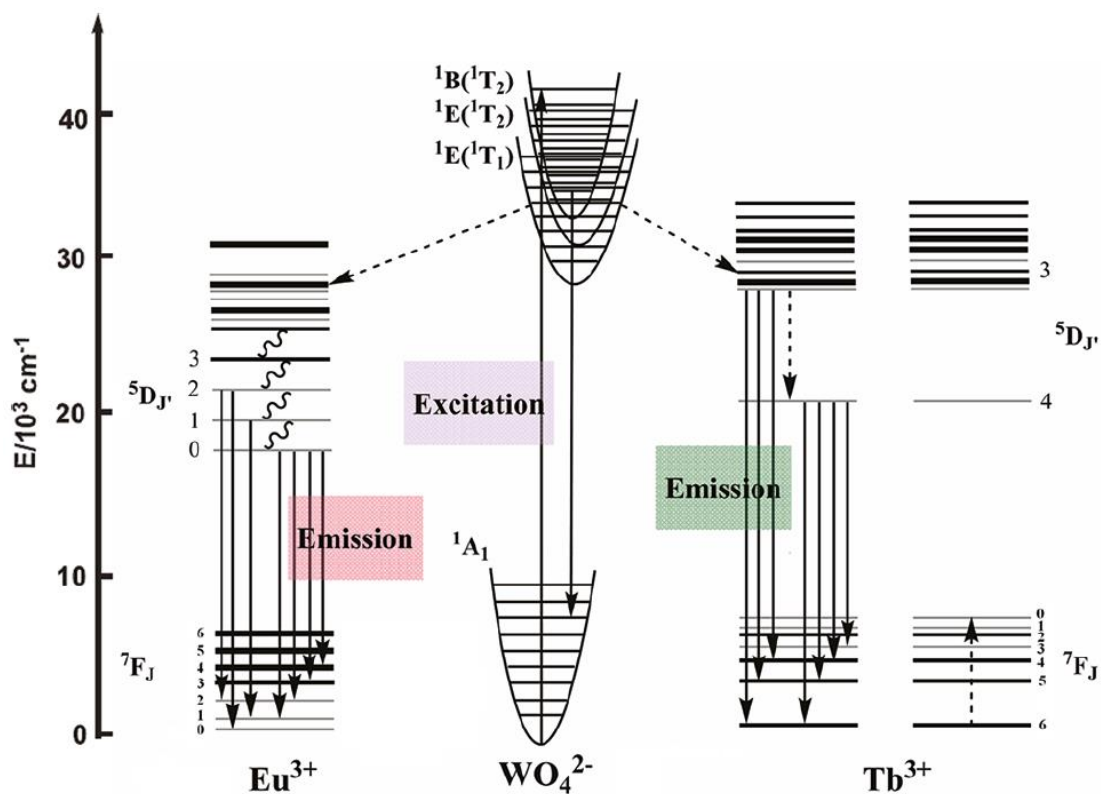


Obr. 3.7 Excitační spektrum CaWO_4 připraveno za podmínek popsané v [79] v kombinaci s parciálními hustotami stavů příslušných prvků; (převzato z [79]).

Vodivostní pás lze rozdělit na dvě části v jehož nízkoenergetické části (< 8 eV) převládají 5d stavy wolframu a ve vysokoenergetické části 3d stavy vápníku. Je vidět určitá korelace mezi hustotou stavů ve vodivostním pásu a absorpčním spektrem, která objasňuje mechanismus LMCT kdy skupiny WO_4^{2-} mohou absorbovat excitační energii prostřednictvím LMCT v rámci $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{W}^{6+}$. Pás A je spojen s přechodem z 2p stavů kyslíku na 5d stavy wolframu. V pásu B se mohou s určitou pravděpodobností odehrávat tzv. hybridní přechody, tedy spojení LMCT v rámci $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{W}^{6+}$ a vysokoenergetických LMCT spojené s přechody až na 3d stavy vápníku. V pásu C je podíl těchto posledně zmíněných dějů ještě vyšší. Emise wolframanu je spojena s velmi širokým pásem v rozmezí vlnových délek 350 až 550 nm s maximem kolem 420 nm odpovídající modrému světlu. Přechod je tedy spojen s obdobným mechanismem jako excitace ale tentokrát v opačném, tedy ve zkratce MLCT (přenos náboje z kovu na ligand). Z pohledu molekulové symetrie a teorie molekulových orbitalů lze excitační a emisní pásy CaWO_4 přiřadit přechodům z 1A_1 základního stavu do vyššího vibračního stavu elektronového excitovaného stavu ${}^1B({}^1T_2)$ a z ${}^1B({}^1T_2)$ na 1A_1 základní stav. [77, 79- 81]

Přídavkem dopujících lanthanoidů jsou ovlivněny fosfoluminiscenční vlastnosti CaWO₄ ale pouze ze strany emise. Široký absorpční pás v blízké UV oblasti odpovídající mechanismu CT [O → W] je mnohem efektivnější, než excitační f-f přechod trojmocných lanthanoidů (Ln³⁺) projevující se úzkým pásem v oblasti 350 až 400 nm, protože mají zakázanou paritu [78, 82-84]. Původní absorpční pás je tedy v přítomnosti Ln³⁺ zachován. Významné aspekty dopování pomocí Ln³⁺ se projevují až v následné emisi [85-87]. Nejenomže široký emisní pík skupiny WO₄²⁻ zaniká a emisní maximum se posouvá do vyšších vlnových délek, ale navíc jejich přídavkem lze ladit i intenzitu emise a přesto není ovlivněna krystalová struktura původního CaWO₄, což bylo v mnoha pracích dokázáno prostřednictvím experimentů XPD a prováděním koncentračních změn dopantů v krystalu, kdy docházelo pouze ke změnám intenzit emisních resp. difrakčních píků ale jejich pozice a šířka zůstávala beze změny a navíc emisní píky jsou ostré, protože mechanismy přenosu náboje zde už nefungují [83-87].

Na následujícím obr. 3.8 (převzato z [80]) je zobrazen mechanismus excitace a přenos excitační energie z WO₄²⁻ na přítomné dopující lanthanoidy, europium(III), Eu³⁺, a terbium(III), Tb³⁺, použité v této diplomové práci. Po příslušné excitaci pomocí UV záření (250 nm) se v případě přítomnosti terbia(III) s mnohem větší pravděpodobností tato excitační energie z ¹B(¹T₂) stavu WO₄²⁻ přenesou na ⁵D₃ stav Tb³⁺ nebo na vyšší stavy pomocí rezonančních procesů. Následnými nezářivými přechody systém přechází na ⁵D₄ stav Tb³⁺ a celý energetický proces je zakončen zářivými přechody s obecným zápisem: ⁵D₄ - ⁷F_J (J = 0 – 6) z nichž ty nejintenzivnější jsou v zelené oblasti spektra [81, 83]. Podobné závěry lze z obr. 3.8 usoudit i v případě, že by bylo přítomno europium(III), který vykazuje nejintenzivnější emisi v červené oblasti [81, 84]. Přehled emisních přechodů pro CaWO₄:Ln³⁺ spolu s příslušnými termovými popisy pro oba typy Ln³⁺ je shrnut v následující tabulce 3.4 (výsledné hodnoty získány z [77]). Dle [77, 81, 83, 84] je pro CaWO₄:Eu³⁺ a CaWO₄:Tb³⁺ nejintenzivnějším přechodem ⁵D₀ - ⁷F₂ (červený přechod) resp. ⁵D₄ - ⁷F₅ (zelený přechod).



Obr. 3.8 Energetické schéma skupiny WO_4^{2-} , mechanismus přenosu excitační energie na Eu^{3+} a Tb^{3+} a emisní procesy v rámci těchto lanthanoidů (převzato z [80]).

Tab. 3.4

Emisní přechody v $\text{CaWO}_4:\text{Ln}^{3+}$ (převzato z [77]).

λ [nm]	energie přechodu [eV]	Eu^{3+} přechody	Tb^{3+} Přechody
486,4	2,55		$^5D_4 - ^7F_6$
542,9	2,29		$^5D_4 - ^7F_5$
579,4	2,14	$^5D_0 - ^7F_0$	$^5D_4 - ^7F_4$
593,7	2,09	$^5D_0 - ^7F_1$	
612,0	2,03	$^5D_0 - ^7F_2$	
615,0	2,02		$^5D_4 - ^7F_3$
643,2	1,93		$^5D_4 - ^7F_2$
651,4	1,90	$^5D_0 - ^7F_3$	$^5D_4 - ^7F_1$
702,4	1,77	$^5D_0 - ^7F_4$	

3.2.2 Přírodní polysacharid – obal nanočástice

Byly popsány nejrůznější postupy spojené s přípravou nanočástic CaWO_4 , kdy stabilizačními činidly při jejich řízeném růstu obsahovali nutně hydroxylové skupiny. Příkladem je třeba ethylen glykol [12, 83, 84, 88, 89], citrónová kyselina [10, 11, 90] nebo i dokonce v H_3PO_4 [91]. Různé stupně chelatace CaWO_4 s určitými typy monosacharidů [92-96] a cukerných kyselin [97-99] byly zjištěny pomocí ^{13}C a ^{183}W NMR analýzy odpovídajících komplexů a v případě komplexů s cukernými kyselinami byly tyto výsledky porovnány s kvantově chemickými výpočty DFT [99]. Tedy existuje možnost navázání CaWO_4 i na odpovídající přírodní polysacharidy, které narozdíl od syntetických protějšků vykazují biokompatibilitu s živým organismem. Navíc takovýto druh biopolymeru může na sobě nést určité monosacharidové zbytky, která vytvářejí aktivní cílení se specifickým či nespecifickým účinkem. Toto cílení funguje na bázi ligandů využívající skutečnosti, že většina nádorů hyperexprimuje některé druhy receptorů, které jsou ve zdravé tkáni buď nepřítomné nebo ve sníženém množství [100]. Pro diagnostické účely *in vitro* je tedy specifické aktivní cílení dosti podstatné zvláště pro určité buněčné linie, kdy je žádoucí úspěšně k nim dopravit kontrastní látku (např. fluoreskující jádro z CaWO_4), které lze zobrazit např. technikami konfokální mikroskopie.

Jedním z příkladů specifického aktivního cílení, který v této diplomové práci hraje důležitou roli je interakce D-galaktózových částí polymeru s asialoglykoproteinovými receptory (ASGPR), známé též jako jaterní galaktózové/ N-acetylglukózaminové receptory [101], prvně identifikovanými živočišnými lektiny [101], proteiny se schopností na sebe vázat cukry. Konkrétně se jedná o jaterní lektin C-typu jehož přirozená lokalizace je plazmatická membrána nebo extracelulární prostor a jeho přirozená funkce závisí na přítomnosti Ca^{2+} , zprostředkovatele ligandového vázání a disulfidických můstků v doménách při rozpoznávání sacharidů [102,103]. Za normálních podmínek je ASGPR primárně exprimován na povrchu hepatocytů [104]. Jedná se o asialoglykoprotein, endogenní glykoprotein jehož předposlední galaktózové zbytky jsou pokryty koncovými skupinami sialové (N-acetylneuraminové) kyseliny. Tato kyselina je odstraněna enzymatickou aktivitou tzv. sialidázy, což činí nyní z koncových galaktózových zbytků determinanty pro rozpoznávání těchto ASGPR [104].

4 Princip použitých metod

4.1 Elektronová mikroskopie (EM)

Elektron, z pohledu Standardního modelu členem jedné ze tří generací nabitých párů leptonů, částic bez vnitřní struktury schopny interagovat pouze slabými interakcemi, se vyznačuje takovými vlastnostmi, které umožňují v elektronové mikroskopii (EM) pohlédnout do mikrosvěta. Je nositelem záporného náboje, díky němuž ho lze vnějším elektrickým napětím urychlit na určité kinetické energie čili rychlosti a aplikovaným magnetickým polem zakřivit jeho dráhu. [40, 105]

Za použití de Broglieho hypotézy o vlnově-korpuskulárním charakteru částic a vln má elektron při dané rychlosti v_e vlnovou délku λ :

$$\lambda = \frac{h_p}{p_e} = \frac{h_p}{m_e v_e} \quad (1)$$

kde h_p je Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J · s), p_e je hybnost elektronu a m_e klidová hmota elektronu ($9,109 \cdot 10^{-31}$ kg). Za použití daného vnějšího napětí U pro kinetickou energii elektronu $E_{K,e}$ a λ platí:

$$E_{K,e} = eU = \frac{1}{2} m_e (v_e)^2 \quad \lambda = \frac{h_p}{\sqrt{2m_e eU}} \quad (2,3)$$

kde e je hodnota elementárního náboje ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C). V transmisním elektronovém mikroskopu při U rovno 120 kV je $\lambda = 3,54$ pm. Jenomže elektron v takovémto mikroskopu nabývá přibližně ze 2/3 rychlosti světla c ($3 \cdot 10^8$ m · s⁻¹), tudíž se zcela jistě chová relativisticky, což se projeví v kontrakci λ . Celková relativistická energie elektronu $E_{rel,e}$ má tvar:

$$E_{rel,e} = eU + m_e c^2 = \sqrt{(p_e c)^2 + (m_e)^2 c^4} \quad (4)$$

Vztah (1) pro λ_e poté nabývá přesnějšího výrazu:

$$\lambda = \frac{h_p}{\sqrt{2m_e eU}} = \frac{h_p}{\sqrt{2m_e eU}} \cdot \left(1 + \frac{eU}{2m_e c^2}\right)^{-1/2} \quad (5)$$

Při takovémto výrazu má elektron vlnovou délku 3,35 pm, což v porovnání s elektromagnetickým zářením odpovídá oblasti na pomezí „tvrdého“ rentgenu a paprsků γ . Vlnová délka fotonu v optické mikroskopii (oblast VIS) odpovídá hodnotě v řádech 10^{-7} m a poněvadž rozlišovací schopnost mikroskopu je přímo úměrná vlnové délce primárního zdroje, takže z teoretického hlediska elektronový mikroskop disponuje zhruba 10^5 větší rozlišovací schopností v porovnání s optickým. [40, 105]

Z praktického hlediska je rozlišovací schopnost elektronové a optické mikroskopie v řádech desetin nm resp. stovek nm, tedy rozdíl je cca 10^3 -násobný, někdy až 10^4 -násobný. EM díky tomu umožňuje vizualizovat objekty na úrovni submikronových struktur, jako jsou třeba vnitřní struktury buněk, bakterií a virů. [105-108]

EM lze rozdělit na dva základní typy. rastrovací (řádkovací) elektronová mikroskopie (SEM) a transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Každá z nich používá jiný způsob zobrazení, ale základní prvky instrumentace jsou shodné pro obě metody.

4.1.1 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Metoda SEM je primárně určena k zobrazování povrchů, která vyniká relativně velkou hloubkou ostrosti, v důsledku čehož je možné i na dvojrozměrných snímkách nalézt určitý trojrozměrný aspekt.

SEM využívá k zobrazení několik nanometrů úzký zfokusovaný svazek elektronů (tzv. elektronová sonda), který dopadá přibližně kolmo na povrch vzorku. Jeho pomalou manipulací je tento povrch po řádcích, tzv. rastrech postupně skenován. Z materiálu vzorku vystupují sekundární částice různého původu, které nesou lokální informace o místě, na který primární svazek dopadá. Simultánně s rastrováním povrchu se snímá počet (případně i energie) vystupujících sekundárních částic a tím vzniká obraz, tzv. mikrofotografie. [106, 107]

Primární elektrony (PE), mající energie v řádech jednotek až desítek keV, svým pohybem v materiálu zapříčiňují vzniku různých druhů sekundárních částic. Každý druh poskytuje jiný obrazový kontrast (daný mechanismem vzniku sekundární částice) a

rozlišení. Z povrchové vrstvy několika málo nanometrů vystupují Augerovy elektrony, které mají však význam pouze pro ultravysokovakuové aparatury. Z hloubky menší než přibližně deset nanometrů vystupují tzv. pravé sekundární elektrony (SE). Tyto elektrony uvolněné z atomů vzorku mají energie jednotek až desítek elektronvoltů. Pohyb vysokoenergetických PE indukuje i vznik RTG záření, brzděného i charakteristického. V neposlední řadě i samotné elektrony mohou vystupovat zpět ze vzorku, pokud při svém pohybu prodělají pružné srážky s jádry, které jejich směr vychýlí na opačnou stranu. Tyto zpětně rozptýlené elektrony (BSE) si zachovávají vysokou energii několika keV. [107]

Pro vodivé vzorky poskytuje nejvyšší rozlišení detekce SE, rozlišení je pak omezeno hlavně příčným rozměrem sondy, který může být i pod 1 nm. U špatně vodivých vzorků může být detekce znemožněna přítomností povrchového náboje. Alternativou je poté detekce BSE, která je na povrchový náboj méně citlivá ale poskytuje horší rozlišení. Rozlišení RTG je z výše uvedených nejhorší a dosahuje zlomků mikrometrů. [105]

SE poskytují kombinaci materiálového a morfologického kontrastu. BSE poskytuje hlavně materiálová kontrast, poněvadž jsou díky svému původu citlivější na nukleonové číslo. Analýza RTG pomocí tzv. energiově-disperzní rentgenové spektroskopie (EDX) poskytuje chemický kontrast, rozlišující jednotlivé prvky. Interpretace mikrofotografií je téměř přímočará. Mód SEM/SE poskytuje dobrý morfologický obraz pouze slabě modifikovaný materiálovým kontrastem, SEM/BSE detekce naopak zvýrazňuje materiálové rozdíly. [106]

4.1.2 Transmisní elektronová mikroskopie

Metoda TEM vyniká značným prostorovým rozlišením a omezenou hloubkou penetrace ve zkoumaném materiálu, která se v literatuře uvádí kolem 100 až 200 nm [105, 108]. Vzhledem k příbuznosti paprskových diagramů jej lze považovat za analogii světelného mikroskopu v procházejícím světle. Náročnost instrumentace TEM je ale v porovnání s klasickou optikou značná. Důvodem jsou silné interakce elektronů s hmotou a k zabezpečení rozumné střední volné dráhy elektronu je nutné mít dostatečně výkonný vakuový systém.

Používané urychlovací napětí je v rozmezí 60 až 300 kV, do 200 kV především pro biologické vzorky, protože TEM vykazuje lepší kontrast a nedochází k degradaci tkáně

vlivem ozáření. Urychlovací napětí nad 200 kV umožňuje dosáhnout lepšího rozlišení, používá se tedy v materiálovém výzkumu. Rozlišení je ovlivňováno především sférickou vadou čoček. V poslední době ale byly vyvinuty korektory proti sférickým a chromatickým vadám, které umožňují dosáhnout rozlišení až 0,05 nm [109].

V TEM experimentu je vždy primárním svazkem elektronů osvětlena celá plocha vzorku. Dochází k následné interakci svazku se vzorkem zapříčiňující vzniku různých jevů. Nejčastěji dochází k průchodu primárního svazku elektronů (nedifraktovaný svazek), k difrakci elektronů na krystalových rovinách vzorku, k neelastickému rozptylu elektronů za vzniku rentgenového záření aj. Na základě toho může TEM mikroskop pracovat v různých módech a detekovat různé typy takto vzniklých částic. Celkově byly v této diplomové práci použity tři různé módy TEM mikroskopu, zobrazování ve světlém poli (TEM/BF), elektronová difrakce se selekční clonou (TEM/SAED) a analytická metoda energiově-disperzní rentgenové spektroskopie (TEM/EDX). Každá z nich detekuje jiné druhy částic, jsou vzájemně komplementární a dohromady podávají poměrně ucelené informace o vzorku. [106]

4.1.2.1 Zobrazování ve světlém poli (TEM/BF)

Zobrazování v tzv. světlém poli (BF) je založené na detekci nedifraktovaných elektronů, které jsou vyselektovány čočkou a membránou objektivu, běžně umístěné za vzorkem. Výsledkem je TEM mikrofotografie. Výsledný kontrast v obraze u vzorků do zvětšení cca 10^5 vzniká pomocí tzv. hmotnostního kontrastu, čili tlustší místa či těžší atomy pohltí více elektronů. Při zvětšení větším než $2 \cdot 10^5$ již převažuje tzv. fázový kontrast, kdy hlavní roli hraje interference prošlých elektronů na strukturách daného vzorku. To umožňuje dosáhnout atomárního rozlišení, avšak nejedná se o pravé atomární rozlišení, protože obraz vzniká interferencí a není možné v něm odhalit zřetelně atomární nedokonalosti. Fázového kontrastu se využívá v tzv. transmisní elektronové mikroskopii s vysokým rozlišení (HRTEM). Při zvětšení mezi 10^5 a $2 \cdot 10^5$ je obraz tvořen kombinací obou kontrastů. [106]

4.1.2.2 Elektronová difrakce se selekční clonou (TEM/SAED)

Metoda elektronové difrakce se selekční clonou (ED) je založena na selekci difraktovaných elektronů ve vybraném směru na určitých atomových rovinách polykrystalického materiálu. Úhlové rozdělení difraktovaných elektronů na tomto materiálu závisí na orientaci krystalové mřížky vzhledem k dopadajícímu paprsku. Směr primárního svazku elektronů o známé λ_e je orientován vůči atomovým rovinám, přičemž k difrakci dochází pouze za splnění Braggovy podmínky:

$$s\lambda = 2d_{klm} \sin \theta \quad (6)$$

kde d_{klm} je vzdálenost mezi rovinami charakterizované Millerovými indexy (klm), s je řádem difrakčního maxima a θ rozptylový úhel jehož dvojnásobek odpovídá úhlu mezi primárním a difraktovaným paprskem. K viditelné difrakci, konstruktivní interferenci, dochází na tzv. difrakčních centrech, které jsou vybírány selekční clonou, postavenou za membránou objektivu, který na rozdíl od TEM/BF zde propouští prošlé i difraktované elektrony.

Výstupem TEM/SAED analýzy je difrakční obraz závislosti intenzity difrakce na difrakčním vektoru (q_D), který je vztažen k rozptylovému úhlu vztahem:

$$q_D = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (7)$$

Pozice jednotlivých difrakčních maxim odpovídají Millerovým indexům příslušných krystalových rovin zkoumaného materiálu. [106]

4.1.2.3 Energiově-disperzní rentgenová spektroskopie (TEM/EDX)

Vhodnou instrumentací metodou TEM je možné získat informace nejenom o struktuře vzorku, ale také o jeho prvkovém složení. K přesnému určení prvkového složení materiálu se s výhodou využívá detekce RTG, vzniklé jako jeden z důsledku

interakce primárního paprsku se vzorkem. Takováto metoda je známa jako energiově-disperzní rentgenová spektroskopie (EDX). [106]

RTG záření má původ v neelastických srážkách elektronové svazku s materiálem. Po této srážce spojené s předání energie elektronovému obalu atomu v materiálu dochází k uvolnění elektronu z vnitřní slupky tohoto obalu atomu. Atom je v této fázi v excitovaném stavu a přechází do stavu základního prostřednictvím zaplnění vakance elektronem z vyšší energetické hladiny. Tento posledně zmíněný deexcitační proces vytváří RTG záření. [40]

Energie charakteristického RTG závisí na atomovém čísle atomu (Z), který se zúčastňuje deexcitace a na hlavních kvantových číslech (n) energetické hladiny přechodu. Hladiny, na kterých byla vytvořena vakance jsou označovány písmeny: K pro (n_1), L pro (n_2), M pro (n_3), atd. [40]

Výstupem TEM/EDX je diskrétní čárové spektrum s charakteristickými píky pro jednotlivé přechody mezi hladinami. Pozice píků má v sobě kvalitativní charakter, jejich intenzita zase charakter kvantitativní. [106]

4.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla (DLS) je technikou, která sleduje časový vývoj fluktuací okamžité časové hodnoty intenzity rozptýleného světla $I_S(q, t)$ kolem její časové střední hodnoty $\langle I_S(q) \rangle$. K těmto fluktuacím dochází díky Brownovu pohybu částic v roztoku, který je původcem tzv. Dopplerova efektu způsobující rozšíření spektrální čáry dopadajícího laserového paprsku [110]. Velikost tohoto rozšíření lze vyjádřit hodnotou $\Delta\omega_{1/2}$ následovně:

$$\Delta\omega_{1/2} = Dq^2 = \frac{1}{\tau_c} = \Gamma \quad q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (8,9)$$

kde D , τ_c , Γ a q je translační difuzní koeficient, korelační čas, relaxační rychlost resp. rozptylový vektor. Ve vztahu pro q je n_0 index lomu rozpouštědla, θ rozptylový úhel neboli úhel mezi směrem paprsku primárního a rozptýleného a λ vlnová délka primárního paprsku. V důsledku špatné detekovatelnosti $\Delta\omega_{1/2}$ je s použitím Fourierovy transformace umožněno převést spektrum rozptýleného světla na tzv.

časovou autokorelační funkci intenzity elektrického pole rozptýleného světla $G^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)$ je definována:

$$G^{(1)}(\mathbf{q}, \tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T E_S(\mathbf{q}, t) E_S(\mathbf{q}, t + \tau) dt \equiv \langle E_S(\mathbf{q}, 0) E_S(\mathbf{q}, \tau) \rangle \quad (10)$$

kde $E_S(\mathbf{q}, 0)$ a $E_S(\mathbf{q}, \tau)$ jsou intenzity elektrického pole rozptýleného světla v čase 0 a v čase τ . Následně normalizací funkce $G^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)$ k hodnotě $\langle I_S(\mathbf{q}) \rangle$ se získá veličina $g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)$ dána vztahem:

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau) \equiv \frac{\langle E_S(\mathbf{q}, 0) E_S(\mathbf{q}, \tau) \rangle}{\langle I_S(\mathbf{q}) \rangle} = \frac{G^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)}{\langle I_S(\mathbf{q}) \rangle} \quad (11)$$

Ve zředěných roztocích monodisperzních částic je $g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)$ klesající exponenciální funkcí τ : $g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau) = e^{-\Delta\omega_{1/2}\tau} = e^{-Dq^2\tau}$ a vystupuje v ní jak $\Delta\omega_{1/2}$ tak i D [110-112].

Funkce, která je spojená se samotným experimentem DLS je časová autokorelační funkce intenzity rozptýleného světla $G^{(2)}(\mathbf{q}, \tau)$:

$$G^{(2)}(\mathbf{q}, \tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I_S(\mathbf{q}, t) I_S(\mathbf{q}, t + \tau) dt \equiv \langle I_S(\mathbf{q}, 0) I_S(\mathbf{q}, \tau) \rangle \quad (12)$$

kde $I_S(\mathbf{q}, 0)$ a $I_S(\mathbf{q}, \tau)$ jsou okamžité intenzity rozptýleného světla v čase 0 a v čase τ .

Při nulovém relaxačním čase dochází k perfektní korelaci a rovnice (10) přechází na tvar:

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} \langle I_S(\mathbf{q}, 0) I_S(\mathbf{q}, \tau) \rangle = \langle I_S^2(\mathbf{q}) \rangle \quad (13)$$

kde $\langle I_S^2(\mathbf{q}) \rangle$ je časově kvadratická střední hodnota intenzity rozptýleného světla. Pro relaxační čas typicky mnohem větší než čas τ_c jsou fluktuace intenzity zcela nekorelovány a střední hodnoty intenzit v čase 0 a v čase τ lze odseparovat:

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle I_S(\mathbf{q}, 0) I_S(\mathbf{q}, \tau) \rangle = \langle I_S(\mathbf{q}, 0) \rangle \langle I_S(\mathbf{q}, \tau) \rangle = \langle I_S(\mathbf{q}) \rangle^2 \quad (14)$$

Tedy funkce $G^{(2)}(\mathbf{q}, \tau)$ relaxuje z časově kvadratické střední hodnoty intenzity $\langle I_S^2(\mathbf{q}) \rangle$ na kvadrát aritmetické střední hodnoty intenzity $\langle I_S(\mathbf{q}) \rangle^2$ vystupující jako základní linie autokorelační funkce. Vztažením $G^{(2)}(\mathbf{q}, \tau)$ k základní linii se získá experimentálně přímo měřitelná normalizovaná časová autokorelační funkce intenzity rozptýleného světla $g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau)$ definována rovnicí:

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau) \equiv \frac{\langle I_S(\mathbf{q}, 0) I_S(\mathbf{q}, \tau) \rangle}{\langle I_S(\mathbf{q}) \rangle^2} = \frac{G^{(2)}(\mathbf{q}, \tau)}{\langle I_S(\mathbf{q}) \rangle^2} \quad (15)$$

jejíž funkční hodnota v čase τ popisuje průměrnou míru korelace mezi fluktuacemi intenzity oddělené od sebe časovým intervalem τ . V ideálním případě monodisperzního vzorku brownovsky se pohybujících sférických částic s difuzním koeficientem D je $g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau)$ propojena s funkcí $g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)$ přes Siegertovu rovnici:

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau) = 1 + \beta [g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)]^2 = 1 + \beta e^{-2\Delta\omega_{1/2}\tau} = 1 + \beta e^{-2\Gamma\tau} = 1 + \beta e^{-2Dq^2\tau} \quad (16)$$

Veličina β je faktor stupně prostorové koherence rozptýleného světla na detektoru (teoreticky $\beta = 1$). Z experimentálního měření autokorelačních křivek lze tedy získat informace o difuzních koeficientech částic. [111]

Nakonec s pomocí Einsteinova-Stokesova zákona a získaných hodnot D lze dopočítat tzv. hydrodynamický poloměr R_H těchto částic, známý též jako Stokesův poloměr (teoreticky: $R_H \equiv \langle R_H^{-1} \rangle^{-1}$), který je definován jako poloměr hypotetické tuhé koule difundující v roztoku se stejným difuzním koeficientem jako tyto sledované částice. Einsteinův-Stokesův zákon pro tuhé koule má tvar:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D} \quad (17)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T absolutní teplota a η_0 dynamická viskozita rozpouštědla [112].

V běžných situacích je celkový pohyb souboru částic podmíněn různými módy pohybu a jeden relaxační čas je nahrazen distribucí relaxačních časů (distribuce různých módů) $A(\tau)$. $A(\tau)$ je vztažen k $g^{(1)}(t)$ pomocí Laplaceovy transformace:

$$g^{(1)}(t) = \int_0^t A(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau \quad (18)$$

Tedy inverzní Laplaceovou transformací lze dostat $A(\tau)$ přímo z měřené $g^{(2)}(t)$. Výsledkem je distribuce závislosti $\tau A(\tau)$ na τ , kterou lze pomocí vztahu (8) a (17) převést na distribuci závislosti $\tau A(\tau)$ na R_H . [110]

4.3 Širokoúhlá difrakce & širokoúhlý rozptyl rentgenového záření (WAXD & WAXS)

Metody širokoúhlé difrakce a širokoúhlého rozptylu rentgenového záření (WAXD resp. WAXS) jsou technikami běžně používané pro charakterizaci krystalových struktur využívající monochromatického rentgenového záření, jimiž lze vytvořit odpovídající difrakční obraz. Jsou uzpůsobeny k tomu, aby z příslušných fluktuací v elektronové hustotě poskytly informace o struktuře materiálu na úrovni desetin až jednotek nanometrů a to jak pro krystalické, tak amorfni struktury [107]. Experimenty WAXD a

WAXS probíhají přibližně v oblasti úhlů $2\theta > 5^\circ$ resp. rozptylových vektorů $h > 1 \text{ \AA}^{-1}$.

Metody WAXD a WAXS jsou založeny na obdobném principu lišící se pouze v instrumentaci. Obě techniky využívají vysoce monochromatického rentgenového záření, které se po dopadu na vzorek difraktuje (ohýbá) pod úhlem 2θ vůči směru nedifraktovaného paprsku. Tento úhel je určen pomocí geometrických parametrů přístroje:

$$\theta = \frac{1}{2} \tan^{-1}(R/D) \quad (19)$$

kde D je vzdálenost mezi vzorkem a plochou detektoru, který je kolmý vůči směru nedifraktovaného paprsku a R je vzdálenost na ploše detektoru mezi tímto paprskem a paprskem difraktovaným. Vzdálenost d mezi krystalografickými rovinami, díky nimž vzniká difrakce, lze vypočítat z Braggova zákona, který je definován obdobně jako v kapitole pojednávající o TEM/SAED, pouze s tím rozdílem, že zde jsou difraktovány rentgenové paprsky a ne elektrony, tedy:

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} = \frac{\lambda}{2 \sin\{[\tan^{-1}(R/D)]/2\}} \quad (20)$$

kde λ je vlnová délka primárního paprsku. Z tohoto teoretického pohledu není mezi WAXS a WAXD žádný rozdíl. [107]

Co se týče instrumentace, při metodě WAXD je rozptyl měřen na odraz, tedy velká část intenzity dopadá na detektor. Výstupem WAXD experimentu je difrakční profil závislosti intenzity difraktovaného světla na difrakčním úhlu 2θ . Při metodě WAXS je rozptyl měřen na průchod, tedy je tu potenciální pravděpodobnost, že velké množství intenzity je pohlceno vzorkem, což se projeví v nižší intenzitě rozptýleného světla oproti WAXD. Výhoda WAXS spočívá v instrumentální možnosti jej spojit s malouúhlovým rozptylem rentgenového záření (SAXS), o kterém je pojednáno v následující podkapitole 4.4. Výstupem WAXS experimentu je rozptylová křivka závislosti intenzity rozptýleného světla na rozptylovém vektoru (h).

Pozice jednotlivých píků (difrakčních maxim) je prostřednictvím Braggova zákona dána velikostí a tvarem základní buňky krystalu, které určují mezirovinnou vzdálenost d_{klm} mezi rovinami charakterizované Millerovými indexy (klm) [113], tedy obdobně jako při experimentu TEM/SAED.

V případě intenzit jednotlivých píků je potřeba uvažovat kolik světla bude každý elektron rozptylovat. K tomu je nutné zahrnout interferenční efekty v důsledku elektronů distribuované v prostoru kolem atomů a kvůli anizotropním vibracím těchto atomů v mřížce krystalu [113]. Rozšíření difrakčních píků je přisuzováno instrumentálním efektům, malé velikosti krystalu a efektům kvůli mřížkovým vadám [114].

4.4 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření

(SAXS)

SAXS analýza je jednou z nejpoužívanějších technik pro studium strukturních vlastností částic koloidních rozměrů a získání informací o jejich velikosti a tvaru. To je zapříčiněno díky nepřímé úměrnosti mezi velikostí částice a rozptylovým úhlem (velikostí rozptylového vektoru). Velikost koloidů (10 až 1000 Å) je neporovnatelně větší než vlnová délka rentgenového záření (CuK α : 1,54 Å), tedy úhlový rozsah sledovatelného rozptylu je malý. Ten nejintenzivnější rozptyl lze pozorovat při rozptylových úhlech blízkých k nule, kdy je maximálně potlačena destruktivní interference. Rentgenové záření je rozptylováno elektrony, rozptyl je tedy závislý na nehomogenitách v elektronové hustotě o velikostech srovnatelných s rozměry koloidů. [110, 112, 115]

Informace o velikosti a tvaru částic je možné získat vhodnou interpretací tzv. rozptylové křivky, závislosti intenzity rozptýlených rentgenových paprsků $I(\mathbf{h})$ na velikosti rozptylového vektoru \mathbf{h} resp. rozptylového úhlu (2θ), kterou lze vygenerovat Fourierovou transformací radiální distribuční funkce elektronů $p(r)$:

$$I(\mathbf{h}) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin hr}{hr} \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (21,22)$$

kde člen: $\sin hr / hr$ je rotačně zprůměrovanou fází rentgenových paprsků ($\exp(-i\mathbf{h}\mathbf{r})$). Instrumentálně se tato křivka získá až po azimutální integraci původního dvojdimenzionálního signálu. [115]

Běžnou univerzální aproximací na rovnici (21) platné pro všechny typy částic, tzv. Guinerovou aproximací, je možné získat prvotní informace o velikosti částic ve formě gyračního poloměru R_G z následující Guinerovy rovnice:

$$I(h) = I(0) \exp(-h^2 R_G^2 I(0)) = 4\pi \int_0^\infty p(r) dr \quad (23,24)$$

kde $I(0)$, intenzita rozptýleného světla při nulové hodnotě 2θ , závisí pouze na počtu elektronů. Vztah (23) nabývá platnosti když $hR_G \leq 1,3$, tedy v oblasti malých úhlů a zředěných roztoků. [110, 115, 116]

4.6 Fluorescenční konfokální mikroskopie

(FCM)

4.6.1 Konfokální laserová skenovací mikroskopie

(LSCM)

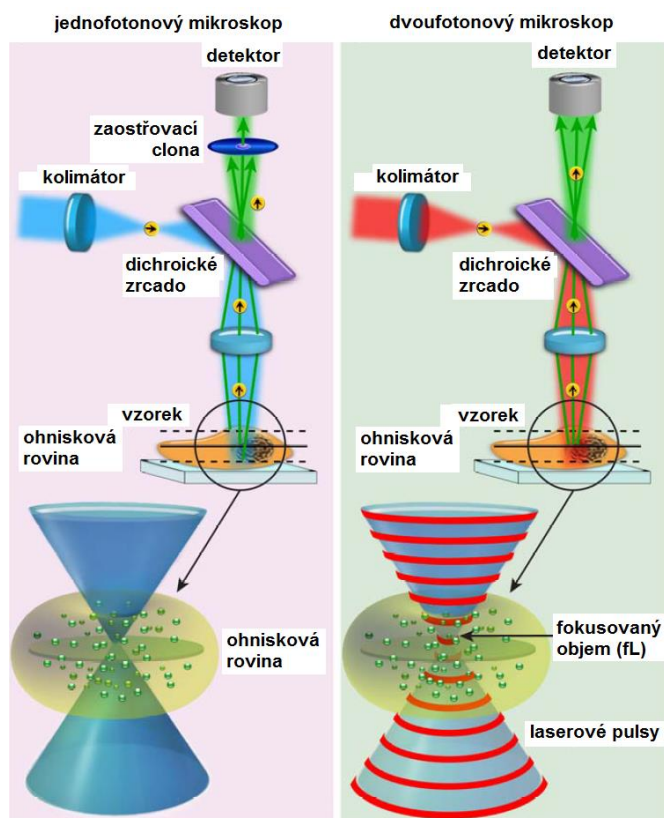
Konfokální laserová skenovací mikroskopie (LSCM) je nejběžněji používanou technikou pro dermatologický výzkum v *in vitro* studiích. Jedná se o speciální druh optické mikroskopie, která vyniká vyšší rozlišovací schopností danou omezením šumu nad a pod rovinou zobrazování, snímá totiž pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Tato skutečnost je zajištěna díky dvěma klíčovými prvky, kondenzační čočka a zaostřovací clona (angl. pinhole). Pomocí kondenzační čočky je vzorek bodově ozářen laserovým zdroje světla, zaostřovací clona, která je umístěna před detektorem, poté propouští veškeré světlo, které pochází pouze z ohniskové roviny vzorku. Postupnými změnami pozice konfokální roviny ve vzorku lze následně získat i trojrozměrné zobrazení. Poněvadž otvor zaostřovací clony může blokovat velké množství odraženého světla, vysoká intenzita laseru je nezbytná k zajištění dostatečného signálu přijímaný detektorem. [107, 117]

4.6.2 Dvoufotonová konfokální mikroskopie (DPCM)

Dvoufotonová konfokální mikroskopie (DPCM) je založena na tzv. dvoufotonové excitaci. Při ozáření světlem o dvojnásobné vlnové délce než látka absorbuje, nedojde ke vzniku excitovaného stavu a látka nefluoreskuje. Při zvýšení intenzity může v ohnisku dojít k současné absorpci dvou fotonů a tedy ke vzniku excitovaného stavu. Látka tedy fluoreskuje pouze ve velmi malém objemu. K excitaci molekuly dojde pouze v případě současné absorpce dvou fotonů. Jejich společná energie je pak dostatečná na vytvoření excitovaného stavu a následné fluorescenci. Malého excitovaného objemu se využívá ve fluorescenční mikroskopii, kdy je obraz pozorován pouze z ohniska. To může být pod povrchem a lze tak vytvářet 3D obrázky. K excitaci se výhodně využívá infračerveného pulsního laseru, jehož fotony se vyznačují výrazně delší penetrační délkou v biologických tkáních a jsou navíc z viditelného spektra nejméně rozptylovány. [118]

Na následujícím obr. 4.1 je jednoduché porovnání jedno- a dvoufotonového mikroskopu. Jednofotonový mikroskop je vybaven zaostřovací clonou, umístěnou před detektorem, sloužící k zabránění průchodu emitovaného světla mimo konfokální rovinu, které je vyhrazeno tečkovanými čarami. Ve dvoufotonovém mikroskopu, vysoká hustota excitačních fotonů z pulsního laserového zdroje způsobuje absorpci dvou fotonů a emisi fotonu s kratší vlnovou délkou (anti-Stokesův jev). Protože excitace je vyhrazena ve femtolitrovém objemu, je emise fotonů mimo ohnisko zanedbatelná a není potřeba zaostřovací clony.

Obr. 4.1 Porovnání jedno- a dvoufotonového mikroskopu (převzato z [118]).



5 Experimentální část

5.1 Použité chemikálie

K přípravě nanočástic byly použity práškové chemikálie: dusičnan vápenatý tetrahydrát, wolframan sodný dihydrát, $Tb(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ (99,9%), $Eu(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ (99,9%); vse zakoupen u firmy Sigma – Aldrich, Německo. Jako stabilizační činidla při přípravě nanočástic byly použity: ethylen glykol, kyselina citrónová bezvodá, glycerol bezvodý, vše zakoupené u firmy Lach-Ner, ČR; polyethylen glykol 350, sacharóza, zakoupeno u Sigma – Aldrich, Německo.

Při homogenizaci nanočástic do roztoku sloužili ke stabilizaci následující mono- a polysacharidy: D-(+)-glukóza, D-manitol, D-(+)-trehalóza dihydrát, sacharóza, D-(+)-manóza, D-(+)-galaktóza, dextran (Mn ~ 250 000), alginát sodný, guar, mannan, vše zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, Německo. K přípravě různých pufrů použity následující chemikálie: kyselina o-fosforečná, kyselina octová, kyselina boritá, hydroxid sodný, vše zakoupeny u firmy Lach-Ner, ČR; hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, dihydrogenfosforečnan draselný, octan sodný, fosfátem pufovaný fyziologický roztok (tablety), HEPES, vše zakoupeno u firmy Sigma-Aldrich, Německo. Struktura HEPESu je na obr. 5.1.

K *in vitro* buněčným studiím byly použity buněčné linie: hepatocelulárního karcinomu, HepG2, a osteosarkomu, MG-63, obě zakoupené u dodavatel ATCC® (USA, sídlo pro střední Evropu – Polsko). K tomu bylo potřeba kultivačního média: MEM (Minimal Essential Medium) - bez glutaminu, bez fenolové červeně; dále trypsinizačního činidla: Trypsin/EDTA s fenolovou červení, obě zakoupeny u firmy LifeTechnologies, USA; a k tomu promývací roztok: HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) – bez fenolové červeně, hydrogenuhličitanu sodného, vápníku a hořčíku, dodáný firmou Biowest, Francie.

Britton-Robinsonův (BR) pufr byl připraven smísením dvou zásobních roztoků ve vhodném poměru. Roztok č. 1 byl tvořen $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ vodným roztokem hydroxidu sodného. Roztok č. 2 byl směsný roztok kyseliny fosforečné, kyseliny borité a kyseliny octové, každé o konečné koncentraci $0,04 \text{ mol.dm}^{-3}$.

McIlvainův (McI) pufr byl připraven smísením potřebných objemů vodného roztoku

hydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ a kyseliny citrónové o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

Acetátový pufr byl připraven smísením vodného roztoku kyseliny octové o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ s roztokem octanu sodného o téže koncentraci.

Fosfátový pufr byl připraven smísením vodného roztoku hydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ s roztokem dihydrogenfosforečnanu draselného o téže koncentraci.

Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) byl připraven rozpuštěním jedné tablety ve 200 mL deionizované vody..

HEPES pufr byl připraven smísením vodného roztoku HEPES o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ s hydroxidem sodným o téže koncentraci.

5.2 Příprava vzorků CaWO_4

5.2.1 Syntetické postupy

Z dusičnanu vápenatého tetrahydrátu a wolframanu sodného dihydrátu byly připraveny jejich zásobní vodné roztoky o koncentracích $1,2 \text{ mol dm}^{-3}$. S těmito roztoky bylo dále nakládáno v následujících postupech.

Veškeré pH údaje byly měřeny na pH senzoru z kombinované skleněné elektrody připojené k přenosnému měřicímu zařízení EcoScan Hand-held Series (Eutech Instruments, USA). Míchací postupy byly provedeny na magnetické míchače RCT classic/ basic (IKA, SRN). Veškeré centrifugační kroky byly realizovány na centrifuze Eppendorf - Centrifuge 5702 (Eppendorf, Německo).

5.2.1.1 Syntéza CaWO_4 v různých stabilizátorech

Postupy přípravy částic CaWO_4 popsané v této diplomové práci byly inspirovány postupy popsané v literatuře [10-12, 83, 84, 88-90]. Celkově bylo provedeno 8 velmi podobných syntéz lišící se pouze v použitých stabilizátorech, v jednom případě malou změnou experimentálních podmínek. Přehled těchto stabilizátorů je uveden v tab. 5.1.

Za stálého míchání (400 ot. min^{-1}) bylo vždy ke 100 mL stabilizátoru přidáno 10 mL zásobního roztoku dusičnanu vápenatého. Po 10 minutovém sečkání bylo přidáno 10 mL zásobního roztoku wolframanu sodného. Celkový objem směsi byl tedy 120 mL a počáteční koncentrace Ca^{2+} a WO_4^{2-} $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Tato směs se ještě následujících 10 minut nechala důkladně promíchat. Bylo změřeno pH této směsi. Pokud pH nebylo v požadovaném intervalu (viz tab. 5.1), bylo následně upraveno roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 5 mol dm^{-3} . Směs byla povařena pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin za stálého míchání (190 ot. min^{-1}) při teplotě 125°C . Směs byla zředěna demineralizovanou vodou v poměru 2:3 (v/v) a odcentrifugována při $4400 \text{ ot. min}^{-1}$ po dobu 10 minut. Sediment byl ze zbylých stop stabilizačního činidla centrifugačně promyt 5krát demi. vodou, vždy při $4400 \text{ ot. min}^{-1}$ a době 10 min. Promytý sediment byl vysušen na hodinovém skle při pokojové teplotě přes noc.

V tab. 5.1 je přehled použitých stabilizátorů a jejich stav před a po smísení se zásobními roztoky dusičnanu vápenatého a wolframanu sodného. Dále jsou uvedeny hodnoty pH po smísení a požadované intervaly, které byly inspirovány literaturou [10-12, 83, 84, 88-90].

S kyselinou citrónovou byly provedeny 2 syntézy, v jedné byla směs povařena pod zpětným chladičem, ve druhé toto uskutečněno nebylo, pouze po stejnou dobu (3 hod.) byla směs míchána (400 ot. min^{-1}) za pokojové teploty. Proto 8 různých příprav a 7 různých stabilizátorů.

Tab. 5.1

Přehled použitých stabilizátorů k přípravě částic CaWO_4 . Je uveden jejich stav před a po smísení se zásobními roztoky dusičnanu vápenatého a wolframanu sodného. Dále jsou uvedeny naměřené hodnoty pH a požadované intervaly.

stabilizátor	před smísením s Ca^{2+} a WO_4^{2-}	po smísení s Ca^{2+} a WO_4^{2-}	pH po smísení s Ca^{2+} a WO_4^{2-}	
			interval	hodnota
ethylen glykol	čistý	5:1 (v/v)	9 – 9,5	9,4
glycerol	čistý	5:1 (v/v)	9 – 9,5	9,4
sacharóza (stolní cukr)	24 mg ml ⁻¹	20 mg ml ⁻¹	9 – 9,5	6,6
demi. voda	/	/	9 – 9,5	6,6
kyselina citrónová	0,24 mol dm ⁻³	0,2 mol dm ⁻³	8 – 8,5	3,1
ethylen glykol	2:3 (v/v)	1:2 (v/v)	9 – 9,5	8,0
polyethylen glykol 350	čistý	5:1 (v/v)	9 – 9,5	8,9

5.2.1.2 Syntéza CaWO_4 ve směsi ethylen glykol – voda v poměru 5:1 (v/v)

Byly připraveny dvě série nanočástic, každá se lišící pouze v počátečních koncentracích iontů Ca^{2+} a WO_4^{2-} (viz tab. 5.2).

Za stálého míchání (400 ot. min⁻¹) bylo ke 100 mL ethylen glykolu přidáno dané množství zásobního roztoku dusičnanu vápenatého (viz tab. 5.2). Po 10 minutovém sečkání bylo přidáno dané množství zásobního roztoku wolframanu sodného (viz tab. 5.2). Směs byla doplněna demi. vodou do celkových 120 mL (viz tab. 5.2). Tato směs byla při pokojové teplotě a za stálého míchání (400 ot. min⁻¹) ponechána po dobu 18 hodin. Výsledná suspenze byla zředěna vodou v poměru 2:3 (v/v) a odcentrifugována při 4400 ot. min⁻¹ a době 10 min. Sediment byl ze zbylých stop ethylen glykolu centrifugačně promyt 3krát demi. vodou a poté 3krát acetonem, vždy při 4400 ot. min⁻¹ a době 5 min. Takto promytý sediment byl následně vysušen v sušárně při teplotě 80°C

po dobu 3 h.

Tab. 5.2

Použité množství zásobních roztoků dusičnanu vápenatého a wolframanu sodného při 2 různých sériích, dále použitý objem demi. vody k doplnění reakční směsi do cílených 120 mL.

koncentrace Ca^{2+} a WO_4^{2-}	objem zásobní roztoku Ca^{2+} [mL]	objem zásobní roztoku WO_4^{2-} [mL]	objem demi. vody [mL]
0,10 mol dm^{-3}	10	10	0
0,05 mol dm^{-3}	5	5	10

5.2.1.3 Syntéza $\text{Ln}^{3+}:\text{CaWO}_4$ ve směsi ethylen glykol - voda v poměru 5:1 (v/v)

Byly připraveny celkem čtyři série nanočástic, každá se lišící v použitém dopantu (Ln^{3+}) a v požadované hmotnostní koncentraci na úkor iontů Ca^{2+} (viz tab. 5.3). Počáteční koncentrace WO_4^{2-} ve všech sériích byla 0,05 mol dm^{-3} .

V daném množství zásobního roztoku dusičnanu vápenatého (viz tab. 5.3) bylo rozpuštěno odpovídající množství pentahydrátu dusičnanu lanthanoidu(III) (viz tab. 5.3). Za stálého míchání (400 ot. min^{-1}) byla tato směs přidána ke 100 mL ethylen glykolu. Po 10 minutovém sečkání bylo přidáno 5 mL zásobního roztoku wolframanu vápenatého. Směs byla doplněna demi. vodou do celkových 120 mL (viz tab. 5.3). Následný postup už byl zcela analogický jako v případě nedopovaných nanočástic (viz kap. 5.2.2).

Tab. 5.3

Použité množství dopantů Ln³⁺ a zásobních roztoků dusičnanu vápenatého při 4 různých sériích, dále použitý objem demi. vody k doplnění reakční směsi do cílených 120 mL.

množství Ln ³⁺	navážka	navážka	objem zásobní roztoku Ca ²⁺	objem demi. vody
	Tb(NO ₃) ₃ pentahydrátu	Eu(NO ₃) ₃ pentahydrátu		
	[mg]	[mg]		
5 hm% Tb ³⁺	32,91	/	4,75	10,25
5 hm% Eu ³⁺	/	33,87	4,75	10,25
10 hm% Tb ³⁺	65,82	/	4,50	10,50
10 hm% Eu ³⁺	/	67,74	4,50	10,50

5.2.1 Homogenizační postupy

Veškeré homogenizační kroky byly provedeny za použití digitálního ultrasonického homogenizéru Sonopuls (Bandelin Electronic, Německo) pracující v kontinuálním módu s 10%ní amplitudou.

Nanostrukturovaný prášek CaWO₄/Ln³⁺:CaWO₄ byl vždy rozdispergován do vodném roztoku příslušného stabilizátoru.

5.3 *in vitro* buněčné studie

Veškeré následující kroky v této kapitole byly provedeny Mgr. Markétou Jiráťovou (IKEM, ČR). Tyto postupy se týkají přípravy dvou buněčných linií: hepatocelulárního karcinomu, HepG2, a osteosarkomu, MG-63 pro *in vitro* studie.

Tři dny před pokusem bylo buňkám odsáto kultivační médium, následně byly promyty pomocí HBSS a ztrypsinizovány systémem Trypsin/EDTA. Po oddělení buněk ode dna kultivační lahve bylo přidáno médium na původní objem, dále buňky zcentrifugovány (5 minut, 1500 ot. min⁻¹), médium odsáto a přidáno 5 ml čerstvého média. Následně byly buňky spočítány na elektroporátoru. Dle výsledků byly buňky naředěny tak, aby v 1 ml média bylo 15 000 buněk. Systém byl posléze napipetován do Ø 35 mm Petriho misky s 20 mm skleněným #1.5 krycím sklíčkem na dně (2 ml buněčné suspenze na 1 Petriho miskiu).

Po třech dnech inkubace za standardních podmínek (37°C, 5% CO₂) bylo staré kultivační médium odsáto a k buňkám bylo přidáno 1,5 ml čerstvého média a 0,5 ml předem zhomogenizovaných nanočástic Tb³⁺:CaWO₄ (5 hm% Tb³⁺) ve vhodném stabilizátoru (0,25 mg ml⁻¹ Tb³⁺:CaWO₄, 1 mg ml⁻¹ stabilizátoru). Po čtyřech hodinách inkubace za standardních podmínek (37°C, 5% CO₂) bylo médium s CaWO₄ odsáto a buňky byly jedenkrát promyty pomocí HBSS. HBSS bylo následně odsáto a nahrazeno 2 ml čerstvého kultivačního média.

5.4 Instrumentace

5.4.1 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

SEM analýza byla provedena pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu Quanta 200 FEG (FEI, ČR) vybavený vysokoenergetickou zdrojem elektronů FEG (Field Emission Gun) v podobě autoemisní trysky (hot FEG). K získání nejlepšího rozlišení mikroskopu bylo nastaveno maximální urychlovací napětí 30 kV dosahující rozlišení 2 nm. Mikroskop pracoval v režimu vysokého vakua (HVSEM, 10^{-3} Pa) kdy elektronový signál byl detekován SE detektorem v podobě Everhartova-Thornleyova detektoru (ETD).

Výsledné SEM/SE mikrofotografie byly zpracovány a upraveny doc. Šloufem.

5.4.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

TEM analýza byla provedena pomocí transmisního elektronového mikroskopu Tecnai G2 Spirit Twin 12 (FEI, ČR) vybavený vysokoenergetickou zdrojem elektronů FEG (Field Emission Gun) v podobě LaB₆ katody. Mikroskop pracoval při maximálním urychlovacím napětí 120 kV dávající rozlišení 0,3 nm.

Pro přímě zobrazení částic byl použit základní režim mikroskopu – technika světlého pole, TEM/BF, za použití BF detektoru.

Pro celkovou TEM analýzu byly uskutečněny ještě následující dva režimy:

Pro vybrané práškové vzorky byla provedena mikroprvková analýza analytickou technikou energiově-disperzní rentgenovou spektroskopií, TEM/EDX, kde rentgenové paprsky byly zachycovány pomocí EDX detektoru s rozlišením 20 nm. Výstupem bylo TEM/EDX spektrum s charakteristickými píky příslušných přechodů

K tomu byla navíc provedena elektronová difrakce se selekční clonou, TEM/SAED, kde intenzita difrakce byla měřena v rozsahu difrakčních vektorů 0 až 8 \AA^{-1} . Výstupem byl dvojrozměrný TEM/SAED difraktogram, který byl následně převeden na jednorozměrný pomocí programu ProcessDiffraction

Výsledné TEM/EDX spektrum, TEM/SAED difraktogram a TEM/BF mikrofotografie byly zpracovány, upraveny a vyhodnoceny doc. Šloufem.

5.4.3 Dynamický rozptyl světla (DLS)

DLS experiment byl proveden na fotometru ALV (Langen, Německo) vybavený helium-neonovým laserem o výkonu 22 mW a vlnové délce 632,8 nm sloužící jako zdroj monochromatického záření, atenuátorem k regulaci intenzity primárního paprsku, fotodiodou jako referenčním detektorem ke snímání primárního paprsku prošlý atenuátorem, cylindrickým termostatovaným kyvetovým prostorem kolem něhož se díky otáčivému goniometru (ALV, CGS/8F) může pohybovat detektor rozptýleného světla, kterým byla velmi citlivá lavinová fotodioda (ALV High QE APD; APD – avalanche photodiode). Přístroj byl vybaven specializovaným korelátorem ALV 5000/EPP provádějící výpočet časové autokorelační funkce intenzity tj. výstup při měření DLS. A sestava byla řízena počítačem s ovládacím programem ALV-5000 dodaným dodavatelem.

Fitovacím programem GenR (napsaný v programovacím jazyce Visual Basic) bylo z naměřené závislosti autokorelační funkce $g^{(2)}(\tau) - 1$ na τ za použití inverzní Laplaceovy transformace a Einsteinova-Stokesova zákona (rovnice (17), kap. 4.2) vygenerována distribuční závislost $\tau A(\tau)$ na R_H .

5.4.4 Širokouhlá difrakce rentgenového záření (WAXD)

WAXD experiment byl proveden na práškovém difraktometru HZG4 (Seifert GmbH, Německo) vybavený rentgenovým zdrojem Seifert CRT s měděnou antikatodou vytvářející CuK_α záření (40 kV, 45 mA, $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) a s následnou monochmatizací pomocí Ni folie. Difraktovaný paprsek byl snímán jednorozměrným XRR/XRD detektorem s citlivou plochou $60 \times 6 \text{ mm}^2$. Difrakční spektrum bylo získáno v Bragg-Brentano geometrii v odrazném módu při difrakčním úhlu 2θ v rozsahu $1,4$ až 50° s krokem $0,1^\circ$ vždy trvající 15 s.

5.4.5 Širokoúhlý & Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (WAXD & SAXS)

WAXS a SAXS experiment byl proveden za použití kamery s bodovou kolimací Molecular Metrology System (Rigaku, Japonsko) připojené k mikrofokusáčnímu generátoru (Osmic MicroMax 002) pracující při 45 kV a 0,66 mA (30 W), který díky měděné antikatodě generuje CuK_α záření o vlnové délce 1,54 Å. V blízké pozici (WAXS) byla kamera vybavena snímatelným detektorem Imaging Plate (Fujifilm), deskou o ploše 23x25 cm. V daleké pozici (SAXS) byla kamera vybavena plynem naplněným multidrátovým 2D detektorem s citlivou plochou o průměru 20 cm (Gabriel design). Tento detektor byl v pozdějších SAXS experimentech nahrazen dříve jmenovaným snímatelným detektorem Imaging Plate (IP).

Intenzita rozptýleného světla byla při WAXS experimentu měřena v rozsahu rozptylových vektorů: 0,25 – 3,5 Å⁻¹. Kalibrace středu a vzdálenosti mezi vzorkem a detektorem byla provedena za použití práškového křemíku.

SAXS experiment probíhal v rozsahu rozptylových vektorů: 0,004 – 1,1 Å⁻¹. Intenzity rozptylu byly vyjádřeny na absolutní škále s využitím Skelného Uhlíku jako standardu.

5.4.5 Dvoufotonová konfokální mikroskopie (DPCM)

In vitro fluorescenční zobrazování buněčných linií byla provedena na konfokálním mikroskopu Leica SP8 (Leica Microsystems, Německo) disponující infračerveným pulsním laserem pro potřeby dvoufotonovou excitace (mikroskop je navíc vybaven i superkontinuálním zdrojem excitace v podobě bílého laseru), citlivým hybridním detektorem (HyD) a rychlým resonančním skenerem. Systém buněčných linií byl excitován mechanismem dvoufotonové absorpce pomocí pulsního infračerveného laseru s vlnovou délkou 700 nm (ve výsledku 350 nm). Emise byla snímána při 545 nm za použití objektivu 63x s olejovou imerzí. Výsledné fotografie byly zpracovány ve volně šířitelném programu ImageJ [119].

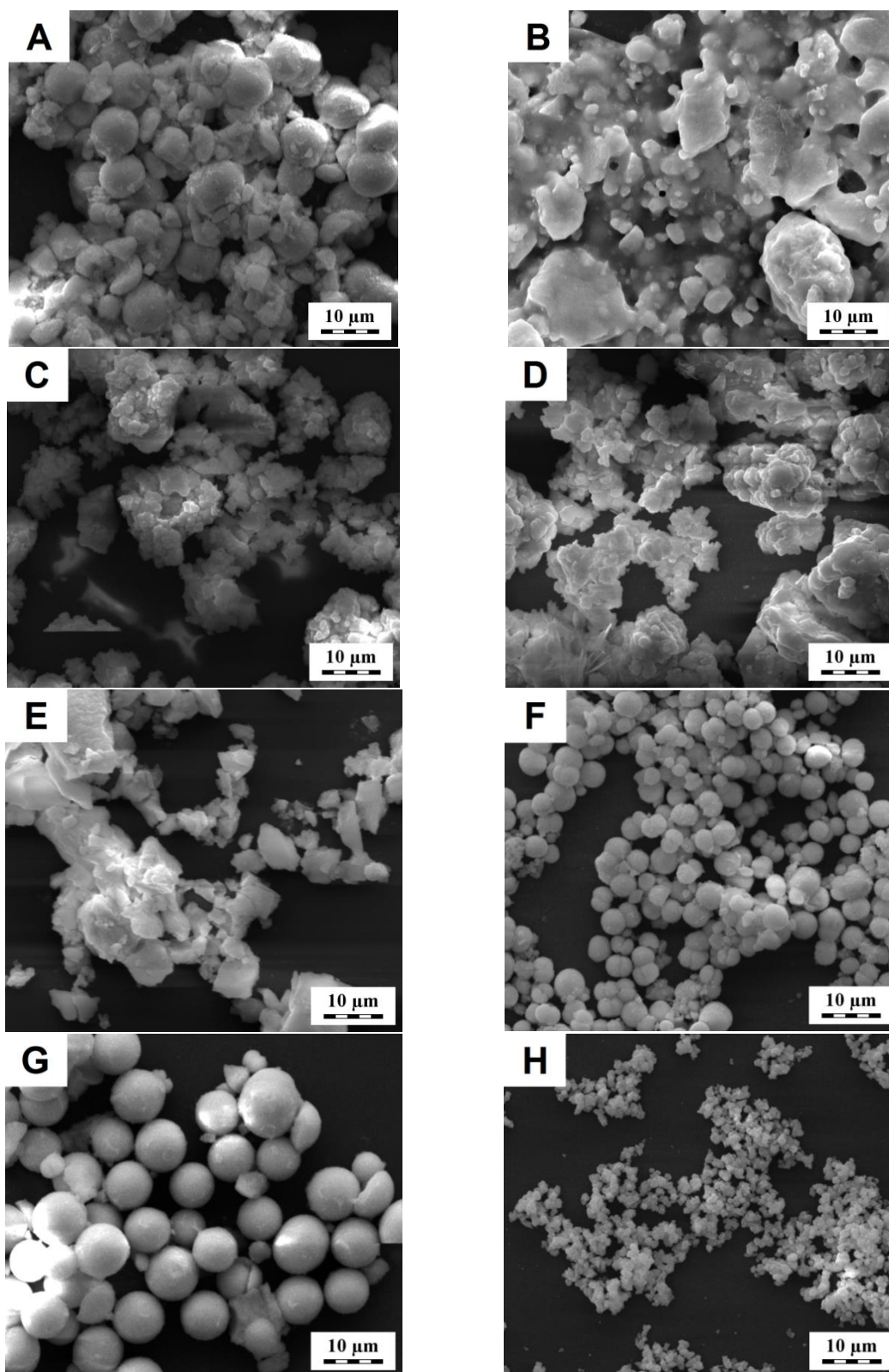
6 Charakterizace nanočástic

6.1 Charakterizace jádra nanočástic – CaWO₄

V tomto oddíle je pojednáno o nalezení a optimalizaci nejlepšího postupu přípravy částic CaWO₄. Požadavkem jsou nanostrukturní rozměry, kulovitý tvar, případně odděleně situovány v prostoru.

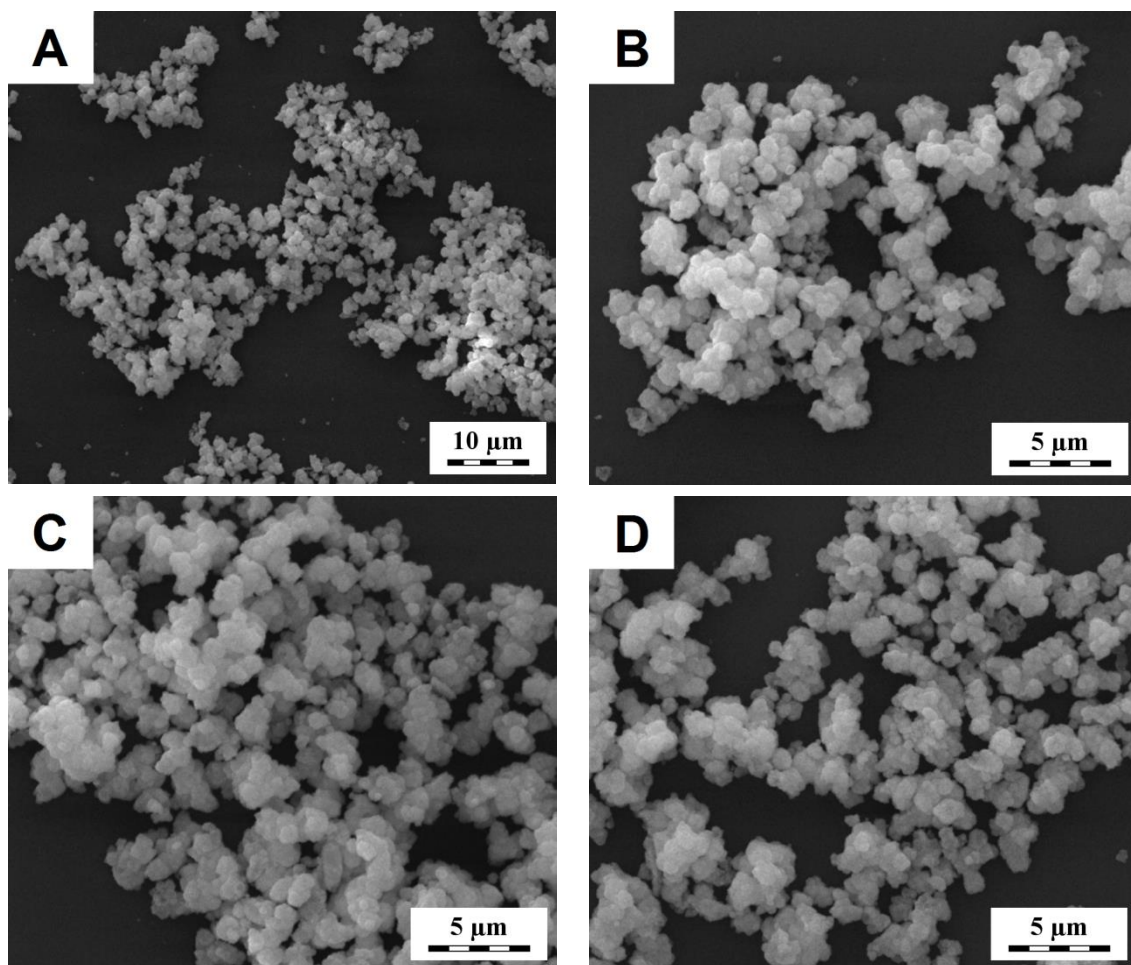
6.1.1 Nejvhodnější syntéza

SEM/SE analýzou bylo určeno, který stabilizátor (tab. 5.1, kap. 5.2.1.1) je nejvhodnější pro přípravu částic CaWO₄ požadovaných vlastností zmíněné výše. Následující obr. 6.1 představuje SEM/SE mikrofotografie, které zcela jednoznačně naznačují, že vhodným kandidátem je směs ethylen glykolu a demi. vody v poměru 5:1 (v/v) (obr. 6.1(A)). Prvních pět stabilizačních činidel: samotná demi. voda (obr. 6.1(A)); směs glycerolu s demi. vodou v poměru 5:1 (v/v) (obr. 6.1(B)); 0,2M kyselině citrónové bez resp. za varu pod zpětným chladičem (obr. 6.1(C) resp. (D)); směs polyethylen glykolu 350 s demi. vodou v poměru 5:1 (v/v) (obr. 6.1(E)) si nezaslouží žádný podrobnější komentář, jsou jednoznačně nevhodnými systémy pro další studie. V systému 20 % (m/v) roztoku sacharózy (obr. 6.1(F)) se již vyskytují částice určitého kulovitého tvaru ale stále nejde o nanostrukturované systémy. Ve směsi ethylen glykolu s demi. vodou v poměru 1:2 (v/v) (obr. 6.1(G)) jde o podobnou situaci, částice jsou akorát o nějaký ten řád větší. Zvýšení podílu ethylen glykolu na výsledný poměr 5:1 (v/v) (obr. 6.1(H)) ale podalo v těchto počátečních fázích poměrně uspokojivé výsledky. Částice sice stále nabývají mikronových rozměrů, ale takováto syntéza je hodna další možné optimalizace a studií. Poněkud lepší pohled na tento posledně zmíněný systém je na obr. 6.2, kde jsou výsledné SEM/SE mikrofotografie s větším přiblížením.



Obr. 6.1 SEM/SE mikrofotografie syntetizovaného CaWO_4 připraveného (A) v samotné demi. vodě; (B) ve směsi glycerolu s demi. vodou v poměru 5:1 (v/v); (C) v 0,2M kyselině citrónové bez varu pod zpětným chladičem; (D) v 0,2M kyselině citrónové; (E) ve směsi polyethylen glykolu 350 s demi. vodou

v poměru 5:1 (v/v); (F) v 20% (m/v) roztoku sacharózy; (G) ve směsi ethylen glykolu s demi. vodou v poměru 1:2 (v/v); (H) ve směsi ethylen glykolu s demi. vodou v poměru 5:1 (v/v).



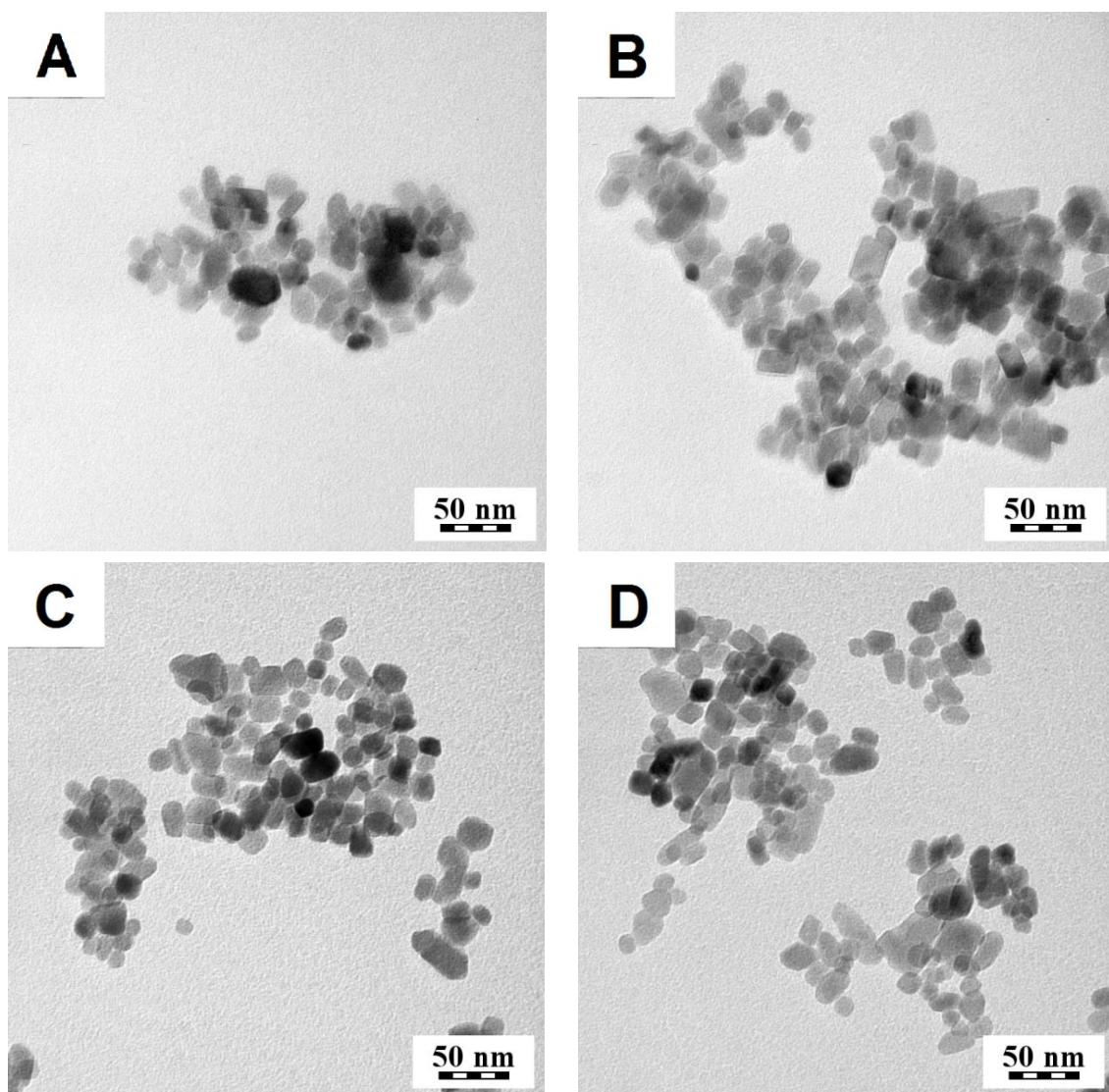
Obr. 6.2 SEM/SE mikrofotografie syntetizovaného CaWO_4 připraveného ve směsi ethylen glykolu s demi. vodou v poměru 5:1 (v/v).

6.1.2 Optimalizace nejvhodnější syntézy

Jediná změnou v syntetickém postupu přípravy CaWO_4 v systému ethylen glykolu s demi. vodou v poměru 5:1 (v/v) bylo, že již příprava neprobíhala za varu pod zpětným chladičem, ale směs se ponechala 18 hodin při okolní teplotě za stálého míchání (400 ot. min^{-1}). Navíc nebyla provedena příprava při klasické počáteční koncentraci Ca^{2+} a WO_4^{2-} $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, ale vyzkoušela se i koncentrace poloviční a výsledky byly samozřejmě porovnány.

Výsledky byly velmi slibné, protože touto cestou se již povedlo obdržet částice nanostrukturních rozměrů, tedy nanočástice. K jejich zobrazení již už ale bylo potřeba

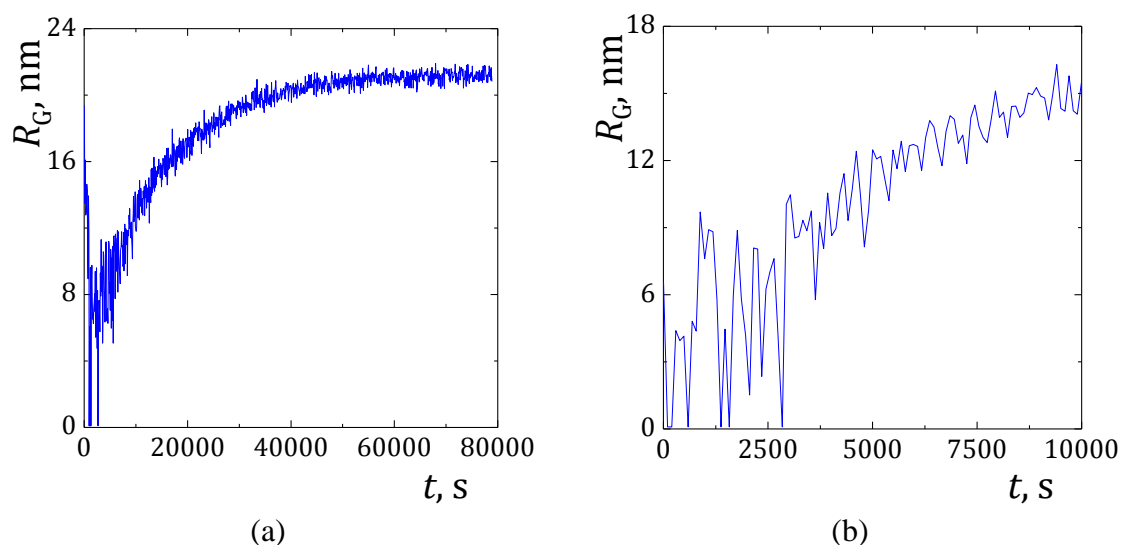
poněkud pokročilejší techniky, TEM/BF. Na obr. 6.3 jsou porovnány nanočástice CaWO_4 připravené při dvou různých počátečních koncentracích Ca^{2+} a WO_4^{2-} .



Obr. 6.3 TEM/BF mikrofotografie syntetizovaného CaWO_4 připraveného ve směsi ethylen glykolu s demi. vodou v poměru 5:1 (v/v) při počátečních koncentracích Ca^{2+} a WO_4^{2-} rovno (A,B) $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ či (C,D) $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

Při prvním pohledu na mikrofotografie TEM/BF na obr. 6.3 je zjevné, že syntéza byla úspěšná. Povedlo se připravit částice CaWO_4 nanostrukturních rozměrů. Dále při jejich porovnání je vidět, že mezi nanočásticemi připravené při počátečních koncentracích Ca^{2+} a WO_4^{2-} rovno $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ (obr. 6.3 (A,B)) a $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ (obr. 6.3 (A,D)) není velikostně téměř žádný rozdíl, akorát při vyšší koncentraci se částice jeví o nepatrný zlomek větší. Ve směs mají částice v průměru 25 až 40 nm.

Tyto dvě syntézy byly navíc studovány i z pohledu kinetiky růstu samotných částic v příslušném stabilizátoru metodou SAXS (za použití multidrátového 2D detektoru), znázorněné na následujícím obr. 6.4.



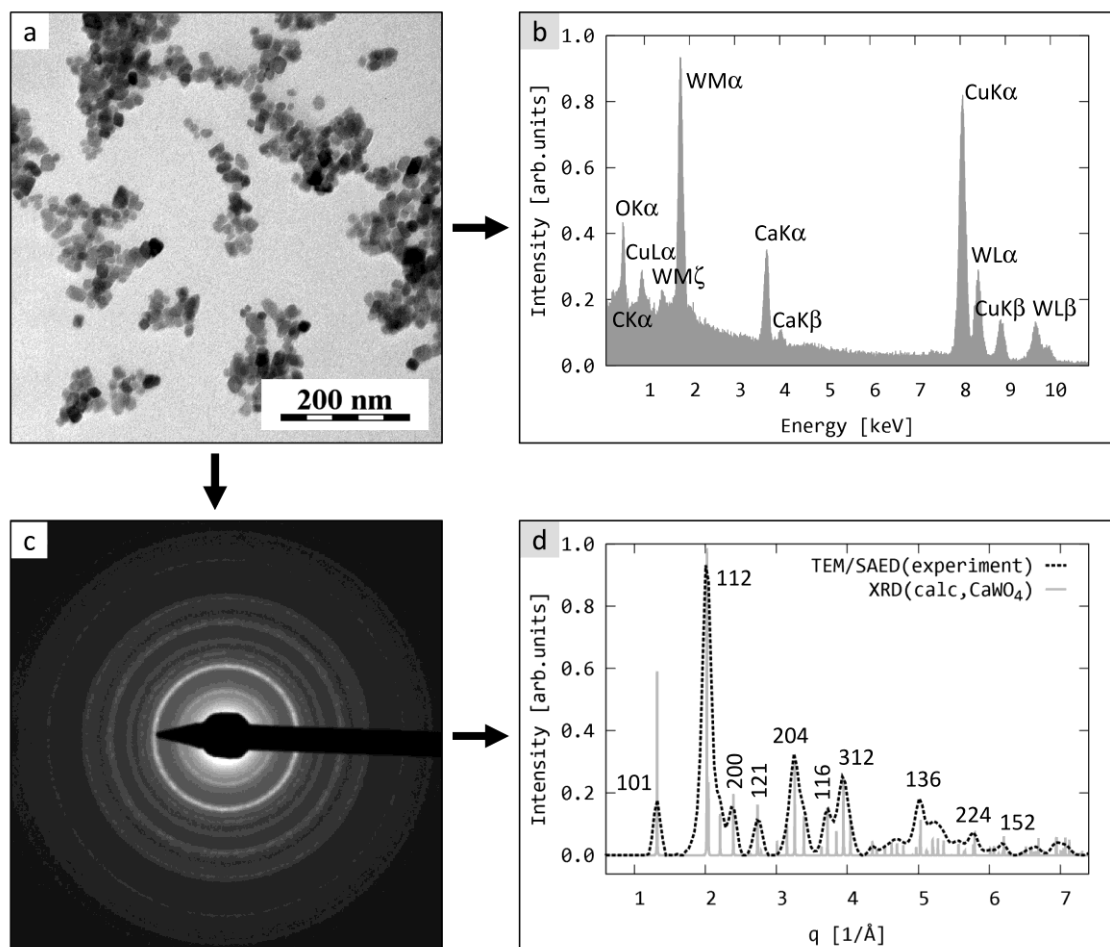
Obr. 6.4 SAXS experiment měření kinetického průběhu růstu nanočástic CaWO_4 v systému ethylen glykolu a demi. vody v poměru 5:1 (v/v). Křivky znázorňuje časový vývoj gyračního poloměru částic při počátečních koncentracích Ca^{2+} a WO_4^{2-} rovno (a) $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ či (b) $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

Kinetický průběh je vyjádřen formou časového vývoje gyračního poloměru, R_G , nanočástic při Ca^{2+} a WO_4^{2-} rovno $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ (obr. 6.4 (a)) a $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ (obr. 6.4 (b)). I přes to, že křivky nejsou vyjádřeny přes stejný časový interval (druhý případ se neměřil dostatečně dlouho), lze zcela určitě usoudit, že při koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ částice dosahují menších velikostí, což z TEMu nelze tak jednoznačně usoudit. TEM ale poskytuje přímé obrázky částic a ještě k tomu po jejich izolaci, SAXS je tedy z tohoto pohledu pouze doplňující. Kromě toho, dle SAXSu, při koncentraci $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ a $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ nabývají částice v průměru zhruba 45 nm resp. 30 nm , což je znamená perfektní schodu s mikrofotografiema TEM/BF (obr. 6.3).

6.1.3 Celková TEM analýza CaWO_4

Pro jednu sérii nedopovaných nanočástic CaWO_4 připravené při $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ bylo provedena celková TEM analýza: TEM/BF (obr. 6.3 (C,D)), TEM/EDX a TEM/SAED, kde posledně dvě zmíněné metody pouze potvrdily to, že nanočástice jsou skutečně wolframanem vápenatým. Příslušné TEM/EDX spektrum, dvojrozměrný a

jednorozměrný TEM/SAED experimentálním difraktogramem spolu s teoreticky vypočteným je znázorněn na následujícím obr. 6.5.

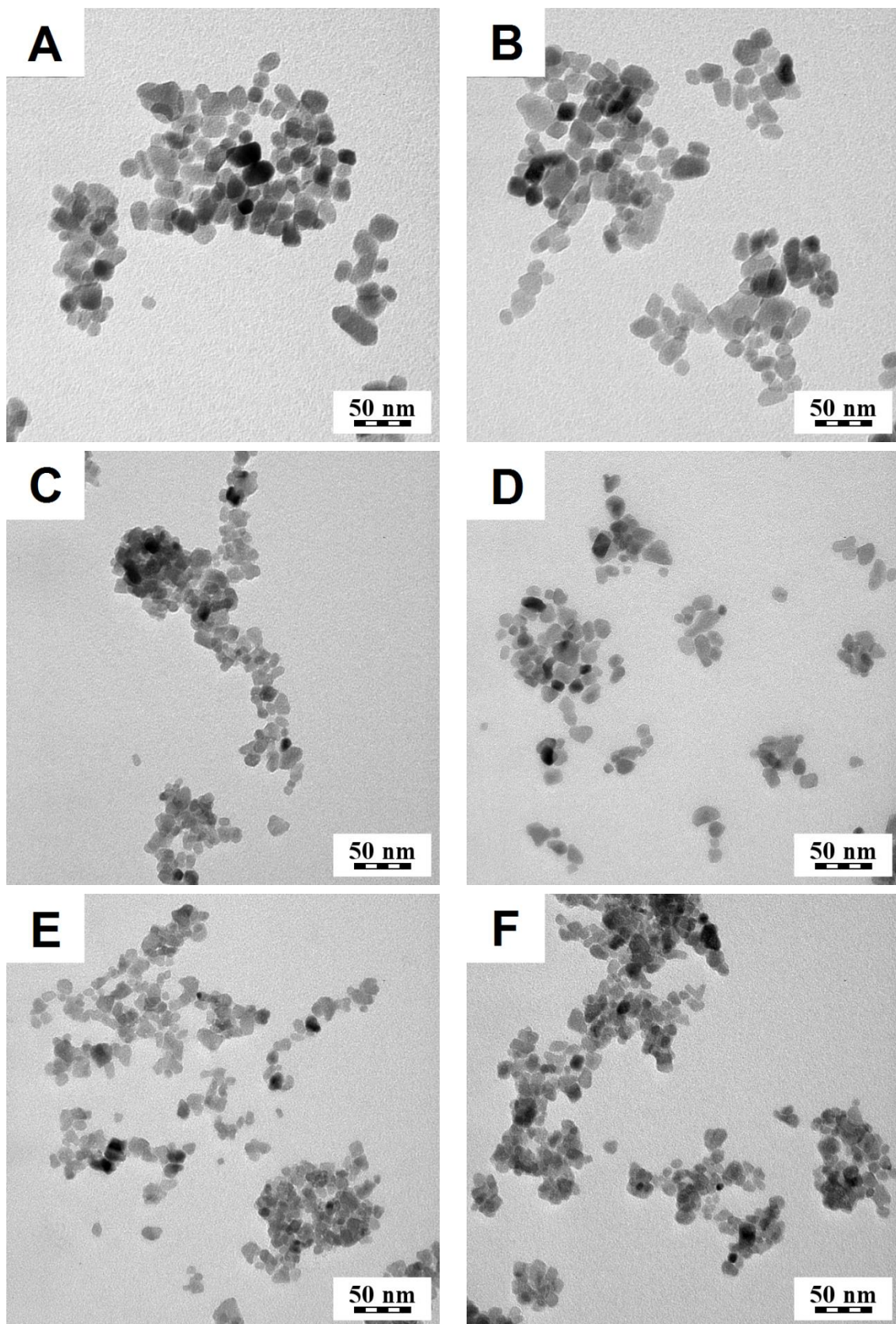


Obr. 6.5 Kompletní TEM analýza vzorku nanočástic CaWO_4 pravené při počáteční koncentraci Ca^{2+} a WO_4^{2-} rovno $0,00 \text{ mol dm}^{-3}$. (a) TEM/BF mikrografie, (b) TEM/EDX spektrum s označením hlavních přechodů, (c) TEM/SAED dvojrozměrný difraktogram a (d) porovnání experimentálních difrakčních dat (TEM/SAED) s vypočteným difraktogramem (XRD(calc)), který odpovídá struktuře CaWO_4 .

Ve spojitosti s TEM/EDX spektrem (obr. 6.5 (b)), všechny hlavní píky charakteristického rentgenového záření odpovídají složení CaWO_4 (píky C a Cu odpovídají podložce – standardní měděná síťka pro TEM mikroskopii pokrytá tenkým uhlíkovým filmem). Pokud jde o TEM/SAED difraktogramy (obr. 6.5 (d)), byla nalezena velmi dobrá shoda mezi vypočteným difraktogramem (výpočet pomocí programu PowderCell; struktura převzatá z databáze: Crystallography Open Database [121]) a experimentem. Trojice čísel u difrakčních maxim odpovídají Millerovým indexům příslušných krystalografických rovin.

6.1.4 Dopování CaWO_4 , charakterizace $\text{Ln}^{3+}:\text{CaWO}_4$

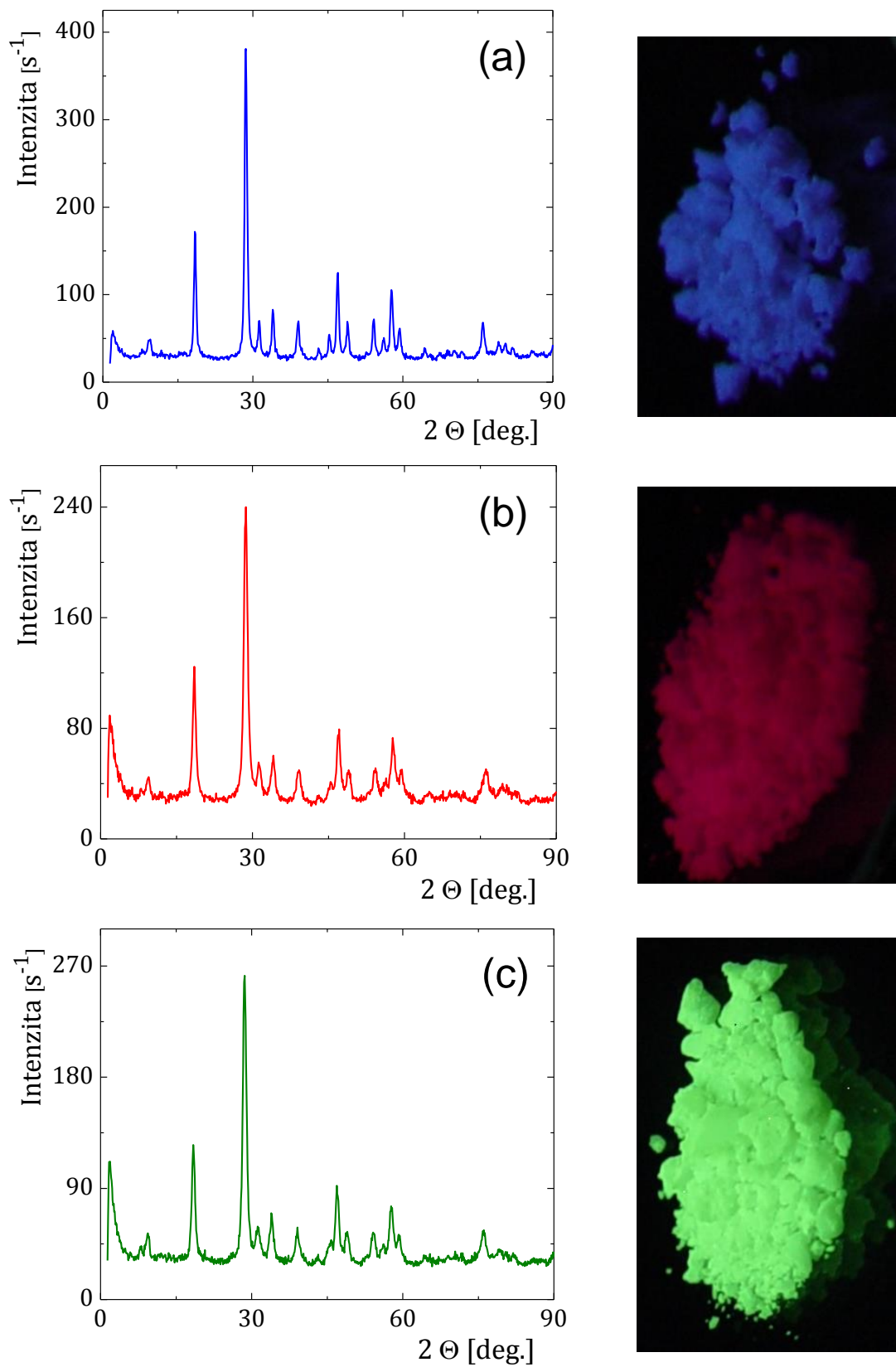
Po optimalizace přípravy nedopovaných nanočástic byly provedeny přípravy dopovaných protějšků. Bylo užito téhož pracovního postupu, akorát už od začátku byl ve směsi přítomen dopující lanthanoid, který by se měl dle literatury [77, 80, 120] zakomponovat do krystalické mřížky CaWO_4 na pozici Ca^{2+} . Kvůli tomu podle množství žádaného dopantu již od samého počátku syntézy byla použita nižší koncentrace Ca^{2+} (viz tab. 5.3, kap. 5.2.1.3). Dopování bylo provedeno pouze pro nižší počáteční koncentrace Ca^{2+} a WO_4^{2-} .



Obr. 6.5 TEM/BF mikrofotografie (A,B) CaWO_4 a $\text{Ln}^{3+}:\text{CaWO}_4$ s: (C) 5 hm% Eu^{3+} , (D) 5 hm% Tb^{3+} , (E) 10 hm% Eu^{3+} , (F) 10 hm% Tb^{3+} . Vše připravené při poč. koncentraci WO_4^{2-} rovno $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ a odpovídající koncentraci Ca^{2+} .

Všechny 4 uskutečněné série nanočástic $\text{Ln}^{3+}:\text{CaWO}_4$: 5 hm% Eu^{3+} (obr. 6.5 (C)), 5 hm% Tb^{3+} (obr. 6.5 (D)), 10 hm% Eu^{3+} (obr. 6.5 (E)) a 10 hm% Tb^{3+} (obr. 6.5 (F)), spolu s nedopovanou sérií CaWO_4 připravenou při $0,05 \text{ ml dm}^{-3}$ (obr. 6.5 (A,B)) jsou vzájemně porovnány na obr. 6.5. TEM/BF mikrofotografie zcela jednoznačně ukazují, že přítomnost dopantu při syntéze způsobuje vznik menších nanočástic, což je z hlediska aplikací v *in vitro* buněčných studiích žádoucí (viz kap. 7).

V literatuře [10-12, 83-88] se uvádí, že přítomnost dopantu neovlivňuje krystalickou strukturu CaWO_4 . Pro kontrolu této skutečnosti byla pomocí metody WAXD provedena prášková analýza tří vzorků: nedopovaného CaWO_4 a dvou typů $\text{Ln}^{3+}:\text{CaWO}_4$ s obsahem 10 hm% Eu^{3+} resp 10 hm% Tb^{3+} . Příslušné WAXD difraktogramy závislosti intenzity difraktovaných paprsků na difrakčním úhlu jsou uvedeny na následujícím obr. 6.6. Bez ohledu na intenzitě difrakce je pozice a šířka všech difrakčních maxim zachována. To potvrzuje skutečnost, že dopant byl úspěšně zakomponován do krystalické mříže wolframanu a jeho přítomnost neovlivňuje celkovou strukturu krystalu. Pro doplnění jsou k difraktogramům přiděleny digitální fotografie příslušných práškových vzorků s jejich charakteristickým zabarvením. Tohoto zabarvení bylo dosaženo s pomocí UV lampy (Camag, Švýcarsko) při excitační vlnové délce 254 nm.



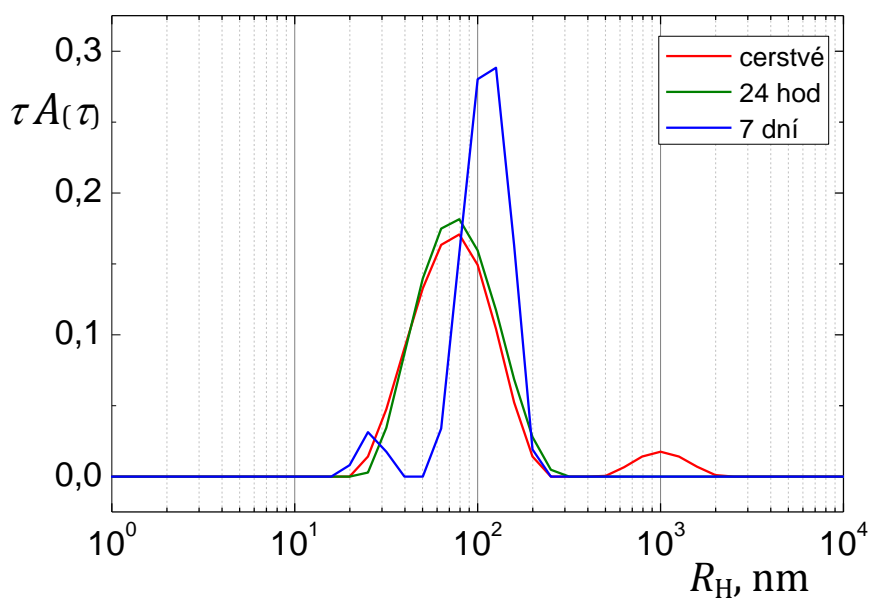
Obr. 6.6 WAXD difraktogramy a digitální fotografie (a) nedopovného CaWO_4 ; (b) $\text{Eu}^{3+}:\text{CaWO}_4$ s obsahem 10 hm%; (c) $\text{Tb}^{3+}:\text{CaWO}_4$ s obsahem též 10 hm%.

6.2 Charakterizace a stabilizace polysacharidem pokrytého CaWO_4 a $\text{Ln}^{3+}:\text{CaWO}_4$

Po úspěšné přípravě a optimalizaci postupů přípravy CaWO_4 a $\text{Ln}^{3+}:\text{CaWO}_4$ bylo potřeba přejít k další etapě ve výzkumu těchto nanočástic, dispergovat je ve vodném roztoku vhodného biokompatibilního stabilizátoru při určitém pH a přitom v rozumném časovém intervalu vytvořit stabilní suspenzi.

6.2.1 Stabilizace ve vodném roztoku monosacharidu

V této fázi bylo provedeno nepřeberné množství pokusů spojené s rozdispergováním nanočástic CaWO_4 s cílem vytvořit stabilní suspenzi nesedimentujících nanočástic. Mezi vyzkoušenými monosacharidy resp. disacharidy byly: D-(+)-glukóza, sacharóza, D-(+)-Trehalóza dihydrát, D-mannitol (cukerný alkohol), D-(+)-manóza a D-(+)-galaktóza. Ze všech těchto studovaných látek se jako nejlepším stabilizátorem ozřejmila D-(+)-galaktóza. Časová stabilita suspenze byla sledována metodou DLS podávající. Na následujícím obr. 6.7 je příslušní DLS distribuce 1 mg ml^{-1} koncentrované suspenze CaWO_4 ve vodném roztoku galaktózy o koncentraci 50 mg ml^{-1} .



Obr. 6.7 DLS distribuce a její časová změna pro 1 mg ml⁻¹ koncentrované suspenze CaWO₄ ve vodném roztoku galaktózy o koncentraci 50 mg ml⁻¹.

Z příslušného průběhu DLS distribuce je vidět, že její profil se během prvních 24 hodin prakticky nezměnil. Distribuce ale po týdnu nabyla na intenzitě a posunula se do vyšších hydrodynamických poloměrů. Částice tedy z pohledu jednoho dne nevykazují žádné velikostní změny a mají R_H kolem 80 až 90 nm. Po 7 dnech ale R_H nabývá zhruba o 15 až 20 nm vyšších hodnot, tedy z pohledu jednoho týdne se začíná projevovat určitý podíl nestability suspenze a tendence k sedimentaci.

6.2.1 Stabilizace ve vodném roztoku polysacharidu o daném pH

Po úspěšné stabilizaci částic CaWO₄ v roztoku galaktózy bylo dalším krokem tyto částice stabilizovat při požadovaném pH. Šlo o hodnoty 5; 6,5 a 7,4. Důvod byl následující. pH 7,4 je fyziologické pH živého organismu, ve které jsou ostatně také kultivovány buněčné linie pro *in vitro* studie (viz kap. 7) ; pH 6,5 odpovídá hodnotě pH v místech, kde je organismus či tkáň postižena nádorem a pH 5 odpovídá prostředí v trávicích organelách živých buněk.

V této fázi se ale naskytl problém, protože žádný z běžně dostupných pufrů nebyl vyhovující pro systém CaWO₄ dispergované v galaktóze. V následující tab. 6.1 jsou uvedeny použité pufrů:

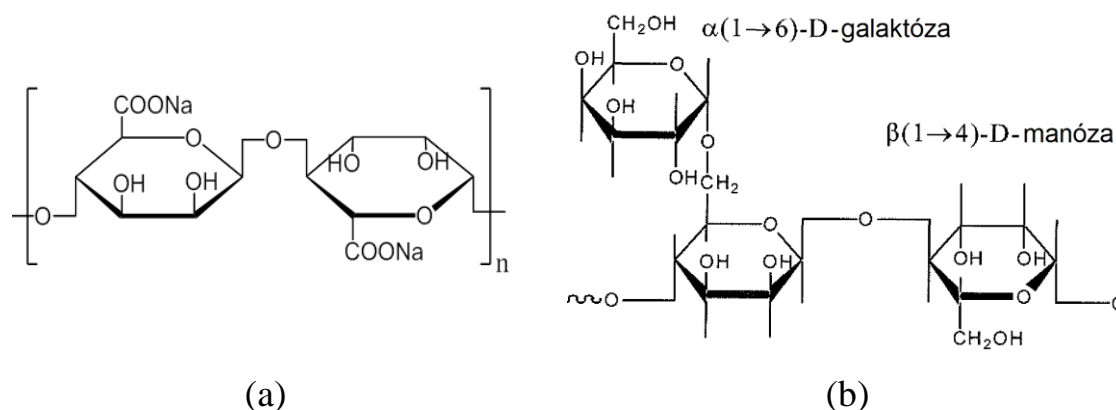
Tab. 6.1
Použité pufrů.

BR	McI
acetátový	fosfátový
PBS	HEPES

Ani jeden z těchto pufrů neprokázal vyhovující výsledky pro danou suspenzi. Vysvětlení je následující. Univerzální BR pufr obsahuje kyselinu boritou, která má tendenci se komplexovat s cukry a tedy zvyšuje sedimentaci wolframanových částic. Naopak další univerzální pufr v podobě McI obsahuje kyselinu citrónovu, která se v důsledku přítomných hydroxylových skupin váže na šestimocný wolfram a tyto částice zcela rozpustí. Ve výsledku tedy vzniká pravý roztok s rozpuštěnými ionty WO₄²⁻ a Ca²⁺. Fosfátový pufr a PBS mají z chemického hlediska stejná efekt jako BR. Hledal se tedy takový pufr, který nemá tendenci interagovat ani s cukrem

(stabilizátorem) a ani s částicemi CaWO_4 . Potenciální možností byl tzv. HEPES pufr [122], který by se díky své chemické struktuře [122] neměl s ničím komplexovat. Bohužel i v tomto posledním případě se částice CaWO_4 nakonec z roztoku galaktózy vysrážely.

Po těchto neúspěších bylo další fází využití polysacharidových stabilizátorů, kde již HEPES pufr projevilo kladné výsledky. Použitými polysacharidy byl guar a alginát sodný, zobrazené na následujícím obr. 6.8.



Obr. 6.8 Struktura polysacharidových stabilizátorů pro částice CaWO_4 v podobě (a) alginátu sodného (struktura nakreslena v programu ChemDraw Ultra) a (b) guaru (převzato z[123]).

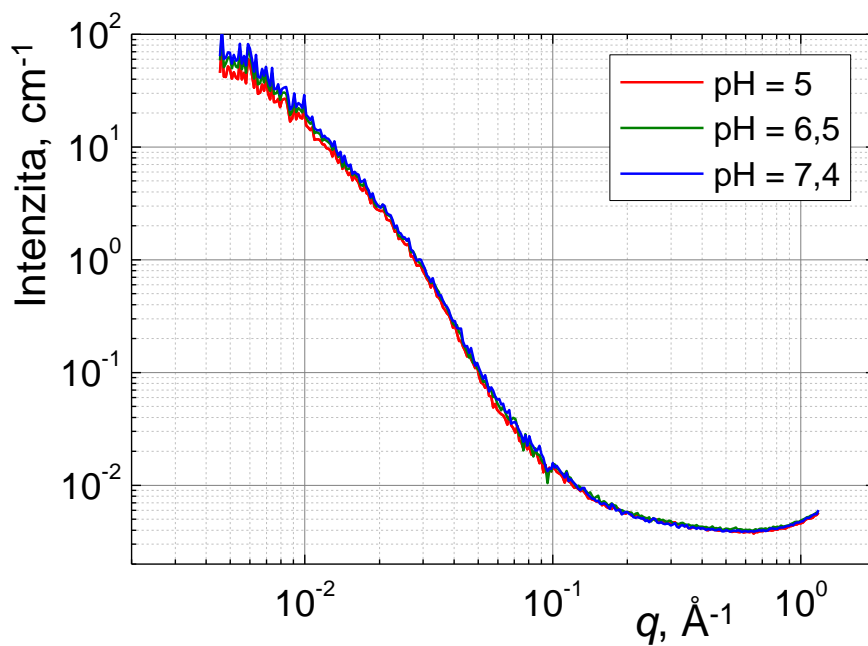
Protože alginát sodný a guar po rozpuštění ve vodě zvyšují viskozitu roztoku, nebylo možné v nich studovat stabilitu částic technikou DLS, jejíž teorie tento údaj vyžaduje (viz kap. 4.2, rovnice (9)). S pomocí techniky SAXS ale bylo umožněno tyto systémy studovat. Na následujícím obr. 6.9 jsou SAXS rozptylové křivky pro systém 1 mg ml^{-1} koncentrovaných nanočástic CaWO_4 v 5 mg ml^{-1} koncentrovaného roztoku alginátu sodného (obr. 6.9 (a)) a stejně koncentrovaném roztoku guaru (obr. 6.9 (b)) pufované roztokem HEPES pufru o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ při třech různých pH (5; 6,5, 7,4). Vzorky byly měřeny 3 dny po dispergaci. Přehled vzorku v tab. 6.1.

Tab. 6.1

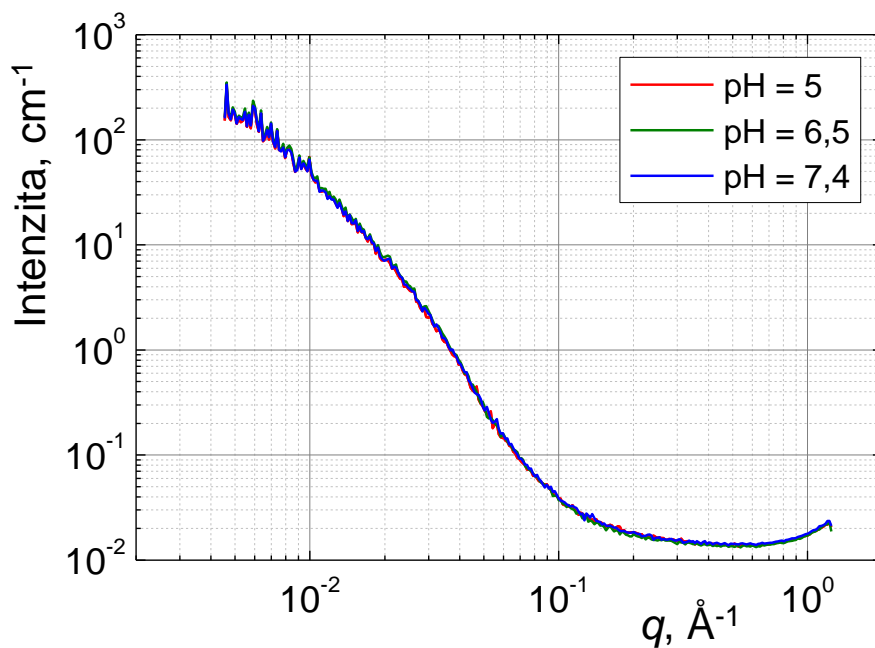
Přehled vzorků pro SAXS experiment. Koncentrace CaWO_4 činila 1 mg ml^{-1} .

stabilizátor	pufř	pozn. k přípravě	SAXS křivka
alginát sodný (5 mg ml^{-1})	HEPES $0,05\text{ mol dm}^{-3}$	10 min dispergace	Obr. 6.9 (a)
guar (5 mg ml^{-1})	HEPES $0,05\text{ mol dm}^{-3}$	10 min dispergace	Obr. 6.9 (b)

Za použití Guinerovy aproximace (kap. 4.4, rovnice (23)) byly vygenerovány hodnoty gyračních poloměrů částic, které ve všech 6 případech činili 22 nm. To znamená, že částice měli v průměru 44 nm a tedy je zde perfektní schoda s TEM/BF (kap. 6.1.2). Opravdová analýza časové stability v roztoku je ale až v následující kap. 6.2.2.



(a)



(b)

Obr. 6.9 SAXS rozptylové křivky systému 1 mg ml⁻¹ koncentrovaných nanočástic CaWO₄ v 5 mg ml⁻¹ koncentrovaného roztoku (a) alginátu sodného, (b) guaru, pufované 0,05M roztokem HEPES při třech různých pH (5; 6,5, 7,4). Vzorek byl 3 dny starý.

6.2.2 SAXS analýza časové stability nanočástic

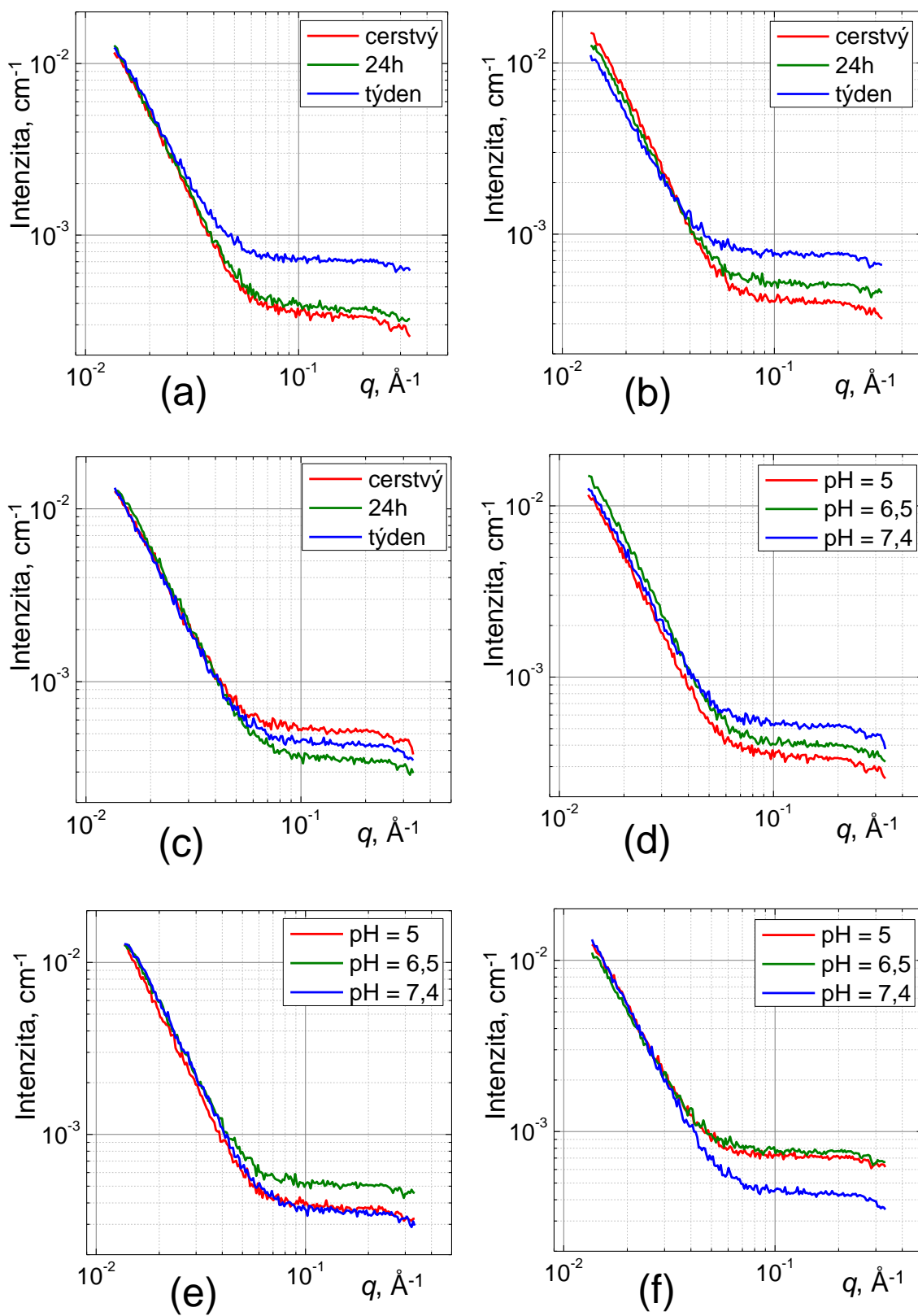
Z důvodu, které budou ozřejměny v kap.7, byla časová stabilita nanočástic pomocí SAXS provedena pouze pro částice $Tb^{3+}:CaWO_4$ s obsahem 5 hm%. Ještě před detailnějším popisem následujících rozptylových křivek je nutno podotknout, že měření probíhalo na IP detektoru, jehož spodní hranice dostupných rozptylových úhlů, ve kterém lze ještě provádět detekci je $0,014 \text{ \AA}^{-1}$. Guinerova oblast pro získání informací o gyračním poloměru je ale v oblasti pod 10^{-2} \AA^{-1} , tudíž Guinerova aproximace (kap. 4.4, rovnice (23)) nemůže platit. Proto následující analýza se týká pouze sledování vzájemných změn, vlivů času a pH prostředí, popřípadě vlivu typu užitého polysacharidu.

Ucelený přehled měřených vzorků je na následující tab. 6.2. Byly použity 3 různé polysacharidy: alginát sodný, guar a manan. Manan jako jediný po rozpuštění zachovává viskozita roztoku. pH bylo udržované pomocí HEPES pufru o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$. Analýza časové stability probíhala při třech různých pH, každá měřena ve třech časových bodech. Pro přehlednost a názornost je tato problematika shrnuta v následující tab. 6.2, kde je navíc i odkaz na nadcházející rozptylové křivky.

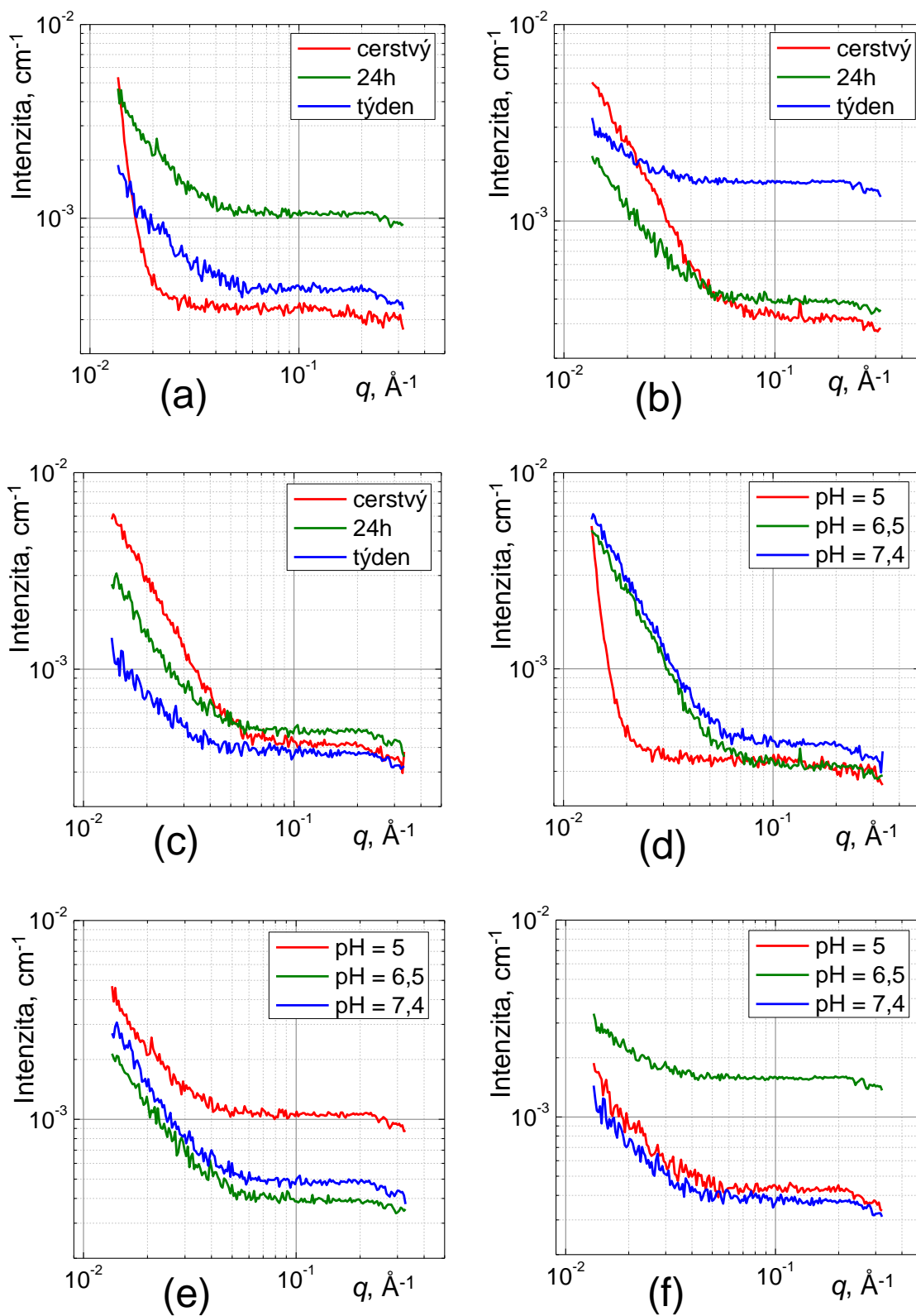
Tab. 6.2

Přehled vzorků pro SAXS analýzu časové stability 1 mg ml^{-1} koncentrovaných nanočástic $CaWO_4$.

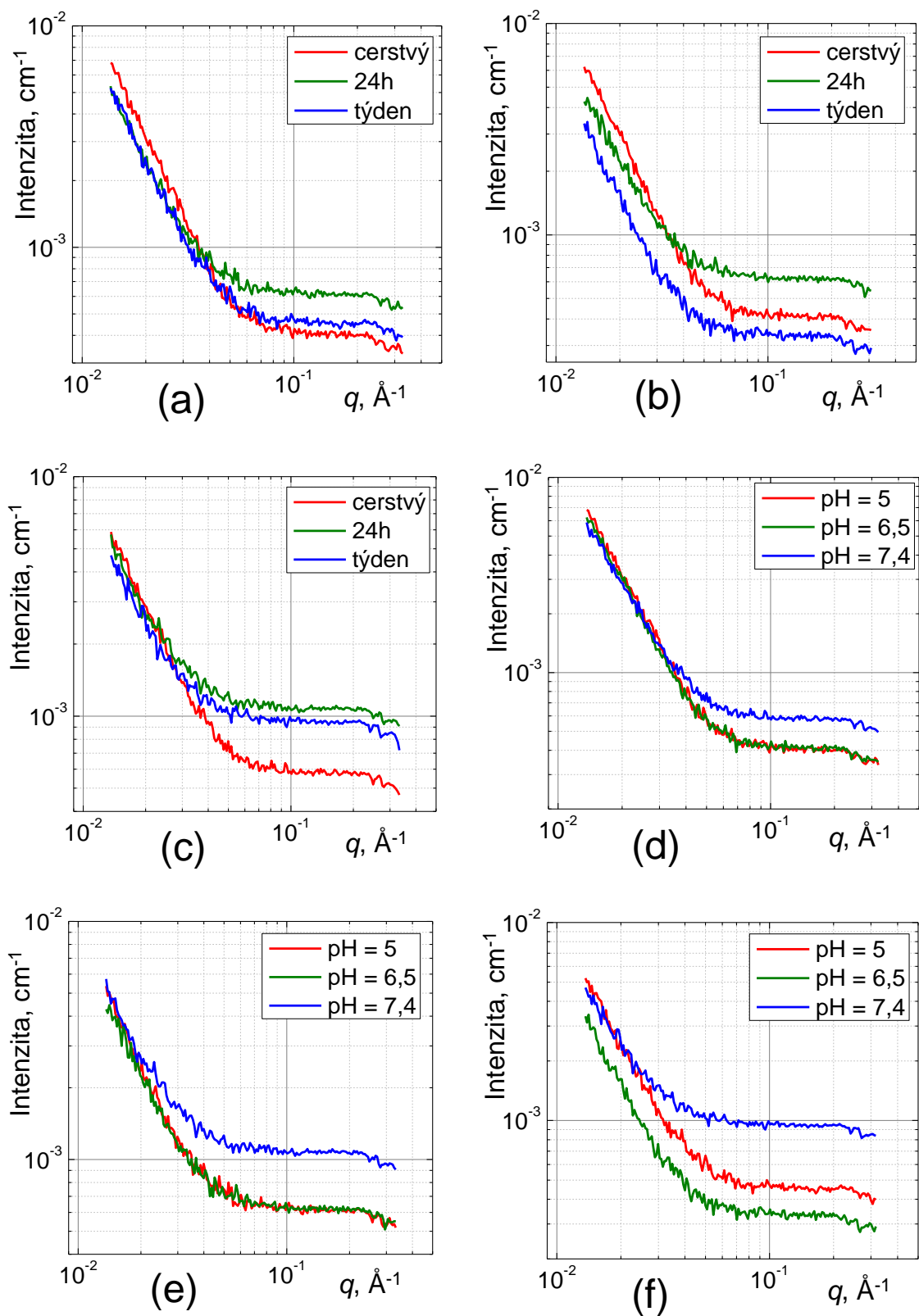
stabilizátor	pufr	pH	čas měření	SAXS křivky
alginát sodný 5 mg ml^{-1}	HEPES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$	5,0	čerstvé	Obr. 6.10 (a-f)
		6,5	24 h poté	
		7,4	týden poté	
guar 5 mg ml^{-1}	HEPES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$	5,0	čerstvé	Obr. 6.11 (a-f)
		6,5	24 h poté	
		7,4	týden poté	
manan 5 mg ml^{-1}	HEPES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$	5,0	čerstvé	Obr. 6.12 (a-f)
		6,5	24 h poté	
		7,4	týden poté	



Obr. 6.10 SAXS analýza časové stability systému CaWO_4 (1 mg ml^{-1}) v roztoku alginátu sodného (5 mg ml^{-1}). Vliv času na průběh rozptylových křivek při pH (a) 5; (b) 6,5; (c) 7,4. Vliv pH ve třech různých časových bodech: (d) čerstvě po dispergaci, (e) 24 hodin po dispergaci, (f) týden po dispergaci.



Obr. 6.11 SAXS analýza časové stability systému CaWO_4 (1 mg ml^{-1}) v roztoku guaru (5 mg ml^{-1}). Vliv času na průběh rozptylových křivek při pH (a) 5; (b) 6,5; (c) 7,4. Vliv pH ve třech různých časových bodech: (d) čerstvě po dispergaci, (e) 24 hodin po dispergaci, (f) týden po dispergaci.



Obr. 6.12 SAXS analýza časové stability systému CaWO₄ (1 mg ml⁻¹) v roztoku mananu (5 mg ml⁻¹). Vliv času na průběh rozptylových křivek při pH (a) 5; (b) 6,5; (c) 7,4. Vliv pH ve třech různých časových bodech: (d) čerstvě po dispergaci, (e) 24 hodin po dispergaci, (f) týden po dispergaci.

V případě alginátu (obr. 6.10) je vidět jakási tendence systému se v čase zmenšovat (a-c), protože spád křivek klesá s časem (projev menší destruktivní interference), akorát u $\text{pH} = 7,4$ dochází v rámci prvního dne k opačné situaci. Pravděpodobně částice mají tendenci sedimentovat, tudíž distribuce velkých částic nepřispívá k rozptylu. Co se týče pH v různých časových intervalech (d-f), jsou částice při $\text{pH} = 7,4$ na počátku nejmenší, ale po týdnu dochází ke zcela opačné situaci. Z toho by šlo vyvodit, že částice při tomto pH sedimentují nejpomaleji a tedy tvoří nejstabilnější suspenzi.

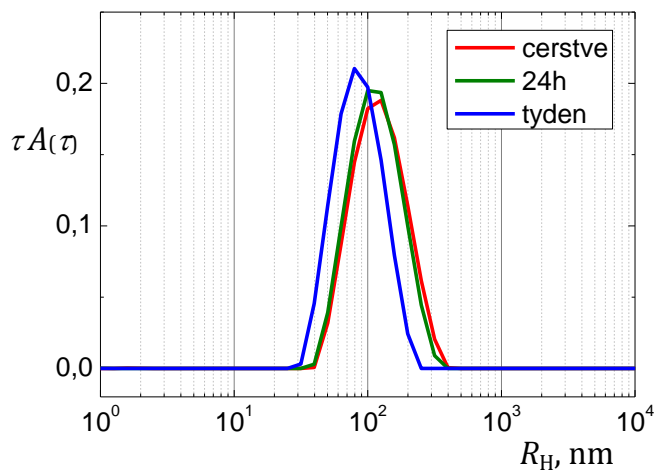
I v případě guaru (obr. 6.11) a mananu (obr. 6.12) lze vyvodit velmi podobné závěry ve spojitosti se sedimentací projevující se tím, že po delších intervalech přispívá k rozptylu pouze menší distribuce částic. U guaru navíc opět platí případ, kdy při $\text{pH} = 7,4$ se v čase mění spád rozptylové křivky nejpomaleji, u mananu je tomu ale právě naopak.

Na závěr lze zcela jistě usoudit, že částice mají tendenci se po dispergaci usazovat, což se projevuje poklesem spádu rozptylových křivek s rostoucí hodnotou rozptylového vektoru.

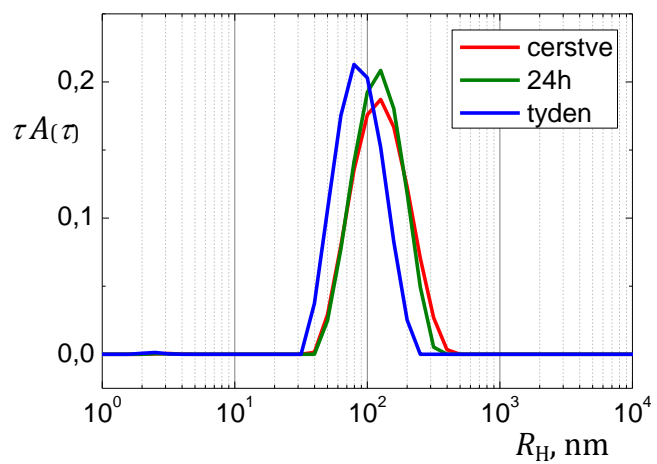
I přes porušení Guineroва kritéria, kdy hodnota $R_G \cdot q$ by měla být menší než 1,3 [115], byla hodnota R_G nanočástic vypočtena a vždy se pohybovala kolem 11 až 12 nm při hodnotách $R_G \cdot q$ v rozmezí 1,9 až 2,0. Jde tedy pouze o orientační hodnoty, poněvadž při srovnání s TEM/BF mikrofotografiemi (kap. 6.1.2) a výsledků ze SAXSu (za použití multidrátového 2D detektoru, kap. 6.2.1) jsou částice poloviční.

6.2.2 DLS analýza časové stability nanočástic v mananu

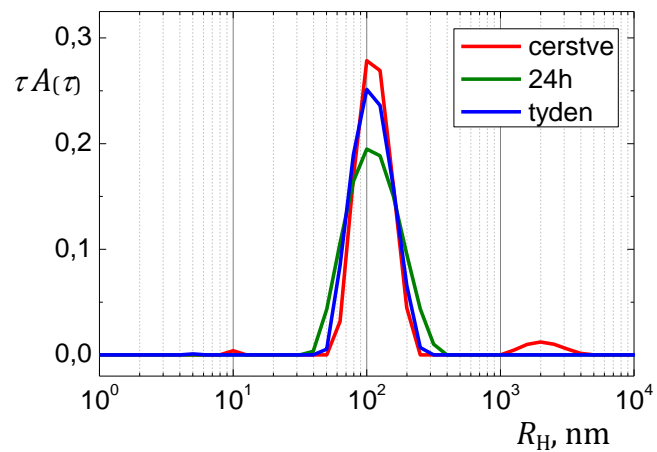
Protože manan nemění viskozitu roztoku, bylo možné studovat stabilitu v jeho přítomnosti i technikou DLS. Na obr. 6.13 jsou příslušné časově závislé změny v průběhu DLS distribuce při $\text{pH} = 5$ (a), $\text{pH} = 6,5$ (b) a $\text{pH} = 7,4$. Pufující látkou byl opět HEPES o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$. Průběh těchto distribucí, se během prvních 24 hodin prakticky nezměnil, po týdnu už bylo možné pozorovat určité změny spojené s posunem maxima k nižším hodnotám. I zde výsledek napovídá o projevu ztráty stability suspenze, kdy již po jednom týdnu pouze podíl menších částic přispívá k rozptylu. Tento posun se ale v případě nejvyššího pH neprojevil a pozice maxima zůstala nezměněna.



(a)



(b)



(c)

Obr. 6.13 DLS analýza časové stability systému CaWO_4 (1 mg ml^{-1}) v roztoku mananu (5 mg ml^{-1}). Vliv času na průběh DLS distribuce při pH (a) 5; (b) 6,5; (c) 7,4.

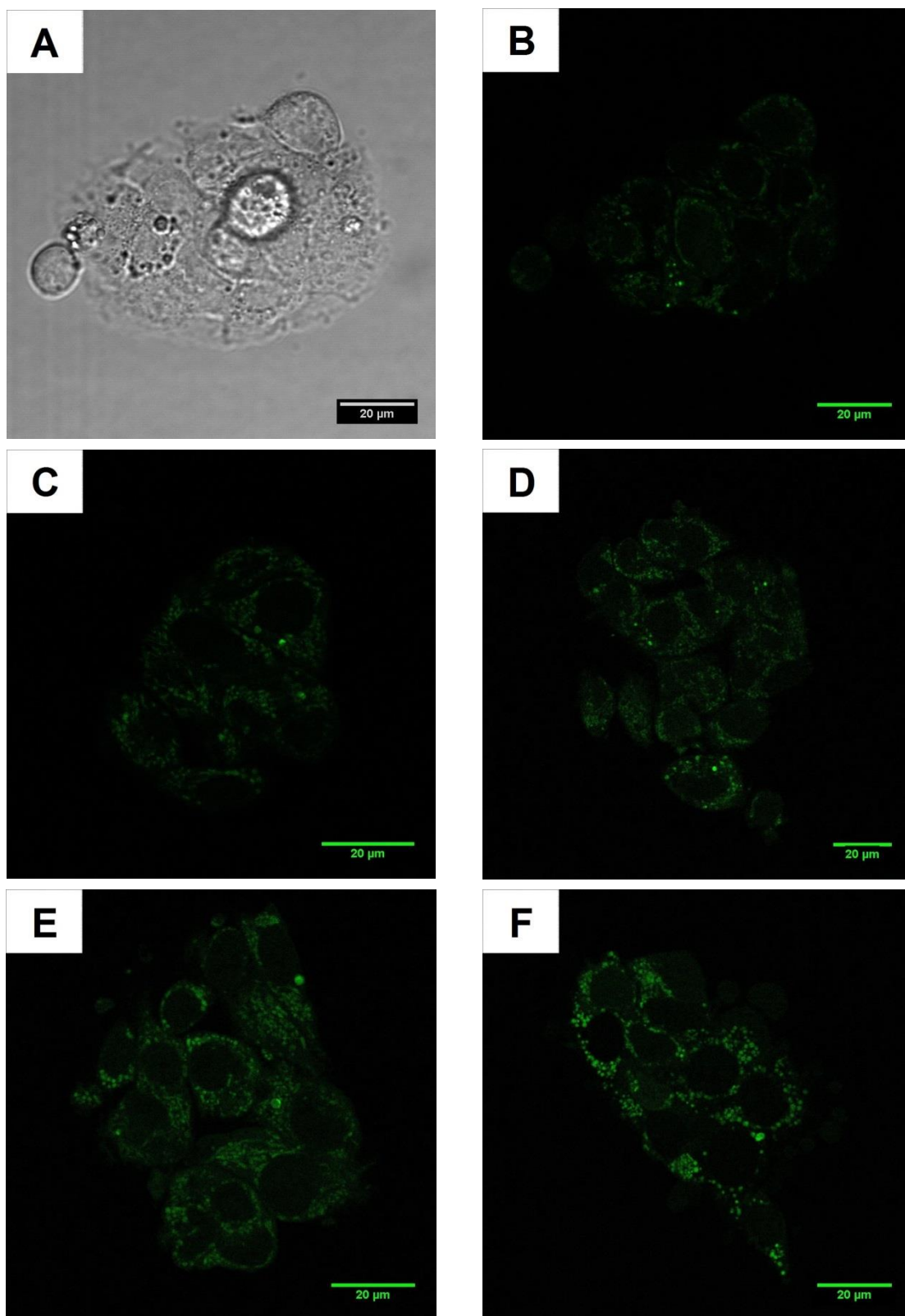
7 *In vitro* buněčné studie

Smysl celé diplomové práce je obsažen v této kapitole. Využití dopovaného wolframanu vápenatého pokryté polysacharidem jako kontrastní látky pro *in vitro* zobrazování buněčných linií. Studovanými buňkami byly linie hepatocelulárního karcinomu (HepG2) a osteosarkomu (MG-63). Důvodem vybrání těchto dvou typů spočívá v tzv. guarovém cílení, které by mělo fungovat u linie HepG2. Tyto buňky vlastní na svém povrchu tzv. asialoglykoproteinové receptory (ASGPR), který využívají ke svému chodu galaktózové zbytky, které jsou i strukturní součástí polysacharidu guaru (obr. 6.8). Tedy linie MG-63 je v této práci využita jako negativní kontrola pro guarové cílení.

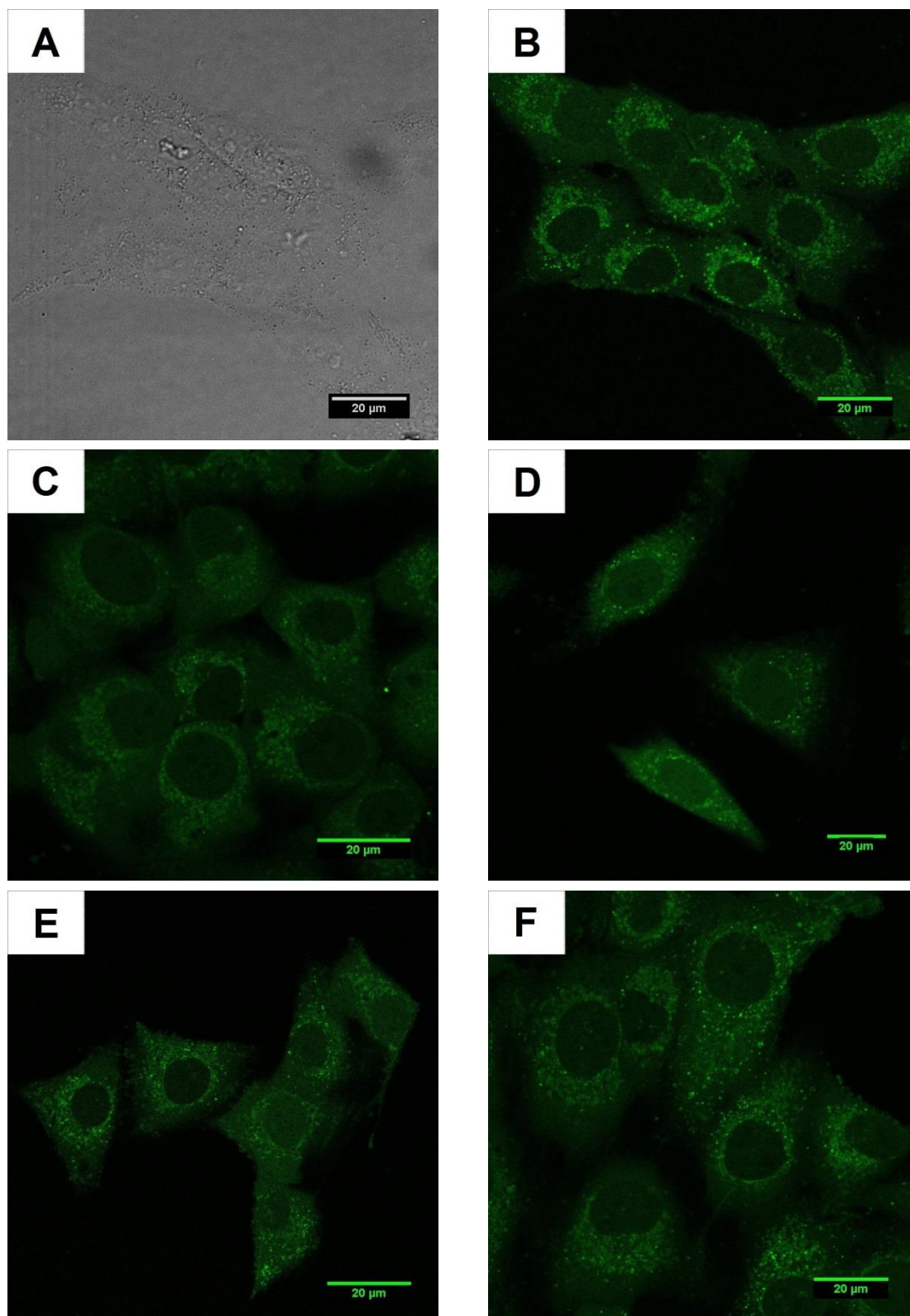
Pro buněčné studie byly oběma liniím aplikovány 4 typy suspenzí uvedené v tab. 7.1.

Tab. 7.1
Přehled vzorků pro *in vitro* buněčné studie.

stabilizátor	Tb ³⁺ :CaWO ₄ 5 hm%	HEPES pufr	ředění s MEM (kultiv. Med.)	pH
alginát sodný 1 mg ml ⁻¹	0,25 mg ml ⁻¹	0,05 mol dm ⁻³	1 : 4	7,4
dextran 1 mg ml ⁻¹	0,25 mg ml ⁻¹	0,05 mol dm ⁻³	1 : 4	7,4
guar 1 mg ml ⁻¹	0,25 mg ml ⁻¹	0,05 mol dm ⁻³	1 : 4	7,4
manan 1 mg ml ⁻¹	0,25 mg ml ⁻¹	0,05 mol dm ⁻³	1 : 4	7,4



Obr. 7.1 Obrázky z dvoufotonového konfokálního mikroskopu Leica SP8. (a) klasická světlelní mikroskopie HepG2 buňky, (b) samotná autofluorescence HepG2 buňky, a její zobrazování (c) alginátem, (d) dextranem, (e) guarem a (g) mananem..



Obr. 7.2 Obrázky z dvoufotonového konfokálního mikroskopu Leica SP8. (a) klasická světlí mikroskopie MG-63 buňky, (b) samotná autofluorescence MG-63 buňky, a její zobrazování (c) alginátem, (d) dextranem, (e) guarem a (g) mananem..

Z výsledných fotografií na obr. 7.1 lze zcela jednoznačně usoudit, že guarové cílení u linie HepG2 skutečně funguje, protože buňky v přítomnosti guaru fluoreskují nejvíce (obr. 7.1 (e)). Na druhém místě je manan, protože je obecně cílen téměř na jakýkoli typ buněčné membrány (má receptory po celém těle, v lidském těle je cílen zejména na oblasti mízních uzlin). Z dextranu a alginátu více svítí dextran, protože je neutrální a je méně odpuzován od záporně nabitých buněčných membrán než záporně nabitý alginát. Alginát téměř svítí na úrovni samotné autofluorescence.

V porovnání s fotografiemi na obr. 7.2 nic nenaznačuje tomu, že by u linie MG-63 skutečně bylo nějaké guarové či jiné cílení. Co je ale skutečně dost viditelné, že MG-63 vykazují mnohem intenzivnější autofluorescenci.

Tímto lze tedy říct, že systém dopovaných rozdispergovaných nanočástic CaWO_4 pokryté přírodním polysacharidem zcela určitě splnil svoji úlohu jako kontrastních látek pro in vitro fluorescenční zobrazování a navíc za použití specifického aktivního cílení za pomoci guaru. Jenom pro informaci, je dobré se zmínit o skutečnosti, že při excitační vlnové délce 350 nm (s pomocí dvoufotonové excitace) byly vybuzeny absorpční přechody přítomného dopantu (f-f přechody), které jsou obecně zakázané. Intenzivnějších přechodů by bylo dosaženo při vlnových délkách v oblasti 220 až 250 nm, kde silně absorbují skupiny WO_4^{2-} . To je ale s pomocí infračerveného pulsního laseru nemožné jako zdroj excitace nemožné dosáhnou a navíc by to bylo pro studované buněčné linie smrtelné.

6 Závěr

V první části této diplomové práce byly úspěšně syntetizovány nanočástice wolframanu vápenatého. Postup byl optimalizovaný, což bylo dokázáno s pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Částice nabývali velikosti kolem 40 nm v průměru. Pro jeden vybraný práškový vzorek byla provedena celková analýza na transmisním elektronovém mikroskopu. Dle energiově-disperzního rentgenového spektra a elektronového difraktogramu bylo potvrzeno, že šlo skutečně o wolframan vápenatý.

V dalším kroku byly připraveny nanočástice dopované europiem(III) nebo terbiem(III) s podílem 5 a 10 hm% resp. z původního množství vápníku. Částice dle transmisní elektronové mikroskopie nabývali menších rozměrů. Na základě výsledků z širokoúhlé difrakce rentgenového záření přítomnost dopujících lanthanoidů neovlivňovalo strukturu původního wolframanu vápenatého.

Byly úspěšně dispergovány a stabilizovány nanočástice wolframanu ve vodných roztocích polysacharidů. Maloúhlovým rozptylem rentgenového záření byla určena velikost nanočástic v podobě gyračního poloměru rovno kolem 22 nm, což je v porovnání s elektronovou mikroskopií výborná shoda.

S pomocí maloúhlového rozptylu rentgenového záření byla sledována časová stabilita suspenze nanočástic wolframanu v alginátu sodném, guaru a mananu při pH rovno 5; 6,5 a 7,4; které bylo v průběhu experimentu udržováno pomocí pufru HEPES. Z příslušných sledovaných změn v úhlové závislosti intenzity rozptylu bylo prokázáno, že částice mají tendenci sedimentovat, což se projevilo ztrátou podílu distribuce větších částic. Za použití mananu a dynamického rozptylu světla byla tato skutečnost potvrzena.

Buněčné linii hepatocelulárního karcinomu a osteosarkomu byly aplikovány nanočástice wolframanu vápenatého s 5%ním hmotnostním podílem terbia(III) ve čtyřech různých polysacharidech, alginátu sodném, guaru, dextranu a mananu. U linie hepatocelulárního karcinomu bylo sledováno guarové aktivní cílení potvrzující skutečnost, že na povrchu těchto buněk existují tzv. asialoglykoproteinové receptory, centra využívající galaktózových zbytků ke své funkci. U buněčné linie osteosarkomu, která byla použita jako negativní kontrola skutečně žádně guarové aktivní cílení neprojevila. Tímto závěrečným krokem bylo potvrzeno, že dopovaný wolframan vápenatý pokrytý polysacharidem je vhodnou kontrastní látkou pro in vitro buněčné studie a fluorescenční zobrazování.

Seznam použité literatury

- [1] *Springer Handbook of nanotechnology*. B. Bhushan (Ed.). 3rd ed. **Berlin**, Springer 2010.
- [2] *Handbook of Nanophysics: Functional Nanomaterials*. K. D. Sattler (Ed.). Boca Raton, CRC Press 2011.
- [3] *Handbook of Nanophysics: Nanoelectronics and Nanophotonics*. K. D. Sattler (Ed.). Boca Raton, CRC Press 2011.
- [4] *Handbook of Nanophysics: Nanomedicines and Nanorobotics*. K. D. Sattler (Ed.). Boca Raton, CRC Press 2011.
- [5] *World Cancer Report 2014*. B. W. Stewart, C. P. Wild (Eds.). Lyon, World Health Organization Press 2014.
- [6] Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R.: Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 751-760 (2007).
- [7] Mulder, W. J. M.; Griffioen, A. W.; Strijkers, G. J.; Cormode, D. P.; Nicolay, K.; Fayad, Z. A.: Magnetic and Fluorescent Nanoparticles for Multimodality Imaging. *Nanomedicine* **2**, 307-324 (2007).
- [8] Kherlopian, A. R.; Song, T.; Duan, Q.; Neimark, M. A.; Po, M. J.; Gohagan, J. K.; Laine, A. F.: A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Syst. Biol.* **2**, 74 (2008).
- [9] Welssleder, R.; Mahmood, U.: Molecular Imaging. *Radiology* **219**, 316-333 (2001).
- [10] Sadegh, M.; Badiei, A.; Abbasi, A.; Goldooz, H.; Mohammadi Ziarani, G.: Preparation of $\text{CaWO}_4:\text{Ln}^{3+}@\text{SiO}_2$ (Ln=Tb, Dy and Ho) nanoparticles by a combustion reaction and their optical properties. *J. Lumin.* **130**, 2072-2075 (2010).
- [11] Du, C.; Lang, F.; Su, Y.; Liu, Z.: Low temperature nanocasting synthesis of lanthanide ions (Ln = Tb, Eu, Dy) doped CaWO_4 mesoporous structure with efficiently luminescent properties. *J. Colloid. Interface Sci.* **394**, 94-99 (2013).
- [12] Gayatri Sharma, K.; Rajmuhon Singh, N.: Synthesis and luminescence properties of $\text{CaMoO}_4:\text{Dy}^{3+}$ (M = W, Mo) nanoparticles prepared via an ethylene glycol route. *New J. Chem.* **37**, 2784-2791 (2013).
- [13] Zhang, Y.; Holzwarth, N. A. W.; Williams, R. T.: Electronic band structures of the scheelite materials CaMoO_4 , CaWO_4 , PbMoO_4 , and PbWO_4 . *Phys. Rev. B* **57**, 12738-12750 (1998).
- [14] Lacomba-Perales, R.; Errandonea, D.; Segura, A.; Ruiz-Fuertes, J.; Rodríguez-Hernández, P.; Radescu, S. López-Solano, J.; Mujica, A.; Muñoz, A.: A combined high-pressure experimental and theoretical study of the electronic band-structure of scheelite-type AWO_4 (A = Ca, Sr, Ba, Pb) compounds. *J. Appl. Phys.* **110**, 043703 (2011).

- [15] Sun, L.; Cao, M.; Wang, Y.; Sun, G.; Hu, Ch.: The synthesis and photoluminescent properties of calcium tungstate nanocrystals. *J. Cryst. Growth* **289**, 231-235 (2006).
- [16] *Carbohydrate Chemistry: Volume 30*. R. J. Ferrier (Ed.). Cambridge, The Royal Society of Chemistry 1998.
- [17] Park, K.: Polysaccharide-based near-infrared fluorescence nanoprobes for cancer diagnosis. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2**, 106-113 (2012).
- [18] Allen, T. M.: Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 750-763 (2002).
- [19] Solaro, R.; Chiellini, F.; Battisti, A.: Targeted Delivery of Protein Drugs by Nanocarriers. *Materials* **3**, 1928-1980 (2010).
- [20] *Drug Delivery Applications of Noninvasive Imaging: Validation from Biodistribution to Sites of Action*. Ch. Lie, M. Tian (Eds.). Hoboken, Wiley 2014.
- [21] Dobrucki, L. W.; Sinusas, A. J.: Molecular imaging: A new approach to nuclear cardiology. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **49**, 106-115 (2005).
- [22] Kairemo, K.; Erba, P.; Bergström, K.; Pauwels, E. K. J.: Nanoparticles in Cancer. *Curr. Radiopharm.* **1**, 30-36 (2008).
- [23] Weissleder, R.: Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 11-19 (2002).
- [24] Ntziachristos, V.: Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat. Methods* **7**, 603-614 (2010).
- [25] Fedr, R.; Jelínková, I.; Skender, B.; Souček, K.: *Intravitální zobrazení: Skriptum metodických materiálů*. http://organonet.med.muni.cz/media/62515/vy_09.pdf.
- [26] Couillard-Despres, S.; Vreys, R.; Aigner, L.; Van der Linden, A.: *In vivo* monitoring of adult neurogenesis in health and disease. *Front. Neurosci.* **5**, 67-77 (2011).
- [27] Fernández-Suárez, M.; Ting, A. Y.: Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 929-943 (2008).
- [28] Winter, P. M.; Caruthers, S. D.; Kassner, A.; Harris, T. D.; Chinen, L. K.; Allen, J. S.; Lacy, E. K.; Zhang, H.; Robertson, J. D.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M.: Molecular imaging of angiogenesis in nascent VX-2 rabbit tumors using a novel $\alpha_v\beta_3$ -targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* **63**, 5838-5843 (2003).
- [29] Winter, P. M.; Morawski, A. M.; Caruthers, S. D.; Fuhrhop, R. W.; Zhang, H.; Williams, T. A.; Allen, J. S.; Lacy, E. K.; Robertson, J. D.; Lanza, G. M.; Wickline, S. A.: Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with $\alpha_v\beta_3$ -targeted nanoparticle. *Circulation* **108**, 2270-2274 (2003).

- [30] Sivasubramanian, M.; Hsia, Y.; Lo, L. W.: Nanoparticle-facilitated functional and molecular imaging for the early detection of cancer. *Front. Mol. Biosci.* **1**, 15-30 (2014).
- [31] Meikle, S. R.; Kench, P.; Kassiou, M.; Banati, R. B.: Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies. *Phys. Med. Biol.* **50**, R45-R61 (2005).
- [32] Svandberg, S. *Atomic and Molecular Spectroscopy: Basic Aspects and Practical Applications*. 4th ed. Berlin, Springer 2004.
- [33] Chen, Y.; Yuan, S.; Wierwille, J.; Naphas, R.; Li, Q.; Blackwell, T. R., Winnard, Jr., P. T.; Raman, V.; Glunde, K.: Integrated Optical Coherence Tomography (OCT) and Fluorescence Laminar Optical Tomography (FLOT). *IEEE J. Sel. Topics Quantum Electron.* **16**, 755-766 (2010).
- [34] Louie, A.: Multimodality Imaging Probes: Design and Challenges. *Chem. Rev.* **110**, 3146-3195 (2010).
- [35] Nahrendorf, M.; Zhang, H.; Hembrador, S.; Panizzi, P.; Sosnovik, D. E.; Aikawa, E.; Libby, P.; Swirski, F. K.; Weissleder, R.: Nanoparticle PET-CT imaging of macrophages in inflammatory atherosclerosis. *Circulation* **117**, 379-387 (2008).
- [36] Kuil, J.; Velders, A. H.; van Leeuwen, F. W. B.: Multimodal Tumor-Targeting Peptides Functionalized with Both a Radio- and a Fluorescent Label. *Bioconjugate Chem.* **21**, 1709-1719 (2010).
- [37] Mallidi, S.; Luke, G. P.; Emelianov, S.: Photoacoustic imaging in cancer detection, diagnosis, and treatment guidance. *Trends. Biotechnol.* **29**, 213-221 (2011).
- [38] Frangioni, J.: In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 626-634 (2003).
- [39] <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/chemical/watabs.html>
- [40] Bieser, A. *Úvod do moderní fyziky*. Praha, Academia 1975.
- [41] Hrazdira, I.; Kolektiv. *Biofyzika: učebnice pro lékařské fakulty*. Praha, Avicenum 1983.
- [42] https://en.wikipedia.org/wiki/Gamma_ray#/media/File:Al-gamma-xs.svg
- [43] Mikhailik, V. B.; Kraus, H.; Wahl, D.; Itoh, M.; Koike, M.; Bailiff, I. K.: One- and two-photon excited luminescence and band-gap assignment in CaWO₄. *Phys. Rev. B* **69**, 205110 (2004).
- [44] Grasser, R.; Pitt, E.; Scharmann, A.; Zimmerer, G.: Optical Properties of CaWO₄ and CaMoO₄ Crystals in the 4 to 25 eV Region. *Phys. Stat. Sol. (b)* **69**, 359-368 (1975).
- [45] Kamenskikh, I. A.; Kolobanov, V. N.; Mikhailin, V. V.; Potkin, L. I.; Shpinkov, I. N.; Spassky, D. A.; Zadneprovsky, B. I.; Zimmerer, G.: Anisotropy of optical properties of scheelite tungstates in the fundamental absorption region. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res., Sect. A* **470**, 270-273 (2001).

- [46] Fujita, M.; Itoh, M.; Takagi, S.; Shimizu, T.; Fujita, N.: Comparative study of optical spectra and electronic structures of CaMoO_4 and CaWO_4 crystals. *Phys. Stat. Sol. (b)* **243**, 1898-1907 (2006).
- [47] Miyoshi, H.; Imura, H.; Nakamura, M.: Control of emission peaks of X-ray phosphor using dye-silica nanoparticles. *J. Lumin.* **130**, 404-410 (2010).
- [48] Issler, S. L.; Torardi, C. C.: Solid state chemistry and luminescence of X-ray phosphors. *J. Alloys Compd.* **229**, 54-65 (1995).
- [49] Tanaka, K.; Miyajima, T.; Shirai, N.; Zhuang, Quan.; Nakata, R.: Laser photochemical ablation of CdWO_4 studied with the time-of-flight mass spectrometric technique. *J. Appl. Phys.* **77**, 6581-6587 (1995).
- [50] Nikl, M.: Wide Band Gap Scintillation Materials: Progress in the Technology and Material Understanding. *Phys. Stat. Sol. (a)* **178**, 595-620 (2000).
- [51] Nagirnyi, V.; Feldbach, E.; Jönsson, L.; Kirm, M.; Lushchik, A.; Lushchik, Ch.; Nagornaya, L. L.; Ryzhikov, V. D.; Savikhin, F.; Svensson, G.; Tupitsina, I. A.: Excitonic and recombination processes in CaWO_4 and CdWO_4 scintillators under synchrotron irradiation. *Radiat. Meas.* **29**, 247-250 (1998).
- [52] Ryu, J. H.; Bang, S. Y.; Yoon, J.-W.; Lim, Ch. S.; Shim, K. B.: Pulsed laser induced synthesis of scheelite-type colloidal nanoparticles in liquid and the size distribution by nanoparticle tracking analysis. *Appl. Surf. Sci.* **29**, 8408-8414 (2007).
- [53] Šulc, J.; Jelínková, H.; Basiev, T. T.; Doroschenko, M. E.; Ivleva, L. I.; Osiko, V. V.; Zverev, P. G.: $\text{Nd}:\text{SrWO}_4$ and $\text{Nd}:\text{BaWO}_4$ Raman lasers. *Opt. Mater.* **30**, 195-197 (2007).
- [54] Fan, L.; Fan, Y. X.; Duan, Y. H.; Wang, Q.; Wang, H. T.; Jia, G. H.; Tu, C. Y.: Continuous-wave intracavity Raman laser at 1179.5 nm with SrWO_4 Raman crystal in diode-end-pumped $\text{Nd}:\text{YVO}_4$ laser. *Appl. Phys. B* **94**, 553-557 (2009).
- [55] Van Uitert, L. G.; Preziosi, S.: Zinc Tungstates for Microwave Maser Applications. *J. Appl. Phys.* **33**, 2908-2909 (1962).
- [56] Mytsyk, B.; Kost', Y.; Andrushchak, A., Solski, I.: Calcium Tungstate is a Perspective Acousto-Optic Material. Photoelastic Propertie. *Modern Problems of Radio Engineering, Telecommunications and Computer Science (TCSET), 2010 International Conference on*, 341-342 (2010).
- [57] Matsumoto, J.: Vanadate, Molybdate and Tungstate for Orthomolecular Medicine. *J. Med. Hypotheses* **43**, 177-182 (1994).
- [58] Jelikić-Stankov, M.; Uskoković-Marković, S.; Holclajtner-Antunović, I.; Todorović, M.; Djurdjević, P.: Compounds of Mo, V and W in biochemistry and their biomedical activity. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **21**, 8-16 (2007).

- [59] Yang, P.; Quan, Z.; Li, Ch.; Lian, H.; Huang, S.; Lin, J.: Fabrication, characterization of spherical $\text{CaWO}_4:\text{Ln}$ @MCM-41 ($\text{Ln}=\text{Eu}^{3+}$, Dy^{3+} , Sm^{3+} , Er^{3+}) composites and their applications as drug release system. *Micropor. Mesopor. Mat.* **116**, 524-531 (2008).
- [60] Egloff, M.-P.; Cohen, P. T. W.; Rienemer, P.; Barford, D.: Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Human Protein Phosphatase 1 and its Complex with Tungstate. *J. Mol. Biol.* **254**, 942-959 (1995).
- [61] Al-Shahrani, F.; Xiao, T.; Llewellyn, S. A.; Barri, S.; Jiang, Z.; Shi, H.; Martinie, G.; Green, M. L. H.: Desulfurization of diesel via the H_2O_2 oxidation of aromatic sulfides to sulfones using a tungstate catalyst. *Appl. Catal. B: Environ.* **73**, 311-316 (2007).
- [62] Yu, J.; Qi, L.; Cheng, B.; Zhao, X.: Effect of calcination temperatures on microstructures and photocatalytic activity of tungsten trioxide hollow microspheres. *J. Hazard. Mater.* **160**, 621-628 (2008).
- [63] Atkins, P. W.; Overton, T., Rourke, J. P., Weller, M.; Armstrong, F. A. *Shriver & Atkins' Inorganic Chemistry*. 5th ed. Oxford, Oxford University Press 2010.
- [64] Li, Y.; Wang, Z.; Sun, L.; Wang, Z.; Wang, S.; Liu, X.; Wang, Y.: Investigation of oxygen vacancy and photoluminescence in calcium tungstate nanophosphors with different particle sizes. *Mater. Res. Bull.* **50**, 36-41 (2014).
- [65] Senyshyn, A.; Hoelzel, M.; Hansen, T.; Vasylechko, L.; Mikhailik, V.; Kraus, H.; Ehrenberg, H.: Thermal structural properties of calcium tungstate. *J. Appl. Crystallogr.* **44**, 319-326 (2011).
- [66] Hu, W.; Tong, W.; Li, L.; Zheng, J.; Li, G.: Cation non-stoichiometry in multi-component oxide nanoparticles by solution chemistry: a case study on CaWO_4 for tailored structural properties.. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 11634-11643 (2011).
- [67] Cavalcante, L. S.; Sczancoski, J. C.; Espinosa, J. W. M.; Varela, J. A.; Pizani, P. S.; Longo, E.: Photoluminescent behavior of BaWO_4 powders processed in microwave-hydrothermal. *J. Alloy. Compd.* **474**, 195-200 (2009).
- [68] Thirumalaisamy, T. K.; Saravanan, R.: Charge density in MoO_4 tetrahedron and PbO_8 octahedron in PbMoO_4 . *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* **22**, 1637-1648 (2011).
- [69] Cavalcante, L. S.; Sczancoski, J. C.; Albarici, V. C.; Matos, J. M. E.; Varela, J. A.; Longo, E.: Synthesis, characterization, structural refinement and optical absorption behavior of PbWO_4 powders. *Mater. Sci. Eng., B-Solid* **150**, 18-25 (2008).
- [70] Xiong, Y.; Wang, B.; Zhuang, H.; Jiang, X.; Ma, G.; Yi, Y.; Hu, W.; Zhou, Y.: Doping-induced evolutions of PbWO_4 mesocrystals and their optical properties. *RSC Adv.* **4**, 36738-36741 (2014).
- [71] Longo, V. M.; Cavalcante, L. S.; Paris, E. C.; Sczancoski, J. C.; Pizani, P. S.; Li, M. S.; Andrés, J.; Longo, E.; Varela, J.: Hierarchical Assembly of CaMoO_4 Nano-Octahedrons and Their Photoluminescence Properties. *J. Phys. Chem. C* **115**, 5207-5219 (2011).

- [72] Longo, V. M.; de Figueiredo, A. T.; Campos, A. B.; Espinosa, J. W. M.; Hernandes, A. C.; Taft, C. A.; Sambrano, J. R.; Varela, J. A.; Longo, E.: Different origins of green-light photoluminescence emission in structurally ordered and disordered powders of calcium molybdate. *J. Phys. Chem. A* **112**, 8920-8928 (2008).
- [73] Sczancoski, J. C.; Cavalcante, L. S.; Marana, N. L.; da Silva, R. O.; Tranquilin, R. L.; Joya, M. R.; Pizani, P. S.; Varela, J. A.; Sambrano, J. R.; Li, M. S.; Longo, E.; Andrés, J.: Different origins of green-light photoluminescence emission in structurally ordered and disordered powders of calcium molybdate. *Curr. Appl. Phys.* **10**, 614-624 (2010).
- [74] Cavalcante, L. S.; Longo, V. M.; Sczancoski, J. C.; Almeida, M. A. P.; Batista, A. A.; Varela, J. A.; Orlandi, M. O.; Longo, E.; Li, M. S.: Electronic structure, growth mechanism and photoluminescence of CaWO_4 crystals. *CrystEngComm*. **14**, 853-868 (2012).
- [75] Grasser, R.; Scharmann, A.: Luminescent sites in CaWO_4 and $\text{CaWO}_4 : \text{Pb}$ crystals. *J. Lumin.* **12-13**, 473-478 (1976).
- [76] Zhang, Y.; Holzwarth, N. A. W.; Williams, R. T.: Electronic band structures of the scheelite materials CaMoO_4 , CaWO_4 , PbMoO_4 , and PbWO_4 . *Phys. Rev. B* **57**, 12738-12750 (1998).
- [77] Van Deun, R.; Ndagsi, D.; Liu, J.; Van Driessche, I.; Van Hecke, K.; Kaczmarek, A. M.: Dopant and excitation wavelength dependent color-tunable white light-emitting $\text{Ln}^{3+} : \text{Y}_2\text{WO}_6$ materials ($\text{Ln}^{3+} = \text{Sm}, \text{Eu}, \text{Tb}, \text{Dy}$). *Dalton Trans.* **44**, 15022-15030 (2015).
- [78] Grobelna, B.; Lipowska, B.; Klonkowski, A. M.: Energy transfer in calcium tungstate doped with Eu(III) or Tb(III) ions incorporated into silica xerogel. *J. Alloys Compd.* **419**, 191-196 (2006).
- [79] Spassky, D.; Mikhailin, V.; Nazarov, M.; Ahmad-Fauzi, M. N.; Zhbanov, A.: Luminescence and energy transfer mechanisms in CaWO_4 single crystals. *J. Lumin.* **132**, 2753-2762 (2012).
- [80] Wang, W.; Yang, P.; Cheng, Z.; Hou, Z.; Li, C.; Lin, J.: Patterning of Red, Green, and Blue Luminescent Films Based on $\text{CaWO}_4:\text{Eu}^{3+}$, $\text{CaWO}_4:\text{Tb}^{3+}$, and CaWO_4 Phosphors via Microcontact Printing Route. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **3**, 3921-3928 (2011).
- [81] Jia, P. Y.; Liu, X. M.; Li, G. Z.; Yu, M.; Fang, J.; Lin, J.: Sol-gel synthesis and characterization of $\text{SiO}_2 @ \text{CaWO}_4$, $\text{SiO}_2 @ \text{CaWO}_4 : \text{Eu}^{3+} / \text{Tb}^{3+}$ core-shell structured spherical particles. *Nanotechnology* **17**, 334-742 (2006).
- [82] Bünzli, J.-C. G.; Piguet, C.: Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 1048-1077 (2005).
- [83] Sharma, K. G.; Singh, N. R.: Re-dispersible $\text{CaWO}_4:\text{Tb}^{3+}$ nanoparticles: Synthesis, characterization and photoluminescence studies. *J. Lumin.* **139**, 98-103 (2013).
- [84] Sharma, K. G.; Singh, N. R.: Synthesis of $\text{CaWO}_4:\text{Eu}^{3+}$ phosphor powders via ethylene glycol route and its optical properties. *J. Rare Earth* **30**, 310-314 (2012).

- [85] Kaczmarek, A. M.; Liu, Y.-Y.; Van Der Voort, P.; Van Deun, R.: Tuning the architecture and properties of microstructured yttrium tungstate oxide hydroxide and lanthanum tungstate. *Dalton Trans.* **42**, 5471-5479 (2013).
- [86] Huang, S.; Zhang, X.; Wang, L.; Bai, L.; Xu, J.; Li, Ch.; Yang, P.: Controllable synthesis and tunable luminescence properties of $Y_2(WO_4)_3:Ln^{3+}$ (Ln = Eu, Yb/Er, Yb/Tm and Yb/Ho) 3D hierarchical architectures. *Dalton Trans.* **41**, 5634-5642 (2012).
- [87] Ambast, A. K.; Kunti, A. K.; Som, S.; Sharma, S. K.: Near-white-emitting phosphors based on tungstate for phosphor-converted light-emitting diodes. *Appl. Opt.* **52**, 8424-8431 (2013).
- [88] Sharma, K. G.; Singh, N. S.; Devi, Y. R. Singh, N. R.; Singh, Sh. D.: Effects of annealing on luminescence of $CaWO_4:Eu^{3+}$ nanoparticles and its thermoluminescence study. *J. Alloys Compd.* **556**, 94-101 (2013).
- [89] Chen, S.-J.; Li, J.; Chen, X. T.; Hong, J.-M.; Xue, Z.; You, X.-Z.: Solvothermal synthesis and characterization of crystalline $CaWO_4$ nanoparticles. *J. Cryst. Growth* **253**, 361-365 (2003).
- [90] Su, Y.; Li, G.; Xue, Y.; Li, L.: Tunable Physical Properties of $CaWO_4$ Nanocrystals via Particle Size Control. *J. Phys. Chem. C* **111**, 6684-6689 (2007).
- [91] Kahruman, C.; Yusufoglu, I.: Leaching kinetics of synthetic $CaWO_4$ in HCl solutions containing H_3PO_4 as chelating agent. *Hydrometallurgy* **81**, 182-189 (2006).
- [92] Matulová, M.; Verchère, J.-F.; Chapelle, S.: Furanose vs. acyclic forms of carbohydrate ligands. A multinuclear NMR spectroscopy study of the molybdate and tungstate complexes of D-glycero-L-manno-heptose. *Carbohydr. Res.* **287**, 37-48 (1996).
- [93] Geraldès, C. F. G. C.; Castro, M. M. C. A.; Saraiva, M. E.; Aureliano, M.; Dias, B. A.: Interaction of monosaccharides and related compounds with oxocations of Mo(VI), W(VI) and U(VI) studied by NMR spectroscopy. *J. Coord. Chem.* **17**, 205-219 (1988).
- [94] Chapelle, S.; Sauvage, J.-P.; Verchère, J.-F.: ^{183}W NMR Studies of Tungstate Complexes of Carbohydrates. 2. Competitive Formation of *erythro* and *threo* Complexes of Alditols. Characterization of a Novel Bis-Dinuclear Complex Formed with Perseitol. *Inorg. Chem.* **33**, 1966-1971 (1994).
- [95] Chapelle, S.; Sauvage, J.-P.; Koell, P.; Verchère, J.-F.: ^{183}W NMR Studies of Tungstate Complexes of Carbohydrates. 2. Species Formed with All-*threo* Alditols Acting as Tridentate, Tetradentate, or Pentadentate Ligands. *Inorg. Chem.* **34**, 918-923 (1995).
- [96] Chapelle, S.; Verchère, J.-F.: Tungstate complexes of aldoses and ketoses of the *lyxo* series. Multinuclear NMR evidence for chelation by one or two oxygen atoms borne by the side chain of the furanose ring. *Carbohydr. Res.* **277**, 39-50 (1995).
- [97] Ramos, M. L.; Gil, V. M. S.: Multinuclear NMR study of the complexes of 6-phospho-D-gluconic acid with W(VI) and Mo(VI). *Carbohydr. Res.* **339**, 2225-2232 (2004).

- [98] Hlaibi, M.; Hor, M.; Riri, M.; Benjjar, A.; Verchère, J.-F.: Multinuclear ^{183}W and ^{13}C NMR and indirect photometry study for the identification and the characterization of new complexes of sugar acids. *J. Mol.* **920**, 310-322 (2009).
- [99] Ramos, M. L.; Justino, L. L. G.; Gil, V. M. S.; Burrows, H. D.: NMR and DFT studies of the complexation of W(VI) and Mo(VI) with 3-phospho-D-glyceric and 2-phospho-D-glyceric acids. *Dalton Trans.* **43**, 9616-9624 (2009).
- [100] Hrubý, M.; Kučka, J.; Kozempel, J.; Lebeda, O.: Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy* **100**, 10-16 (2006).
- [101] Ashwell, G.; Morell, A. G.: The Role of Surface Carbohydrates in the Hepatic Recognition and Transport of Circulating Glycoproteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol* **41**, 99-128 (1974).
- [102] Drickamer, K.: Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* **263**, 9557-9560 (1988).
- [103] Drickamer, K.: Ca^{2+} -dependent sugar recognition by animal lectins. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 146-150 (1996).
- [104] Ashwell, G.; Harford, J.: Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 531-554 (1982).
- [105] Reimer, L.; Kohl, H. *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation*. 5th ed. New York, Springer 2008.
- [106] Egerton, R. Y. *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM and AEM*. 2nd ed. Edmonton, Springer 2005.
- [107] Leng, Y. *Materials characterization: introduction to microscopic and spectroscopic methods*. 2nd ed. Singapore, Wiley 2013.
- [108] Murphy, G. E.; Jensen, G. Y.: Electron cryotomography. *BioTechniques* **43**, 413-420 (2007).
- [109] Williams, D. B.; Carter, C. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. 2nd ed. New York, Springer 2008.
- [110] Pánek, J. *Polymeric nanoparticles stabilised by surfactants*. Praha, 2010. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie.
- [111] Arzenšek, D. *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*. http://www-fl.ijs.si/~rudi/sola/Dynamic_light_scattering_and_application_to_proteins_in_solutions.pdf.
- [112] Sun, S. F. *Physical chemistry of macromolecules*. 2nd ed. New York, Wiley 2004.
- [113] Jenkins, R.; Snyder, R. L.: Introduction to X-ray Powder Diffractometry. In: *Chemical Analysis: A series of Monographs on Analytical Chemistry and its Application*. J. D. Winefordner (Ed.). New York, Wiley 1996.

- [114] Mark, J. E.: Methods of X-ray and Neutron Scattering in Polymer Science. In: *Topics in Polymer Science: A Series of Advanced Textbooks and Monographs*. K. Binder (Ed.). New York, Oxford University Press 2000.
- [115] Glatter, O.; Kratky, O. *Small Angle X-ray Scattering*. London, Academic Press 1982.
- [116] Feigin, L. A.; Svergun, D. I. *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. New York, Springer Science+Business Media 1987.
- [117] Nwaneshiudu, A.; Kuschal, Ch.; Sakamoto, F. H.; Anderson, R. R.; Schwarzenberger, K.; Young, R. C.: Ca²⁺-dependent sugar recognition by animal lectins. *J. Invest. Dermatol.* **132**, e3 (2012).
- [118] Ishikawa-Ankerhold, H. C.; Ankerhold, R.; Drummen, G. P. C.: Advanced fluorescence microscopy techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules.* **17**, 4047–4132 (2012).
- [119] ImageJ
- [120] Mickens, M.; Assefa, Z.; Kumar, D.: Tunable white light-emission of a CaW_{1-x}MoO₄:Tm³⁺, Tb³⁺, Eu³⁺ phosphor prepared by a Pechini sol-gel method. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **63**, 153–161 (2012).
- [121] <http://www.crystallography.net>
- [122] <https://en.wikipedia.org/wiki/HEPES>
- [123] <http://www.google.com/patents/WO2012159972A1?cl=en>