

# NANOVIR – Nanočastice pre riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19

*Recenzovaný zborník príspevkov z  
vedeckej konferencie NANOVIR*

20. Jún 2023, Košice

EURÓPSKA ÚNIA  
EURÓPSKY FOND  
REGIONÁLNEHO ROZVOJA



# NANOVIR

Adriana ZELENÁKOVÁ  
Jozef BEDNARČÍK

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach  
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA  
Košice 2023



## **NANOVIR – Nanočastice pre riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19**

*Recenzovaný zborník príspevkov z vedeckej konferencie NANOVIR*

### **Editori:**

doc. RNDr. Adriana Zelenáková, PhD.

RNDr. Jozef Bednarčík, PhD.

*Ústav fyzikálnych vied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice, adriana.zelenakova@upjs.sk, jozef.bednarcik@upjs.sk*

### **Recenzenti:**

prof. Ing. Štefan Vilček, DrSc.

*Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, stefan.vilcek@uvlf.sk*

Ing. Jaroslava Szücssová, PhD.

*Ústav fyzikálnych vied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice, jaroslava.szucsova@upjs.sk*

doc. RNDr. Miroslav Almáši, PhD.

*Ústav chemických vied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice, miroslav.almasi@upjs.sk*

doc. Mgr. Iryna Antal, PhD.

*Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.v.i., Watsonova 47, 040 01 Košice, iryna.antal@saske.sk*

RNDr. Vlasta Závišová, PhD.

*Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.v.i., Watsonova 47, 040 01 Košice, zavisova@saske.sk*



Tento text je publikovaný pod licenciou Creative Commons 4.0 - CC BY NC ND („Uved'te pôvod – Nepoužívajte komerčne – Nespracováajte“).

Za odbornú a jazykovú stránku tejto publikácie zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov. Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Dostupné na: [www.unibook.upjs.sk](http://www.unibook.upjs.sk)

Dátum vydania: 13.7.2023

ISBN 978-80-574-0232-9 (tlačená verzia)

ISBN 978-80-574-0233-6 (e-publikácia)

## Konferencia NANO VIR

Hlavným cieľom vedeckej konferencie NANO VIR bola prezentácia vedeckých výsledkov, získaných počas riešenia projektu *NANO VIR – Nanočastice pre riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19*, spolufinancovaného z Európskeho Fondu Regionálneho Rozvoja v Operačnom Programe Integrovaná Infraštruktúra 2014 – 2020, ITMS: 313011AUW7. Projekt bol riešený v období 1.1.2021 – 30.6.2023 a bol podporený sumou 1 916 004,79 EUR. Spolupodielali sa na ňom tri spoluriešiteľské organizácie: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach ako hlavný riešiteľ, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach ako partner č. 1 a Ústav experimentálnej fyziky Slovenskej akadémie vied ako partner č. 2.

## Ciele

Na konferencii boli prezentované poznatky z oblasti výskumu a vývoja nanomateriálov. Hlavnou témou bola príprava magnetických nanočastíc pre riešenie diagnosticko-terapeutických problémov vírusových ochorení, charakterizácia rôznych fyzikálno-chemických vlastností, štruktúrnych vlastností, magnetických vlastností, biologických vlastností.

## Tématické okruhy

- Magnetické nanočastice
- Štruktúra nanomateriálov
- Fyzikálno-chemická charakterizácia nanomateriálov
- Magnetická separácia
- Cytotoxicita nanomateriálov
- Interakcia nanomateriálov s RNA
- Využitie magnetických nanočastíc pre diagnostiku vírusových chorôb
- Využitie magnetických nanočastíc k terapeutickým účelom

## Miesto konania konferencie

Budova PROMATECH – seminárna miestnosť na poschodí, Watsonova 47, 040 01 Košice.

## Organizátori

Konferencia NANO VIR spoločne organizovaná inštitúciami participujúcimi na riešení projektu:

- Prírodovedecká fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Šrobárová 2, 041 54 Košice
- Ústav experimentálnej fyziky v.v.i. Slovenskej akadémie vied, Watsonova 47, 040 01 Košice
- Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 041 81 Košice



**EURÓPSKA ÚNIA**  
**EURÓPSKY FOND**  
**REGIONÁLNEHO ROZVOJA**



## Odborní garanti

---

<b>doc. RNDr. A. Zeleňáková, PhD.</b>	Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Ústav fyzikálnych vied
<b>prof. RNDr. V. Zeleňák, DrSc.</b>	Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Ústav chemických vied
<b>Ing. M. Koneracká, CSc.</b>	Ústav experimentálnej fyziky v.v.i., Košice Slovenská akadémia vied
<b>prof. Ing. Š. Vilček, DrSc.</b>	Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach

## Programový výbor

---

<b>RNDr. J. Bednarčík, PhD.</b>	Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Ústav fyzikálnych vied
<b>doc. RNDr. M. Almáši, PhD.</b>	Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Ústav chemických vied
<b>RNDr. A. A. Matiašová, PhD.</b>	Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Ústav biologických vied
<b>RNDr. J. Košuth, PhD.</b>	Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Ústav biologických vied
<b>doc. MVDr. A. Jacková, PhD.</b>	Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach

## Organizačný výbor

---

<b>Ing. J. Szücsová, PhD.</b>	Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Ústav fyzikálnych vied
<b>Ing. V. Zavišová, PhD.</b>	Ústav experimentálnej fyziky v.v.i., Košice Slovenská akadémia vied
<b>RNDr. L. Nagy</b>	Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Ústav fyzikálnych vied
<b>Mgr. M. Barutiak</b>	Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Ústav fyzikálnych vied

## Príhovor

Vážení kolegovia, spoluriešitelia projektu,

hlavným cieľom vedeckej konferencie NANO VIR je prezentácia vedeckých výsledkov, získaných počas riešenia projektu *NANO VIR – Nanočastice pre riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19*, financovaného z Európskeho Fondu Regionálneho Rozvoja v Operačnom Programe Integrovaná Infraštruktúra 2014 – 2020, ITMS: 313011AUW7. Projekt bol riešený v období 1.1.2021 – 30.6.2023 a bol podporený sumou 1 916 004,79 EUR. Spolupodielali sa na ňom tri spoluriešiteľské organizácie: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach ako hlavný riešiteľ, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach ako partner č. 1 a Ústav experimentálnej fyziky Slovenskej akadémie vied ako partner č. 2.

Cieľom projektu NANO VIR bolo: a) skvalitniť laboratórnu diagnostiku využitím nových variácií silikou obalených magnetických nanočastíc na izoláciu vírusovej RNA s následnou detekciou metódou RT-qPCR spolu s efektívnou kontrolou kvality sterov a b) preskúmať potenciál antivírusovej terapie a perspektívy podávania antivirov s využitím biokompatibilných systémov na podávanie liečiv s predĺženým účinkom na báze SiO<sub>2</sub> nanočastíc pre účinnejšiu diagnostiku a terapiu ochorenia COVID-19. Projekt rozšíril výskumnú a inovačnú infraštruktúru a kapacity na rozvoj excelentnej vedy a prispel k hospodárskemu rastu v RIS3 špecializácii Zdravie obyvateľstva a zdravotnícke technológie.

Počas riešenia projektu vznikol unikátny interdisciplinárny vedecko-výskumný tím, ktorý je svojou špecializáciou jedinečný v rámci Slovenska. Riešenie projektu otvorilo priestor aj pre nové vedecké výzvy, riešením ktorých by sme radi pokračovali ďalej, aj po skončení projektu. Za mňa ako zodpovedného riešiteľa musím konštatovať, že bolo pre mňa nesmiernou čťou koordinovať vedecké úlohy a ciele počas doby riešenia projektu. Konferencia NANO VIR, na základe ktorej vznikol tento recenzovaný zborník pozvaných a prezentovaných príspevkov, bola jedinečným nástrojom pre sumarizáciu dosiahnutých vedeckých výsledkov počas samotného riešenia projektu NANO VIR.

Záverom mi dovoľte vysloviť veľké poďakovanie všetkým, ktorí prispeli k dosiahnutiu vytýčených cieľov a tak sa pričínili o úspešné zavŕšenie nášho spoločného projektu!

Košice, 20. júna 2023

*Adriana Zeleňáková*

# Obsah

<b>Konferencia NANO VIR</b>	<b>i</b>
Organizátori . . . . .	ii
Garanti a organizačné výbory . . . . .	iii
Príhovor . . . . .	iv
<b>Obsah</b>	<b>1</b>
<b>Program konferencie</b>	<b>4</b>
Utorok, 20. júna 2023 . . . . .	4
<b>I Predstavenie riešiteľov projektu NANO VIR</b>	<b>5</b>
Predstavenie riešiteľských pracovísk . . . . .	7
<i>Prírodovedecká fakulta Univerzity P.J. Šafárika v Košiciach</i> . . . . .	7
<i>Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie</i> . . . . .	9
<i>Ústav experimentálnej fyziky Slovenskej akadémie vied</i> . . . . .	10
Predstavenie vedúcich osobností . . . . .	11
<i>doc. RNDr. Adriana Zeleňáková, PhD.</i> . . . . .	11
<i>prof. RNDr. Vladimír Zeleňák, DrSc.</i> . . . . .	12
<i>RNDr. Jozef Bednarčík, PhD.</i> . . . . .	13
<i>RNDr. Ján Košuth, PhD.</i> . . . . .	14
<i>doc. RNDr. Juraj Ševc, PhD.</i> . . . . .	15
<i>doc. RNDr. Zuzana Gažová, DrSc.</i> . . . . .	16
<i>RNDr. Martina Koneracká, CSc.</i> . . . . .	17
<i>Ing. Vlasta Závášová, PhD.</i> . . . . .	18
<i>prof. Ing. Štefan Vilček, DrSc.</i> . . . . .	19
<i>Mgr. Marieta Cvengrošová</i> . . . . .	20

<b>II Pozvaná plenárna prednáška</b>	<b>21</b>
I-01 Aký je pôvod SARS-CoV-2: Prírodný alebo umelý? . . . . .	23
<b>III Pozvané prednášky</b>	<b>27</b>
I-02 Modelovanie magnetických vlastností nanočastíc Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> . . . . .	29
I-03 Príprava magnetických nanočastíc a ich značenie rádionuklidmi pre potenciálne teranostické použitie . . . . .	32
I-04 Nanopórovitá silika ako nosič liečiva . . . . .	36
I-05 Identifikácia SiO <sub>2</sub> @MNPs nanočastíc pre efektívnu magnetickú separáciu RNA . . . . .	40
I-06 Využitie experimentálnych magnetických nanočastíc NANOVIR na izoláciu vírusovej RNA z biologických vzoriek . . . . .	45
I-07 Analýza biokompatibility magnetických nanočastíc Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> s <i>in vitro</i> modelom pľúcneho karcinómu A549 . . . . .	50
I-08 Izolácia vírusovej RNA využitím modifikovaných magnetických nanopartikul . . . . .	56
<b>IV Prihlásené prednášky</b>	<b>61</b>
C-01 Určovanie štruktúry látok pomocou práškovej RTG difrakcie . . . . .	63
C-02 Syntéza core-shell magnetických nanočastíc Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> s rôznymi typmi obalov pre diagnosticko-terapeutické aplikácie . . . . .	68
C-03 Porovnanie morfológických a magnetických vlastností nanočastíc Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> obalených organickými ligandmi . . . . .	72
C-04 Zlepšenie akustického prostredia v laboratóriu SLTEM . . . . .	77
C-05 Selektia fluorescenčne značených magnetických nanočastíc Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> pre <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> analýzy . . . . .	81
<b>V Prezentované príspevky</b>	<b>87</b>
P-01 Štúdium morfológie magnetických nanočastíc pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie . . . . .	89
P-02 Experimentálne štúdium magnetických nanočastíc pre magnetickú separáciu DNA/RNA . . . . .	93
P-03 Termosenzitívny systém SBA-15-PEI na riadené uvoľňovanie nesteroidného protizápalového liečiva . . . . .	99
P-04 Príprava a charakterizácia magnetických nanočastíc modifikovaných poly-L-lyzínom . . . . .	104
P-05 Atómová silová mikroskopia – charakterizácia morfológických vlastností Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> nanočastíc . . . . .	108
P-06 Štúdium textúrnych vlastností nanočastíc Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> obalených pórovitou vrstvou oxidu kremičitého . . . . .	112



<b>P-07</b> Štúdium metalo–organických sietí obsahujúcich fluorované ligandy	116
<b>P-08</b> Adsorpcia a riadené uvoľňovanie liečiva zo systému Naproxén-SBA-15: vplyv povrchovej polariry, formy liečiva (kyseliny/sodnej soli) a pH prostredia	121
<b>P-09</b> Histidínom povrchovo modifikovaný materiál UiO-66 ako nosič liečiva	126
<b>P-10</b> Magnetické nanočastice obalené chitosanom pre účinnú magnetickú hypertermiu	130
<b>P-11</b> Testovanie modifikovaných magnetických nanopartikul na izoláciu RNA	135
<b>P-12</b> Testovanie experimentálnych magnetických nanočastíc NANOVIR na izoláciu RNA SARS-CoV-2 zo sterov z nosohltanu	139
<b>P-13</b> Syntéza a charakterizácia magnetických nanočastíc obalených oxidom kremičitým	144
<b>Register autorov</b>	<b>149</b>

## Program konferencie NANOVIR

Utorok, 20. júna 2023

08:00–09:00	<b>Registrácia účastníkov</b>		
09:00–09:20		<b>A. Zeleňáková</b> <b>M. Kireš</b>	<b>Otvorenie konferencie</b>
09:20–09:50	I-01	<b>Š. Vilček</b> UVLF	Aký je pôvod SARS-CoV-2: Prírodný alebo umelý?
09:50–10:10	I-02	<b>A. Zeleňáková</b> UPJŠ	Magnetické a štruktúrne vlastnosti povrchovo modifikovaných častíc
10:10–10:30	I-03	<b>M. Kubovčíková</b> UEF SAV	Príprava magnetických nanočastíc a ich značenie rádionuklidmi
10:30–10:50	I-04	<b>V. Zeleňák</b> UPJŠ	Nanopórovitá silika ako nosič liečiva
10:50–11:10	<b>Prestávka na kávu</b>		
11:10–11:30	I-05	<b>A. Antošová</b> UEF SAV	Štúdium SiO <sub>2</sub> @MNPs nanočastíc na magnetickú separáciu
11:30–11:50	I-06	<b>J. Košuth</b> UPJŠ	Využitie nanočastíc na izoláciu vírusovej RNA
11:50–12:10	I-07	<b>J. Švec</b> UPJŠ	Biokompatibilita Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> s in vitro modelom pľúcneho karcinómu
12:10–12:30	I-08	<b>A. Jacková</b> UVLF	Testovanie modifikovaných MNPs pri izolácii vírusovej RNA
12:30–13:40	<b>Obed</b>		
13:40–13:55	C-01	<b>J. Bednarčík</b> UPJŠ	Určovanie štruktúry látok pomocou práškovej RTG difrakcie
13:55–14:10	C-02	<b>E. Beňová</b> UPJŠ	Príprava Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> MNPs obalených organickými ligandami
14:10–14:25	C-03	<b>J. Szücssová</b> UPJŠ	Morfológia a magnetické vlastnosti Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> MNPs obalených organickými ligandami
14:25–14:40	C-04	<b>V. Girman</b> UPJŠ	Štúdium štruktúry pomocou TEM mikroskopie
14:40–14:55	C-05	<b>A.A. Matiašová</b> UPJŠ	Selekcia fluorescenčne značených Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> MNPs pre in vitro a in vivo analýzy
14:55–15:00	<b>Záver konferencie</b>		

**Časť I**

**Predstavenie riešiteľov projektu  
NANOVIR**





## PF UPJŠ

Prírodovedecká fakulta  
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach  
Šrobárova 2  
041 54 Košice

[www.upjs.sk/prirodovedecka-fakulta/](http://www.upjs.sk/prirodovedecka-fakulta/)

*Žiadateľ projektu NANO VIR.*

**U**NIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH je nositeľom vedeckého parku „Medicínsky univerzitný vedecký park v Košiciach (MediPark, Košice) ITMS: 26220220185 a partnerom v projekte Výskumného centra PROMATECH ITMS: 26220220186, podporeného z OP Výskum a vývoj. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach patrí k významným a uznávaným vzdelávacím a vedeckým ustanovizniám nielen na Slovensku, ale aj vo vyspelej Európe. Vznikla v roku 1959 a je tak druhou najstaršou klasickou univerzitou na území Slovenskej republiky. Tvoria ju päť fakúlt: lekárska, prírodovedecká, právnická, fakulta verejnej správy a filozofická fakulta.

Hlavným poslaním UPJŠ je poskytovať trojstupňové vysokoškolské vzdelávanie na základe najnovších vedeckých poznatkov podľa európskych trendov v tejto oblasti, Boloňskej deklarácie a ďalších dokumentov. UPJŠ poskytuje služby verejnosti šírením poznania prostredníctvom výskumu a vývoja, podporou regionálnych a národných aktivít a umožnením ďalšieho vzdelávania občanov. V oblasti vedy, výskumu a inovácií je dlhodobým zámerom univerzity diferencovať originálne prístupy vo vedeckovýskumnej činnosti od rutinných postupov a systémovo podporovať už etablované špičkové vedecko-výskumné tímy. UPJŠ podporuje vznik a rozvoj medzifakultných (t.j. celouniverzitných) vedeckých a vývojových tímov, ktoré sa začali formovať na báze centier excelentnosti, ale aj mimo nich. Tieto vedecké tímy, organizované výraznými vedeckými osobnosťami, prekračujú hranice ústavov, fakúlt ako aj samotnej univerzity a prioritou pri ich kreovaní je potreba komplexného riešenia študovanej problematiky a kompetentnosť riešiteľov. S cieľom internacionalizácie výskumu bude univerzita aj naďalej stimulovať najmä mladých zamestnancov, aby absolvovali zahraničné pobyty a stáže na špičkových zahraničných univerzitách a vedeckých pracoviskách s tým, aby po návrate odovzdávali svoje skúsenosti a prispeli k zvýšeniu úrovne výskumu na Alma mater. V neposlednom rade je cieľom univerzity rozvíjať a naďalej obnovovať technické zabezpečenie vedeckého výskumu.

Popredné postavenie Univerzity v Slovenskej republike potvrdili aj dve nezávislé medzinárodné hodnotenia. V najnovšom rebríčku URAP (University Ranking by Academic Performance) 2017–2018, založenom na základe výkonov vo vede evidovaných v databáze Web of Science (WoS) sa Univerzita dostala do skupiny naj-

lepších 500 európskych univerzít (434. miesto) a patrí jej 2. miesto v SR po UK. Žiadateľ reprezentovaný výskumnými tímami z Prírodovedeckej fakulty UPJŠ patrí vo výskumnej problematike v oblasti inteligentnej špecializácie RIS3 „materiálový výskum a nanotechnológie“ medzi renomované tímy vo svetovej vedeckej komunite. Kvalitu výskumnej práce žiadateľa ocenila aj Akreditačná komisia SR udelením titulu špičkový vedeckým tím TRIANGEL a QMAGNA. Členovia tímu predstavujú výrazné vedecké osobnosti a pravidelne publikujúci svoje výsledky v renomovaných zahraničných časopisoch s vysokým impaktovým faktorom, na ich práce je v súčasnosti zaznamenaných niekoľko tisíc SCI citácií. O výsledkoch svojej práce prednášali formou pozvaných prednášok na svetových sympóziách v Európe a zámorí. Tím má rozsiahle skúsenosti s interdisciplinárnym výskumom, zapája sa do vedeckých aktivít vo svete formou medzinárodných projektov. Vedeckou školou vytvorenou tímom prešlo množstvo doktorandov, ktorí našli uplatnenie doma a v zahraničí. Riešiteľská organizácia Prírodovedecká fakulta UPJŠ je v projekte NANOVIR zastúpená komplementárnymi ústavmi a to Ústavom chemických vied, Ústavom fyzikálnych vied a Ústavom biologických a ekologických vied, ktoré spolu s partnerskými inštitúciami Univerzitou veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústavom experimentálnej fyziky SAV v Košiciach vytvárajú unikátne spojenie v rámci interdisciplinárnej spolupráce. Jednotlivé ústavy majú jasne a presne definované kompetencie. Katedra anorganickej chémie na Ústave chemických vied (UCHV), ktorá je žiadateľom, je pracovisko s dlhodobou tradíciou v oblasti prípravy a štruktúrnej charakterizácie komplexných a inkluzívnych zlúčenín, pričom od roku 2004 sa súčasne rozvíja aj problematika prípravy a štúdia unikátnych pórovitých materiálov na báze SiO<sub>2</sub> ako aj na báze MOF (metal organic framework). Aktuálna vedecká infraštruktúra, dostupná na Katedre anorganickej chémie, ako aj vedecké výstupy dokazujú, že katedra je špičkové moderné pracovisko s medzinárodnou akceptáciou v oblasti prípravy a charakterizácie pokrokových nanomateriálov pre významné technologické aplikácie. Na riešení projektu sa budú spolupodieľať aj pracovníci Katedry fyziky kondenzovaných látok a Katedry bunkovej biológie PF UPJŠ. Spoluriešiteľské pracovisko na Ústave fyzikálnych vied (UFV) má v riešení projektu nezastupiteľnú úlohu charakterizácie a analýzy fyzikálnej podstaty a vlastností nových typov nosičov liečiv. Metodológia počíta s experimentálnymi zariadeniami ako napr. zariadenie na výskum magnetických vlastností MPMS na báze SQUID-u. Merané experimentálne závislosti v DC magnetických poliach (teplotná a pol'ová závislosť magnetizácie v intervale teplôt 1.8 - 400 K a polí do 5 T) a v AC poliach budú následne analyzované v kontexte teoretických modelov pre superparamagnetické neinteragujúce a magneticky interagujúce častice. Nezastupiteľnú úlohu pri riešení projektu majú spoluriešitelia z Katedry Bunkovej biológie Ústavu biologických a ekologických vied (ÚBEV) PF UPJŠ, ktorí budú testovať účinnosť väzby navrhnutých nanomateriálov pri extrakcii nukleových kyselín a kde sa bude realizovať testovanie pripravených nosičov v *in vitro* podmienkach na modeli bunkovej kultúry a *in vivo* testovanie pripravených nosičov liečiv na experimentálnych zvieratách.



## KEPOSZ UVLF

Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie  
Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany  
spoločného zdravia  
Komenského 73  
041 81 Košice  
[www.uvlf.sk/](http://www.uvlf.sk/)

*Partner č.1 projektu NANOVIR.*

**U**NIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE je jediná univerzita svojho druhu na Slovensku. Pri riešení vedeckých problémov sa okrem iného koncentruje aj na infekčné choroby zvierat, vrátane zoonóz, teda chorôb spoločných pre ľudí a zvieratá. Na Katedre epizootológie, parazitológie a ochrany verejného zdravia UVLF je výskum orientovaný na vírusové choroby zvierat, napr. pestivírusové choroby, vírusové infekcie respiračného traktu a enterálne infekcie ošipáných ako aj besnota a hepatitída E. Projekty sú zamerané na vývoj molekulovo-genetických testov na detekciu vírusov, analýzu vírusových genómov, molekulovú epizootológiu. Členovia katedry sú členmi centra excelentnosti INFECTZOON a špičkového tímu LACTOVIR, oba zamerané na štúdium vírusových chorôb zvierat. V oblasti štúdia živočíšnych vírusov dosiahli medzinárodné priority. Z viacerých spomeňme vývoj univerzálneho RT-PCR testu na detekciu klasických pestivírusov, ktorý je široko využívaný v laboratóriách na celom svete. Metóda genetickej typizácie vírusu BVDV sa využíva ako medzinárodný štandard pri genetickej typizácii tohto vírusu. Objav pestivírusu E prispel k hlbšiemu poznaniu evolúcie pestivírusov. Genetická typizácia a charakterizácia enterálnych vírusov ošipáných na Slovensku vyplňuje biele miesta na epizootologickej mape Slovenska. Viaceré výsledky výskumu našli uplatnenie v spoločenskej praxi, napr. analýzy molekulovej epizootológie pestivírusových nákaz, vývoj vakcíny proti besnote a iné. Uvedená katedra má všetku dostupnú prístrojovú techniku na vývoj molekulovo-genetických testov na detekciu a analýzu vírusov na genetickej úrovni.



## ÚEF SAV

Ústav experimentálnej fyziky v.v.i.  
Slovenská akadémia vied  
Watsonova 47  
040 01 Košice  
[websrv.saske.sk/uef/](http://websrv.saske.sk/uef/)  
*Partner č.2 projektu NANO VIR.*

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ FYZIKY SLOVENSKEJ AKADÉMIE VIED je výskumné pracovisko s dlhoročnou tradíciou základného výskumu vo viacerých oblastiach modernej fyziky. ÚEF v Košiciach je vedeckou organizáciou Slovenskej akadémie vied a dlhodobo patrí medzi jej najlepšie ústavy. Zameriava sa na základný výskum v oblasti fyziky kondenzovaných látok, všeobecnej fyziky a matematickej fyziky, materiálového výskumu, subjadrovej fyziky, kozmickej fyziky a biofyziky, ako aj na vývoj nových materiálov a nanomateriálov pre biomedicínske a technické aplikácie. Ústav napomáha realizácii dosiahnutých výsledkov v spoločenskej praxi a zúčastňuje sa na vedecko-popularizačnej činnosti. Na riešení projektu sa budú spolupodieľať dve výskumné skupiny. Prvá skupina z Oddelenia fyziky magnetických javov ÚEF SAV sa zameriava na prípravu, modifikáciu a komplexnú fyzikálno-chemickú charakterizáciu magnetických nanočastíc za účelom ich potenciálneho využitia v medicíne. V poslednom období sa riešiteľský tím venuje vývoju a príprave magneticky značeného biokomplexu na detekciu nádorových buniek konjugáciou špecifickej protilátky na vopred modifikovanom povrchu magnetickej nanočastice. Skupina navyše disponuje zručnosťami a infraštruktúrou na fyzikálno-chemickú charakterizáciu pripravených magnetických bionanomateriálov. Druhá výskumná skupina z Oddelenia biofyziky ÚEF SAV má dlhoročné skúsenosti so štúdiom proteínových komplexov a konformačných zmien poly/peptidov v súvislosti s amyloidnou agregáciou proteínov, ktorá je spojená so vznikom viacerých v súčasnosti neliečiteľných ochorení (napr. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, diabetes mellitus). Okrem toho sa zameriavajú na štúdium interakcií proteínov s rôznymi malými molekulami a rôzne modifikovanými nanočasticami a ich vplyvu na štruktúru a vlastnosti proteínov ako aj komplexov nanočastica-biomakromolekula. Oddelenie biofyziky disponuje špičkovou infraštruktúrou v oblasti spektrálnych metód (fluorescenčná, CD a infračervený spektroskop), metódami na štúdium interakcií biomakromolekúl s nanočasticami, povrchmi alebo inými biomakromolekulami (povrchová plazmónová rezonancia, titračný termálny kalorimeter) ako aj štúdium stability komplexných systémov (diferenčná skenovácia kalorimetria).





## Adriana ZELEŇÁKOVÁ

Docentka a PhD. v odbore Fyzika  
kondenzovaných látok  
Vedúca Katedry fyziky kondenzovaných  
látok, Ústav fyzikálnych vied PF UPJŠ

Email: [adriana.zelenakova@upjs.sk](mailto:adriana.zelenakova@upjs.sk)  
ORCID: 0000-0002-8443-9998  
WoS: A-5053-2017, Scopus: 56086445800

*Zodpovedná riešiteľka projektu NANOVIR.  
Je zodpovedná za míľniky 1 a 5 v aktivite H1.*

**D**OC. RNDR. ADRIANA ZELEŇÁKOVÁ, PHD. sa zaoberá štúdiom magnetických a štruktúrnych vlastností magnetických nanočastíc na báze Fe a Co so štruktúrou jadro/obal, ako aj nanokompozitov pozostávajúcich z magnetických nanočastíc zapuzdrených v periodickej poréznej matici. Je odborníčkou na štúdium statických a dynamických magnetických vlastností a má bohaté skúsenosti s experimentálnymi technikami, SQUID, Zetasizer, XANES, SAXS. Výsledky práce publikovala v 73 CC pôvodných vedeckých prácach registrovaných vo WoS a Scopus, ako sú: Scientific Report, Applied Surface Sciences, Physical Review B, Applied Physics Letters a iné. Má viac ako 700 SCI citácií, okrem autocitácií, H-index = 16. Je členkou špičkového vedeckého tímu TRIANGEL (podľa identifikácie Akreditačnej komisie), ktorý vykonáva špičkový výskum anorganických materiálov. Významným vedeckým prínosom doc. Zeleňákovvej je využitie magnetických nanočastíc pri magnetickej separácii, magnetickej podávaní liečiv a magnetickej hypertermii. Má skúsenosti s vedením tímov a prípravou domácich a zahraničných projektov v rámci H2020 a realizuje aktívnu medzinárodnú vedeckú spoluprácu v oblasti nanočasticového magnetizmu s pracoviskami CNR Rím, Taliansko, Univerzita v Seville, Španielsko, University of Florida, USA. Je tiež členkou komisie pre obhajoby bakalárskych, magisterských a dizertačných prác v odbore Fyzika kondenzovaných látok. Je spolugarantkou na doktorandskom stupni v študijnom programe Progressívne materiály. Je organizátorom medzinárodných vedeckých konferencií CSMAG 2019, CSMAG 2016, CSMAG-2013, CSMAG-2010, CSMAG-2007, CSMAG 2001 ([csmag.saske.sk](http://csmag.saske.sk)) ako aj SFEL2017, SFEL2018, SFEL2019, SFEL2022 ([www.sfel.sk](http://www.sfel.sk)).



## Vladimír ZELEŇÁK

DrSc. v odbore anorganická chémia  
Profesor na Katedre anorganickej chémie  
Ústav chemických vied PF UPJŠ

Email: vladimir.zelenak@upjs.sk

ORCID: 0000-0002-6118-1269

WoS: G-2192-2013, Scopus: 6701732686

*V rámci projektu NANOVIR  
je zodpovedný za míľnik 1 v aktivite H2.*

**P**ROF. RNDR. VLADIMÍR ZELEŇÁK, DRSC. je špičkovým vedecko-výskumným pracovníkom v oblasti anorganickej chémie a dlhodobo sa zaoberá problematikou štúdia výskumu usporiadaných pórovitých materiálov na báze  $\text{SiO}_2$  ako aj na báze MOF (Metal Organic Framework) a túto dynamickú a globálne uznávanú problematiku zaviedol v rámci UPJŠ v Košiciach. Je vedúcim špičkového vedeckého tímu TRIANGEL (podľa identifikácie Akreditačnej komisie). V spoluautorstve publikoval 136 publikácií, na ktoré eviduje viac ako 3 200 citácií (bez autocitácií), H-index 27. Významným vedeckým prínosom prof. Zeleňáka je využitie usporiadaného mezopórovitého oxidu kremičitého ako inteligentného nosiča hydrofóbných protizápalových alebo protirakovinových liečiv. Za tento výskum mu bola v roku 2019 udelená cena VEDEC ROKA SR za rok 2018. Jeho výskumný tím disponuje know-how na prípravu biokompatibilných nosičov liečiv, ktoré uvoľňujú liečivo kontrolovane, počas dlhšieho času. Za výsledky jeho vedeckej práce bol ocenený Cenou dekana PF UPJŠ, Cenou rektora UPJŠ v oblasti vedy a výskumu, absolvoval 17 vedeckých pobytov v zahraničí a 29 pozvaných a prihlásených prednášok na renomovaných konferenciách v zahraničí. Zavedením a rozvojom výskumu MOF a mezopórovitej siliky prof. Zeleňák vytvoril na Slovensku solídny základ pre jeho ďalší rozvoj v budúcnosti. Pravidelne oponuje vedecké práce z časopisov Microporous and Mesoporous Materials, Chemical Engineering Journal, Catalysis Today, Nano Letters, Journal of Physical Chemistry C a iné. Je členom vedeckej rady Prírodovedeckej Fakulty UPJŠ v Košiciach a Ústavu Geotechniky SAV v Košiciach. Ďalej je členom komisie pre obhajobu dizertačných prác v odbore Anorganická chémia. Je garantom na bakalárskom stupni štúdia za odbor Chémia a spolugarantom na doktorandskom stupni v odbore Anorganická chémia. Výsledky práce zodpovedného riešiteľa je možné dokumentovať aj bohatou prednáškovou činnosťou na konferenciách. V roku 2020 sa stal členom Scientific Advisory Board European Research Institute for Gas & Energy Innovation (ERIG).



## Jozef BEDNARČÍK

Samostatný vedecký pracovník (IIa)  
Funkčné miesto docenta na  
Katedre fyziky kondenzovaných látok  
Ústav fyzikálnych vied PF UPJŠ

Email: [jozef.bednarcik@upjs.sk](mailto:jozef.bednarcik@upjs.sk)  
ORCID: 0000-0002-3134-2711  
WoS: T-2054-2019, Scopus: 8970622600

*Spoluriešiteľ projektu NANOVIR  
na pozícii repatrianta.*

**R**NDR. JOZEF BEDNARČÍK, PHD. hneď po úspešnej obhajobe PhD práce v roku 2005 získal prestížne štipendium Marie Curie fellowship, v rámci ktorého pôsobil (2005-2006) na Univerzite v Rostocku. V období 2007-2018 pracoval ako vedecký pracovník na experimentálnych stanicách BW5 a P02.1 na zdrojoch synchrotrónového žiarenia vo výskumnom centre DESY Hamburg, Nemecko. Dr. Bednarčík je excelentný vedec, ktorý sa po dlhoročnom vedeckom pobyte (2005-2018) v zahraničí vrátil na Slovensko v rámci Podpornej schémy na návrat odborníkov zo zahraničia v zmysle uznesenia vlády SR č. 368/2015 z 8.7.2015. Od roku 2019 pracuje na Ústave fyzikálnych vied PF UPJŠ ako samostatný vedecký pracovník. Svojimi skúsenosťami, ktoré nadobudol v zahraničí, prispel k rozšíreniu vedeckej problematiky študovanej na ÚFV a takisto sa pričínil o založenie nového laboratória RTG difrakcie. Ďalej zaviedol do štúdia nový predmet (Štruktúrna charakterizácia pomocou RTG), pre ktorý vypracoval vysokoškolský učebný text. Je expertom s bohatými skúsenosťami v oblasti štúdia atomárnej štruktúry materiálov s vysokým stupňom vnútornej neusporiadanosti pomocou rozptylu synchrotrónového žiarenia a metódy párovej distribučnej funkcie, čo potvrdzuje aj jeho bohatá publikačná činnosť. Je spoluautorom viac ako 210 CC publikácií s citačným ohlasom prevyšujúcim 3200, H-index 30 (podľa WOS). Medzi jeho najvýznamnejšie výsledky z posledného obdobia možno zaradiť prácu publikovanú v časopise *Nature Communication* **13** (2022) 127, ktorá bola zaradená medzi top publikácie PF UPJŠ za rok 2022. V tejto práci bolo ukázané, že veľmi jemné zmeny v atomárnej štruktúre amorfných kovov, vyvolané procesmi starnutia a omladzovania, možno kvantifikovať pomocou metódy párovej distribučnej funkcie. Tento jedinečný prístup umožňuje porozumieť relaxačným procesom prebiehajúcim v kovových sklách a zároveň ich uviesť do súvisu s mechanickými vlastnosťami amorfných materiálov.

Je spolugarantom a školiteľom na doktorandskom stupni v študijnom programe Progresívne materiály. Podieľal sa na organizovaní medzinárodných vedeckých konferencií CSMAG 2019 ([csmag.saske.sk](http://csmag.saske.sk)) ako aj niekoľkých ročníkov SFEL ([www.sfel.sk](http://www.sfel.sk)).



## Ján KOŠUTH

Samostatný vedecký pracovník (IIa)  
Katedra bunkovej biológie, Ústav  
biologických a ekologických vied  
Prírodovedecká fakulta UPJŠ

Email: jan.kosuth@upjs.sk

ORCID: 0000-0001-5584-8728

WoS: R-5972-2016, Scopus: 56254098800

*V rámci projektu NANOVIR  
je zodpovedný za míľniky 3 a 4 v aktivite H1.*

**R**NDR. JÁN KOŠUTH, PHD. je kľúčovým vedecko-výskumným pracovníkom a expertom v oblasti genetiky a štúdia génovej expresie. V spoluautorstve publikoval 26 vedeckých prác (WOS), na ktoré eviduje 384 citácií (s vylúčením autocitácií), H-index = 13. Má skúsenosti s molekulárno-biologickými metódami analýzy nukleových kyselín, v súvislosti s riešeným projektom predovšetkým s izoláciou DNA/RNA a kvantifikáciou mRNA v experimentálnych vzorkách. S detekciou SARS-CoV-2 v klinických vzorkách má aj praktické skúsenosti ako zamestnanec diagnostického laboratória. Má bohaté skúsenosti s medzinárodnou spolupracou. Absolvoval viaceré zahraničné výskumné pobyty na európskych Univerzitách - Univerzita Oulu, Technická Univerzita v Dortmunde a Švajčiarsky Federálny Inštitút Technológie (ETH Zürich). V rámci projektu je zodpovedný za návrh metód a postupov na kvantifikáciu účinnosti extrakcie vírusovej RNA/DNA a podieľ sa experimentálne na riešení cieľ a vylepšenia diagnostiky vírusovej RNA.



## Juraj ŠEVC

docent v odbore Biológia  
Katedra bunkovej biológie, Ústav  
biologických a ekologických vied  
Prírodovedecká fakulta UPJŠ

Email: juraj.sevc@upjs.sk  
ORCID: 0000-0001-8050-4185

*V rámci projektu NANO VIR  
je zodpovedný za míľniky 4 a 5 v aktivite H2.*

**D**OC. RNDR. JURAJ ŠEVC, PHD. je kľúčovým vedecko-výskumným pracovníkom a odborníkom so skúsenosťami so stanovovaním farmakokinetiky liečiv v *in vivo* podmienkach a s detekciou exogénne podaných látok v bunkách pomocou kvalitatívnych a kvantitatívnych metód konfokálnej mikroskopie. V spoluautorstve publikoval 22 vedeckých prác (WOS), na ktoré eviduje 197 citácií (s vylúčením autocitácií), H-index = 10. Má skúsenosti s medzinárodnou spolupracou v rámci zahraničných výskumných pobytov na Department of Anesthesiology, School of Medicine, University of California, San Diego (UCSD), USA. V rámci riešenia projektu je zodpovedný za podávanie nosičov liečiv experimentálnym zvieratám, ich usmrčovanie vo vybraných časových intervaloch, izoláciu tkanivových vzoriek a ich analýzu pomocou konfokálneho mikroskopu.



## Zuzana GAŽOVÁ

Docentka v odbore Biológia  
DrSc. v odbore Biofyzika  
Riaditeľka Ústavu experimentálnej fyziky  
Slovenskej akadémie vied, v. v. i.

Email: gazova@saske.sk  
ORCID: 0000-0002-0670-3431  
WoS: T-4146-2019, Scopus: 6602917029

*V rámci projektu NANOVIR  
je zodpovedná za míľnik 3 v aktivite H2.*

**D**OC. RNDR. ZUZANA GAŽOVÁ, DRSC. sa zaoberá štúdiom proteín-proteín a proteín-ligand interakcií. Zameriava sa hlavne na určenie molekulárneho mechanizmu amyloidnej fibrilizácie proteínov a na identifikáciu inhibítorov (malé molekuly, peptidy a nanočastice) amyloidnej agregácie. V prípade látok s efektívnou anti-amyloidnou aktivitou sa venuje štúdiu interferencie týchto látok s viacerými cieľmi, ktoré sú spojené s patogenézou Alzheimerovej choroby (BACE1, acetylcholínové receptory, tvorba ROS a ďalšie). Zameriava sa tiež na určenie účinku amyloidných agregátov s rozdielnou štruktúrou na bunkové línie. Má skúsenosti s viacerými experimentálnymi metódami, hlavne spektroskopickými a mikroskopickými technikami. Získané výsledky publikovala vo viac ako 95 vedeckých prácach registrovaných v databázach WoS a Scopus s viac ako 1 700 citáciami (bez samocitácií), H-index = 23. Po absolvovaní pobytu v Ústave Maxa Plancka pre štruktúrnu a molekulárnu biológiu vytvorila aktívnu výskumnú skupinu zameranú na amyloidnú agregáciu proteínov uznávanú v medzinárodnej vedeckej komunite. Bola, resp. je zodpovednou riešiteľkou alebo vedúcou výskumnej úlohy viacerých medzinárodných (COST, bilaterálne projekty APVV a JRP) ako aj národných (APVV, VEGA, Štrukturálne fondy) projektov. Má bohatú medzinárodnú spoluprácu s významnými pracoviskami ako napr. CNR v Taliansku, Poľskou akadémiou vied, Univerzitou Modena, Univerzitou Taipei, Východočínskou univerzitou v Šanghaji a viacerými pracoviskami v Českej republike. Je spoluorganizátorkou 16 ročníkov tradičnej konferencie Štruktúra a stabilita biomakromolekúl, COST sympózia a Biofyzikálneho kongresu. Viedla bakalárske a magisterské práce a je školiteľkou PhD študentov. Vedecký tím pod jej vedením získal viacero ocenení, medzi najvýznamnejšie patrí Cena za vedu a technológie udelenú MŠVVaŠ SR v kategórii Vedecko-technologický tím roka a Cena SAV za významné vedecké výsledky získané pri štúdiu amyloidnej agregácie proteínov. Grantová agentúra VEGA udelila projektom pod jej vedením certifikát o dosiahnutí vynikajúcich výsledkov.



## Martina KONERACKÁ

Samostatný vedecký pracovník (IIa) na  
Ústave experimentálnej fyziky  
Slovenskej akadémie vied, v.v.i.

Email: konerack@saske.sk  
ORCID: 0000-0002-2098-070X  
WoS: ABE-1709-2020

*V rámci projektu NANOVIR  
je zodpovedná za míľnik 2 v aktivite H2.*

**R**NDR. MARTINA KONERACKÁ, CSC. sa zaoberá syntézou magnetických nanočastíc a magnetických kvapalín na báze oxidov železa pre biomedicínske aplikácie, ako aj štúdiom ich fyzikálnochemických vlastností. Je špičkovou vedeckou pracovníčkou v oblasti imobilizácie biologicky aktívnych látok (enzýmy, protilátky, liečivá) na funkcionalizované magnetické nanočastice s perspektívou použitia napr. pre cieleň transport liečiv, MRI, alebo v iných oblastiach biomedicíny. Má bohaté skúsenosti s experimentálnymi technikami na fyzikálno-chemickú charakterizáciu pripravených magnetických bionanomateriálov (napr. SQUID, Zetasizer, UV/VIS). Výsledky práce publikovala v 163 prácach registrovaných vo WOS, na ktoré je evidovaných viac ako 1500 citácií (bez samocitácií), H-index: 24 (WOS). Za súbor prác z oblasti štúdia cieleňho transportu liečiv pomocou magnetických nanočastíc, ktoré vznikli v širokej medzinárodnej spolupráci s vedeckými inštitúciami v siedmich krajinách, bola kolektívu, ktorého členkou je aj Ing. M. Koneracká, CSC., v roku 2007 udelená Cena SAV za výsledky medzinárodnej vedecko-technickej spolupráce a v roku 2013 za významné výsledky dosiahnuté v oblasti štúdia magnetických nanočastíc a nízkomolekulových látok ako potenciálnych terapeutík ochorení spojených s amyloidnou agregáciou proteínov.

Má skúsenosti s vedením tímov pri riešení národných i medzinárodných projektov. Bola členkou organizačného výboru konferencie o magnetických kvapalinách (ICMF 11, Košice 2007) a medzinárodných vedeckých konferencií CSMAG 2019, CSMAG 2016, CSMAG 2013, CSMAG 2010, CSMAG 2007, CSMAG 2001, <https://csmag.saske.sk/>.



## Vlasta ZÁVIŠOVÁ

Samostatný vedecký pracovník (IIa) na  
Ústave experimentálnej fyziky  
Slovenskej akadémie vied, v. v. i.

Email: zavisova@saske.sk  
ORCID: 0000-0001-5210-6446  
WoS: EAB-7792-2022

*V rámci projektu NANOVIR  
je zodpovedná za míľnik 2 v aktivite H2.*

**I**NG. VLASTA ZÁVIŠOVÁ, PHD. získala vedeckú hodnosť PhD. v roku 2009 v študijnom odbore Fyzika kondenzovaných látok a akustika. Je spoluautorkou 119 vedeckých prác registrovaných v databáze WOS, na ktoré je evidovaných okolo 1 400 citácií (bez samocitácií), H-index = 21 (WOS). Pracuje v oblasti prípravy magnetických nanočastíc rôznych tvarov, ich stabilizácie a modifikácie s cieľom ich využitia v oblasti medicíny napr. pri separácii nukleových kyselín, diagnostike, terapii a teranostike. Pripravené magnetické nanočastice charakterizuje viacerými metódami za účelom optimalizácie ich vlastností ako napr. morfológia, štruktúra, rozmery, náboj, zloženie, stabilita a magnetické vlastnosti. Na charakterizáciu vzoriek využíva svoje bohaté skúsenosti s experimentálnymi zariadeniami ako sú spektrálne prístroje, diferenciálna sedimentačná centrifugácia, zetasizer, héliový pyknometer, vibračný magnetometer, skenovací elektrónový mikroskop a iné. Zaoberá sa naväzovaním rôznych liečiv napr. biologicky aktívnych látok s protirakovinovými vlastnosťami na magnetické nanočastice pre cieleňý transport liečiv. Venuje sa aj dynamickým procesom ako je kinetika uvoľňovania liečiv z kompozitov. Má skúsenosti s koordináciou tímu pri riešení národných i medzinárodných projektov. Organizovala medzinárodné stretnutie NANOFLUID v rámci COST projektu v kongresovom centre ACADEMIA vo Vysokých Tatrách (12. - 15.2.2017) a bola členkou organizačného výboru konferencie (ICMF 11, Košice 2007). Tímu, v ktorom V. ZÁVIŠOVÁ pracuje, bola v roku 2007 udelená cena Slovenskej akadémie vied za významné výsledky dosiahnuté v rámci medzinárodnej vedecko-technickej spolupráce a v roku 2013 za výsledky dosiahnuté v oblasti štúdia magnetických nanočastíc a nízkomolekulových látok ako potenciálnych terapeutík ochorení spojených s amyloidnou agregáciou proteínov.





## Štefan VILČEK

Profesor v odbore Biochémia  
DrSc. v odbore Biochémia  
Vedúci vedecký pracovník na Univerzite  
veterinárskeho lekárstva a farmácie  
v Košiciach

Email: stefan.vilcek@uvlf.sk  
ORCID: 0000-0002-4658-561X

*V rámci projektu NANOVIR  
je zodpovedný za míľnik 2 v aktivite H1.*

**P**ROF. ING. ŠTEFAN VILČEK, DRSC. sa vo svojej vedeckej práci venuje vývoju molekulovogenetických testov na detekciu vírusov, charakterizácii vírusových genómov, molekulovej epizootológii vírusových nákaz zvierat. Výrazná časť jeho vedeckej práce je orientovaná na štúdium pestivírusov. V tejto oblasti dosiahol viaceré medzinárodné priority: vývoj RT-PCR testu na detekciu všetkých pestivírusov, ktorý sa využíva v mnohých diagnostických laboratóriách vo svete, prvý popis 12 subtypov BVDV-1, ktorý je dnes využívaný ako medzinárodný štandard na typizáciu BVDV-1 izolátov, prvá identifikácia a charakterizácia pestivírusu u vidloroha preriového, charakterizácia kompletného genómu pestivírusu u kamzíkov, prvá identifikácia BVDV-2 na Slovensku, Francúzsku, Rakúsku, Indii. RT-PCR test na detekciu pestivírusov, ktorý vyvinul na báze selekcie primerov z 5' UTR oblasti pestivírusového genómu, bol využitý v úspešnom eradikačnom programe pre BVD v Dolnom Rakúsku. V súčasnosti sa venuje štúdiu enterálnych vírusov prasiat a vírusu hepatitídy E. Okrem viacerých krátkodobých pobytov v zahraničí absolvoval aj dlhodobé študijné pobyty v UK, Švédsku a v USA.

Profesor Vilček je odborný garant Centra excelentnosti INFEKTZOON na UVLF v Košiciach, bol jeden z koordinátorov vedeckého parku MediPark. Bol hlavným riešiteľom viacerých slovenských grantov (APVV, VEGA, KEGA, štrukturálne fondy EÚ), ako aj medzinárodných projektov (Welcome Trust grant, SCOPES, slovensko-nemecký grant). Bol členom členom štyroch COST projektov v ktorých zastupoval Slovensko. Spolu publikoval 129 vedeckých prác, ktoré sú vedené v databáze Web of Science s 3 200 ohlasmi s H-indexom 34. Za svoju celoživotnú vedeckú prácu bol ocenený Cenou za vedu a techniku v r. 2006 a excelentný tím LACTOVIR, ktorého je vedúcim, získal Cenou za vedu a techniku v r. 2017. Primátor mesta Košice mu udelil plaketu za rozvoj vedy, PF UPJŠ v Košiciach ho ocenila striebornou a zlatou medailou. Získal 4 ceny Literárneho fondu SR. V hodnotení výskumných pracovníkov z celého sveta bol identifikovaný medzi 2% vedeckou špičkou.



## Marieta CVENGROŠOVÁ

Odborný zamestnanec Oddelenia podpory projektov, Centrum celoživotného vzdelávania a podpory projektov, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Email: marieta.cvengrosova@upjs.sk

Tel.: +421-55-234-1281

*Projektová manažérka projektu NANO VIR.*

**M**GR. MARIETA CVENGROŠOVÁ sa aktuálne zaoberá implementáciou a monitorovaním projektov EŠIF, a to konkrétne COVID projektov „Nanočasťice pre riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANO VIR), 313011AUW7,“ tiež aj „Návrh a implementácia pokročilých metód ventilačnej liečby a diagnostiky vírusových pneumónii vrátane Covid-19 s možnosťou ich rýchleho osvojenia, 313011ASX1.“

Má skúsenosti s prípravou a implementáciou vzdelávacieho EŠIF projektu „Inovácia pedagogických praxí na UPJŠ zameraná na cielený rozvoj profesijných kompetencií budúcich učiteľov, 312011AFP1.“ Ako asistent projektového manažéra bola nápomocná aj pri príprave podkladov v rámci realizácie EŠIF projektov „Nové nekonvenčné magnetické materiály pre aplikácie, 313011T544,“ a „Bioaktívne látky pre podporu zdravia a prevenciu chronických ochorení, 313011T651.“

V neposlednom rade má skúsenosti s prípravou a administratívnou podporou projektov realizovaných v rámci národných grantových schém - grantové agentúry: Agentúra na podporu výskumu a vývoja, Vedecká grantová agentúra MŠVVaŠ SR a SAV, Kultúrna a edukačná grantová agentúra MŠVVaŠ SR.

## **Časť II**

# **Pozvaná plenárna prednáška**



## Aký je pôvod SARS-CoV-2: Prírodný alebo umelý?

Š. Vilček<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice*

\* email korešpondujúceho autora: stefan.vilcek@uvlf.sk

---

**ABSTRAKT** Vznik pandémie COVID-19 je úzko spojený so zodpovedaním otázky odkiaľ pochádza etiologický agens SARS-CoV-2. Pri hľadaní odpovede na nastolený problém sa sformovali dva prístupy. Kým jeden z nich je založený na zoonotickom pôvode pandemického vírusu, podobne ako to bolo pozorované aj v prípade iných koronavírusových epidémií, druhý prístup preferuje teóriu úniku umelo pozmeneného vírusu z laboratória. Doterajšie výsledky vedeckých štúdií prevažne naznačujú, že SARS-CoV-2 je prirodzeného pôvodu, t.j vznikol evolučnou cestou v prírode bez zásahu človeka. Avšak definitívny záver o pôvode SARS-CoV-2 zatiaľ nepoznáme.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** SARS-CoV-2; pôvod; zoonotický vírus; rekombinácia; medzihostiteľ; úniková teória

---

## Úvod

Epidémia COVID-19, ktorá vypukla v 11-miliónovom čínskom meste Wu-chan v decembri 2019, za tri mesiace prerástla do celosvetovej pandémie. Prvé šetrenia indikovali, že veľa prvých pacientov malo vzťah k preľudnenému mestskému mokrému trhu Huanan, kde sa predávali domáce a voľne žijúce zvieratá a ich potravinové produkty. Čínski vedci už v priebehu 2-3 týždňov zistili, že epidémiu spôsobil nový koronavírus [1], ktorý neskôr dostal pomenovanie SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2). Začiatkom januára 2020 vedci osekvenovali celý genóm nového koronavírusu [2], čím otvorili cestu k jeho dôkladnejšiemu štúdiu. Genóm SARS-CoV-2 tvorí jednovláknová pozitívne orientovaná RNA o dĺžke 29 903 nukleotidov. Z viacerých vírusových génov najväčšiu pozornosť upútava S gén, ktorý kóduje S proteín (spike proteín). Ten tvorí na povrchu vírusového proteínového obalu hroty viditeľné elektrónovým mikroskopom. S proteín je tvorený reťazcom 1273 aminokyselín a obsahuje doménu RBD (receptor binding domain), zloženú z asi 200 aminokyselín. Vírus sa pomocou tejto domény viaže na ACE2 receptor ľudských buniek, s následným prienikom patogénu do bunky, kde sa množí. V RBD bolo zistených šesť kľúčových aminokyselín veľmi dôležitých pre väzbu vírusu na bunku [3]. Ďalšou dôležitou oblasťou S proteínu je štiepacie miesto pre furínovú proteázu. Tvoria ho štyri aminokyseliny PRRA ako výsledok inzercie 12 nukleotidov do genómu SARS-CoV-2 [1]. Tento bunkový enzým štiepi S proteín na dve časti, čím zabezpečuje podmienky pre infekčnosť a patogenitu vírusu, a teda jeho rýchle šírenie v ľudskej populácii.

## Pôvod SARS-CoV-2

Už krátko po objave vírusu sa vynorila zvedavá otázka: Odkiaľ pochádza SARS-CoV-2? Táto otázka nie je úplne samoučelná, pretože jej kvalifikované zodpovedanie môže viesť k zamedzeniu vzniku nových pandémiei. Pri hľadaní pôvodu SARS-CoV-2 prvé podozrenie padlo na koronavírusy netopierov, pretože tieto spôsobili koronavírusovú epidémiu SARS v Číne v roku 2003, rovnako ako aj epidémiu MERS v 2012-2013 na Blízkom Východe. Vedci z virologického ústavu vo Wu-chane získali pri analýze netopierích koronavírusov sekvenciu celého genómu jedného zaujímavého izolátu s označením RaTG13 [1]. Mal až 96,1% identických sekvencií s genómom SARS-CoV-2. Napriek vysokej identite, tento netopierí vírus neobsahoval RBD podobnú pandemickému koronavírusu a nemal ani štiepacie miesto pre furínovú proteázu. Genóm RaTG13 sa líšil od SARS-CoV-2 až v 1200 nukleotidoch, takže by mu trvalo okolo 40 rokov, aby sa vyvinul na ľudský koronavírus.

Analýza vzoriek z Thajska, Kambodže a Japonska odhalila, že koronavírusy netopierov, ktoré sú identické so SARS-CoV-2 viac ako 90%, nie sú na ázijskom kontinente vzácné. Pri analýze netopierích vzoriek z Laosu vedci našli koronavírus označený Banal-52 [4], ktorý bol na úrovni celého genómu až na 96,8% identický so SARS-CoV-2, pričom v S géne to bolo 94,6%, asi o dve percentá viac ako pozorovali u RaTG13. Zvlášť zaujímavé je, že všetkých šesť kľúčových aminokyselín v RBD bolo identických so SARS-CoV-2. Tento netopierí koronavírus sa viazal na ľudské bunky v laboratórnych podmienkach a väzba bola blokovaná ľudskými špecifickými protilátkami. Ale ani v tomto prípade nie je možné konštatovať, že SARS-CoV-2 pochádza priamo z Banal-52, lebo evolučná vzdialenosť je stále pomerne veľká. A chýbalo mu aj štiepacie miesto pre furínovú proteázu.

Ďalšou možnosťou je, že SARS-CoV-2 bol najprv modifikovaný v medzihostiteľovi a potom adaptovaný vírus infikoval ľudí. Ved' aj netopierí koronavírus, ktorý vyvolal epidémiu SARS najprv infikoval cibetky, v nich sa evolučne adaptoval a výsledný koronavírus SARS-CoV-2 následne infikoval ľudí. Aj epidémia MERS bola vyvolaná koronavírusom MERS-CoV s pôvodom u netopierov. Ten sa u tiav adaptoval do formy schopnej smrteľne infikovať ľudí. Niektoré koronavírusy využívajú na svoje šírenie ďalšiu schopnosť – výmenu časti genetickej informácie medzi dvoma koronavírusmi, ktoré súčasne infikujú bunku, teda rekombináciu. Vo svetle uvedených poznatkov sa zistilo, že niektoré koronavírusy infikujúce šupinavce majú S proteín s RBD doménou v ktorej všetkých šesť kľúčových aminokyselín zodpovedných za väzbu vírusu na bunku je identických so SARS-CoV-2 [5]. To ihneď viedlo k úvahe, že SARS-Co-2 je výsledkom rekombinácie v S géne medzi koronavírusom netopierov a koronavírusom šupinavcov a adaptovaný rekombinantný vírus infikoval človeka. Táto teória sa doteraz nepotvrdila, lebo šupinavce môžu po koronavírusovej infekcii ochorieť, čo sa u medzihostiteľa nestáva, a ich genóm je len na 90% identický so SARS-CoV-2. Jeho S proteín a RBD majú tieto hodnoty ešte nižšie. Chýba mu aj štiepacie miesto pre furínovú proteázu. Dnes najhorúcejšími kandidátmi na medzihostiteľov sú, okrem iných zvierat, psík medvedíkovitý a norcky.

Časť laickej, ale aj minoritná časť vedeckej komunity verí, že laboratórne upravený alebo prírodný vírus unikol z virologického ústavu vo Wu-chane. Únik vírusu z laboratória je teoreticky možný v prípade, keď je ho dostatočné množstvo, teda keď ho vedci v laboratóriu pomnožia na bunkových kultúrach. Hoci vo Wu-chanskom inštitúte kultivovali niektoré koronavírusy, tie neboli geneticky blízke SARS-CoV-2, a nebolo to ani v prípade RaTG13. Špekulácia, že prírodný vírus vo vzorke odobratej vedcami vo vzdialenej časti Číny bol nechtiac vnesený z laboratória do mesta infikovaným vedeckým pracovníkom, kde sa nekontrolovane šíril, naráža na odborné problémy. Infekcia sa nerozšírila medzi obyvateľmi v oblasti, kde boli zbierané pôvodné vzorky v prírode a podľa správy WHO komisie z marca 2020, žiaden z pracovníkov virologického laboratória vo Wu-chane nemal v krvi protilátky proti SARS-CoV-2, teda nebol ním infikovaný. Ďalšie úvahy o laboratórnom pôvode SARS-CoV-2 boli založené na predpoklade cieľných analýz a umelých modifikáciách vírusového genómu (gain-of-function výskum), hlavne RBD domény, aby sa zistilo ako sa koronavírus viaže na ľudské bunky. Neexistujú však dôkazy o tom, že takéto experimenty sa robili v laboratóriu vo Wu-chane s koronavírusmi geneticky veľmi príbuznými so SARS-CoV-2. Úvahy o umelom pôvode štiepacieho miesta pre furínovú proteázu na rozhraní S1 a S2 podjednotiek S proteínu tiež narážajú na protiargumenty. Také miesto nájdeme nie len u SARS-CoV-2 ale aj u iných koronavírusov, napr. MERS a tiež u virulentných chrípkových kmeňov. V prípade umeljej inzercie štiepacieho miesta pre furínovú proteázu do genómu SARS-CoV-2 by inzert bol evolučne vytlačený. Všetky doterajšie izoláty pandemického koronavírusu si inkriminované miesto zachovali, čo je tiež dôkaz proti umelému zásahu do vírusového genómu. Podrobnejšie analýzy genetických sekvencií SARS-CoV-2 z prvého ohniska nákazy vo Wu-chane v decembri 2019 odhalili, že tvorili dve fylogenetické vetvy A a B, líšiace sa len v dvoch nukleotidoch. Vírusové varianty vetvy B sa vyskytovali na mokróm trhu Huanan, varianty z vetvy A boli identifikované na inom mokróm trhu. V tejto súvislosti je na mieste aj úvaha, že došlo k dvom nezávislým prírodným prienikom vírusu do ľudskej populácie, čo by značne oslabovalo špekulácie o úniku vírusu z laboratória. Komisia WHO vo svojej správe tiež uzavrela, že umelý pôvod alebo únik SARS-CoV-2 z laboratória je vysoko nepravdepodobný.

Záverom zdôraznime, že úvaha o úniku vírusu z laboratória je vo vedeckej obci v minoritnom zastúpení a nové dôkazy nepribúdajú, skôr ubúdajú v prospech zoonotického pôvodu SARS-CoV-2 [6]. Napriek tomu silnie tlak na dôkladnejšie prešetrenie pôvodu pandémie, vrátane únikovej teórie. Vedúci politickí predstavitelia Číny sa takému úsiliu medzinárodnej komunity zdráhajú argumentujúc, že pre zoonotický pôvod SARS-CoV-2 už existuje dostatok dôkazov.

---

POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

**Literatúra**

- [1] Zhou H., Chen X., Hu T., Li J., Song H., Liu Y., Wang P., Liu D., Yang J., Holmes E.C., Hughes A.C., Bi Y. and Shi W., “A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein”, *Current Biology*, **30**(11), (2020), 2196–2203.e3, doi: 10.1016/j.cub.2020.05.023.
- [2] Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.W., Tian J.H., Pei Y.Y., Yuan M.L., Zhang Y.L., Dai F.H., Liu Y., Wang Q.M., Zheng J.J., Xu L., Holmes E.C. and Zhang Y.Z., “A new coronavirus associated with human respiratory disease in china”, *Nature*, **579**(7798), (2020), 265–269, doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- [3] Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., Holmes E.C. and Garry R.F., “The proximal origin of SARS-CoV-2”, *Nature Medicine*, **26**(4), (2020), 450–452, doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
- [4] Temmam S., Vongphayloth K., Baquero E., Munier S., Bonomi M., Regnault B., Douangboubpha B., Karami Y., Chrétien D., Sanamxay D., Xayaphet V., Paphaphanh P., Lacoste V., Somlor S., Lakeomany K., Phommavanh N., Pérot P., Dehan O., Amara F., Donati F., Bigot T., Nilges M., Rey F.A., van der Werf S., Brey P.T. and Eloit M., “Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells”, *Nature*, **604**(7905), (2022), 330–336, doi: 10.1038/s41586-022-04532-4.
- [5] Lam T.T.Y., Jia N., Zhang Y.W., Shum M.H.H., Jiang J.F., Zhu H.C., Tong Y.G., Shi Y.X., Ni X.B., Liao Y.S., Li W.J., Jiang B.G., Wei W., Yuan T.T., Zheng K., Cui X.M., Li J., Pei G.Q., Qiang X., Cheung W.Y.M., Li L.F., Sun F.F., Qin S., Huang J.C., Leung G.M., Holmes E.C., Hu Y.L., Guan Y. and Cao W.C., “Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in malayan pangolins”, *Nature*, **583**(7815), (2020), 282–285, doi: 10.1038/s41586-020-2169-0.
- [6] Vilcek S., “SARS-CoV-2: Zoonotic origin of pandemic coronavirus”, *Acta virologica*, **64**(03), (2020), 281–287, doi: 10.4149/av\_2020\_302.



## **Časť III**

### **Pozvané prednášky**



## Modelovanie magnetických vlastností nanočastíc $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

**P. Hrubovčák**<sup>1,\*</sup>, A. Zeleňáková<sup>1</sup>, J. Szücssová<sup>1</sup>, L. Nagy<sup>1</sup>, M. Barutiak<sup>1</sup>, E. Beňová<sup>2</sup>, V. Zeleňák<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

<sup>2</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: pavol.hrubovcak@upjs.sk

---

**ABSTRAKT** Pomocou teoretického modelu sme fitovali experimentálne dáta závislosti magnetizácie od teploty nanočasticového systému  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  (jadro@obal). Na základe zhody modelu s experimentálnymi dátami ZFC magnetizácie bolo možné určiť veľkosť magnetického jadra študovaných nanočastíc. Naopak, výrazný nesúlad experimentálnych dát FC magnetizácie s teoretickým modelom jasne preukázal prítomnosť silných vzájomných interakcií medzi časticami.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; magnetické interakcie, ZFC-FC magnetizácia

---

### Úvod

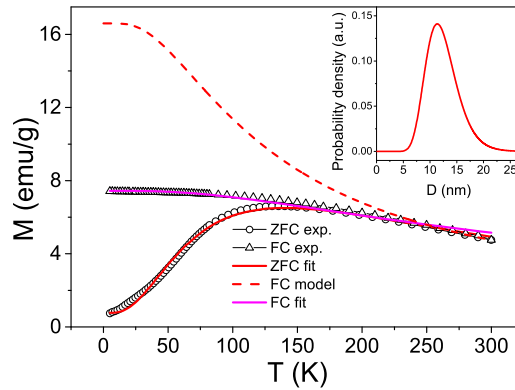
Magnetitové ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) častice patria medzi najčastejšie využívané nanočastice so širokým uplatnením v mnohých oblastiach. Ich všestrannosť je úzko spätá s unikátnou kombináciou viacerých špecifických vlastností, ako sú superparamagnetizmus, stabilita, jednoduchá syntéza a následná modifikácia ich povrchu, ako aj lacné náklady spojené s ich prípravou. Magnetitové nanočastice sú však zároveň aj biokompatibilné, čo ich predurčuje na rôzne aplikácie v biomedicíne (hypertermia, cielený transport liečiv, zobrazovanie pomocou magnetickej rezonancie a pod.). Napriek tomu, že magnetickým nanočasticovým systémom na báze  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  je z hľadiska aplikovaného výskumu venované množstvo pozornosti, teoretické predpovede ich magnetického správania sa často nezhodujú s experimentálnymi pozorovaniami. Je to preto, že magnetické vlastnosti konkrétneho nanočasticového systému sú veľmi delikátne a závisia od veľkého množstva faktorov. V praxi sa stáva, že častice rovnakého zloženia, veľkosti aj tvaru môžu mať výrazne odlišné magnetické vlastnosti. Tie sú, okrem iného, výrazne ovplyvnené aj vonkajším obalom častíc (štruktúra jadro@obal). Všeobecne platí, že nemagnetický obal redukuje výslednú magnetizáciu častice, ovplyvňuje jej blokovaciu teplotu, ako aj oslabuje vzájomné interakcie medzi časticami. V našej práci sme skúmali magnetické správanie nanočasticového systému  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  (jadro@obal) porovnaním experimentálnych dát s teoretickým modelom. Na základe porovnania možno vyvodit' závery ohľadom distribúcie veľkosti magnetických jadier ako aj o miere interakcií prítomných v danom systéme. Prezentované výsledky sú zároveň v súlade s charakteristikami skúmaného systému získanými inými experimentálnymi metódami.

### Experimentálne metódy a diskusia výsledkov

Magnetitové nanočastice obalené oxidom kremičitým ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) boli pripravené pomocou metódy BOMB [1]. Práškové vzorky nanočastíc boli preskúvané viacerými experimentálnymi metódami s cieľom získať čo najviac komplementárnych informácií o ich štruktúre a morfológii. Pomocou elektrónovej mikroskopie bola určená priemerná veľkosť častice (aj s obalom)  $D_{SEM} \sim 20$  nm [2]. Veľkosť kryštalického  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  jadra  $D_{XRD} \sim 11$  nm bola vypočítaná z experimentálnych dát X-ray difrakcie pomocou metódy Williamson-Hall. Magnetické vlastnosti nanočasticového systému boli skúmané pomocou komerčnej aparatury na báze SQUID-u: MPMS 5XL (Quantum Design, Inc.) v rozsahu teplôt 2-300 K. Závislosť magnetizácie od teploty v aplikovanom statickom poli  $H = 100$  Oe po ochladení vzorky bez poľa (ZFC), respektíve v danom poli (FC) je prezentovaná na Obr.1. Experimentálne dáta boli fitované modelom, ktorý bol navrhnutý pre superparamagnetické nanočasticové systémy bez prítomnosti medzičasticových interakcií, pričom sme uvažovali log-normálnu distribúciu veľkostí častíc  $\rho(V)$  [3]:

$$M_{ZFC} = \frac{\mu_0 H \mathcal{M}_S^2}{3k_B T} \int_{V_{lim}}^0 V^2 \rho(V) dV + \frac{\mu_0 H \mathcal{M}_S^2}{3K_{eff}} \int_{V_{lim}}^{\infty} V \rho(V) dV \quad (1)$$

$$M_{ZF} = \frac{\mu_0 H \mathcal{M}_S^2}{3k_B T} \int_0^{V_{lim}} V^2 \rho(V) dV + \frac{\mu_0 H \mathcal{M}_S^2}{3K_{eff}} \int_{V_{lim}}^{\infty} \alpha V \rho(V) dV \quad (2)$$



**Obr. 1:** Závislosť magnetizácie vzorky  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  od teploty. Experimentálne dáta (prázdne symboly) fitované teoretickými modelmi pre ZFC magnetizáciu (červená krivka) a FC magnetizáciu (fialová krivka). Červená prerušovaná krivka znázorňuje modelované dáta pre FC magnetizáciu systému bez prítomnosti medzičasticových interakcií.

Na základe výbornej zhody  $M_{ZFC}$  modelu s experimentálnymi dátami boli určené kľúčové hodnoty parametrov charakterizujúcich systém. Hodnota efektívnej magnetokryštalickej anizotropie  $K_{eff} = 1.8 \times 10^4 \text{ J/m}^3$  odpovedá štandardným hodnotám tejto veličiny ( $1 - 2 \times 10^4 \text{ J/m}^3$ ) pre neinteragujúce nanočastice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Priemerná veľkosť magnetických jadier nanočastíc  $D_{mag} \sim 13 \text{ nm}$  je len o málo väčšia ako  $D_{XRD}$ . Následne sme tieto parametre použili na modelovanie  $M_{FC}$  krivky (Obr.1, prerušovaná červená línia). Ako je zrejmé, model navrhnutý pre neinteragujúci systém neodpovedá experimentálnym dátam. Fitovaním FC dát (fialová línia) teoretickým modelom bola pri zachovanej  $D_{mag} \sim 13 \text{ nm}$  stanovená vyššie dvojnásobná  $K_{eff} = 4.5 \times 10^4 \text{ J/m}^3$ . To je v súlade s hypotézou o prítomnosti silných interakcií v systéme, ktoré zvyšujú hodnotu energetickej bariéry  $E_a = K_{eff}V$ . Túto  $E_a$  musí magnetický moment častice prekonať pri svojej relaxácii a keďže veľkosť častice sme ponechali nemennú (13 nm), zvýšenie  $E_a$  sa prejavilo výrazným nárastom  $K_{eff}$ .

### Záver

Aplikáciou modelu určeného na simulovanie závislosti magnetizácie od teploty superparamagnetického nanočasticového systému sme študovali experimentálne dáta nami pripraveného systému  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ . Na základe porovnania modelu s experimentálnymi dátami sme stanovili priemernú veľkosť magnetického jadra častíc (13 nm) ako aj preukázali prítomnosť silných magnetických interakcií medzi časticami v systéme.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Oberacker P, Stepper P, Bond D.M., Höhn S., Focken J., *et al.*, "Bio-on-magnetic-beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation", *PLOS Biology*, **17**(1), (2019), e3000107, doi: 10.1371/journal.pbio.3000107.
- [2] Szűcsová J., *et al.*, "Porovnanie morfológických a magnetických vlastností nanočastíc  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  obalených organickými ligandmi", (v tomto zborníku na strane 72)
- [3] El-Hilo M., "Nano-particle magnetism with a dispersion of particle sizes", *Journal of Applied Physics*, **112**(10), (2012), 103915, doi: 10.1063/1.4766817.

## Príprava magnetických nanočastíc a ich značenie rádionuklidmi pre potenciálne teranostické použitie

M. Mirković<sup>1</sup>, Z. Milanović<sup>1</sup>, M. Perić<sup>1</sup>, S. Vranješ-Đurić<sup>1</sup>, M. Ognjanović<sup>1</sup>, B. Antić<sup>1</sup>, M. Kuraica<sup>2</sup>, I. Krstić<sup>2</sup>, **M. Kubovčíková**<sup>3</sup>, I. Antal<sup>3</sup>, V. Závíšová<sup>3</sup>, A. Juríková<sup>3</sup>, M. Koneracká<sup>3</sup>,

<sup>1</sup> Vinča Institute of Nuclear Sciences - National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, 11001 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Faculty of Physics, University of Belgrade, Studentski Trg 12, 11001 Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.v.i., Watsonova 47, 040 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: kubovcikova@saske.sk

---

**ABSTRAKT** V tejto práci boli pripravené a charakterizované magnetické nanočastice (MNPs), ktorých povrch bol modifikovaný vybranými aminokyselinami - prolínom, tryptofánom a poly-L-lyzínom. Častice boli komplexne charakterizované z hľadiska ich fyzikálno chemických vlastností. Tieto boli ďalej značené vybranými teranostickými rádionuklidmi <sup>131</sup>I and <sup>177</sup>Lu. Na základe výsledkov meraní stability *in vitro* bola vybraná vzorka s najlepšimi vlastnosťami - PLLMNPs značená <sup>177</sup>Lu pri teplote 80 °C, na štúdium biologickej distribúcie a stability nanočastíc *in vivo* v potkanoch kmeňa Wistar.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; amino-modifikácia; hypertermia; rádionuklid; teranostika

---

## Úvod

Magnetické nanočastice (MNPs) sú materiálom, ktorý napriek mnohoročným výskumom má stále potenciál zaujať a poskytovať priestor na ďalšie zaujímavé experimenty v rozličných oblastiach techniky, vedy alebo medicíny. Vlastnosti nanočastíc potenciálne použiteľných v medicínskych aplikáciách musia spĺňať rôzne kritériá ohľadom veľkosti, povrchového náboja, stability v biologických médiách podobných vnútornému prostrediu organizmu, cytotoxicity, či biologickej kompatibility. Preto je dôležité pripravené vzorky stabilizovať s ohľadom na predpokladané použitie, a tiež ich dôkladne charakterizovať rôznymi metódami z rôznych hľadísk (vlastností). Magnetické nanočastice sú často študované ako možné nosiče liečiv pre rozličné terapie, ako aj diagnostické metódy, napr. magnetická rezonancia. Kombináciou týchto možností je teranostika (z angl. theranostics = therapy + diagnostics). Teranostický prístup teda umožňuje zobrazenie a liečbu zároveň.

Hypertermia je považovaná za perspektívnu metódu vhodnú na podporu liečby nádorových ochorení, pri ktorej je nádorové tkanivo selektívne zahriate na vyššiu teplotu (~41-46 °C), pričom sa využíva fakt, že nádorové tkanivo je menej odolné voči vyššej teplote než zdravé, a teda môže byť takto redukované, až úplne zničené. Pri magnetickej hypertermii sa na ohrev použijú magnetické nanočastice, ktoré po umiestnení do vonkajšieho striedavého magnetického poľa sú schopné generovať

teplo. Jód-131 ( $^{131}\text{I}$ ) sa používa v klinickej praxi na diagnostiku (zobrazovanie) a tiež pri liečbe rakoviny štítnej žľazy. Jeho fyzikálno-chemické charakteristiky ( $t_{1/2} = 8,02$  d,  $E_{\beta} \sim 0,607$  MeV) a emisia  $\gamma$ -žiarenia umožňuje monitorovanie prebiehajúcej terapie. Lutécium-177 s podobne výhodnými vlastnosťami ( $^{177}\text{Lu}$ ,  $t_{1/2} = 6,7$  d) je ideálny teranostický rádionuklid s energiou 497 keV, ktorá preniká 2 mm do vnútra tkaniva, pričom emituje fotóny  $\gamma$ -žiarenia. Tento rádionuklid je používaný pre diagnostiku a liečbu niektorých karcinómov. Cieľom tejto práce bolo pomocou rádio-značenia amino modifikovaných magnetických nanočastíc pripraviť biokompatibilné nanočastice umožňujúce teranostický prístup k zobrazovaniu a liečbe niektorých tumorov.

### Experimentálne metódy a výsledky

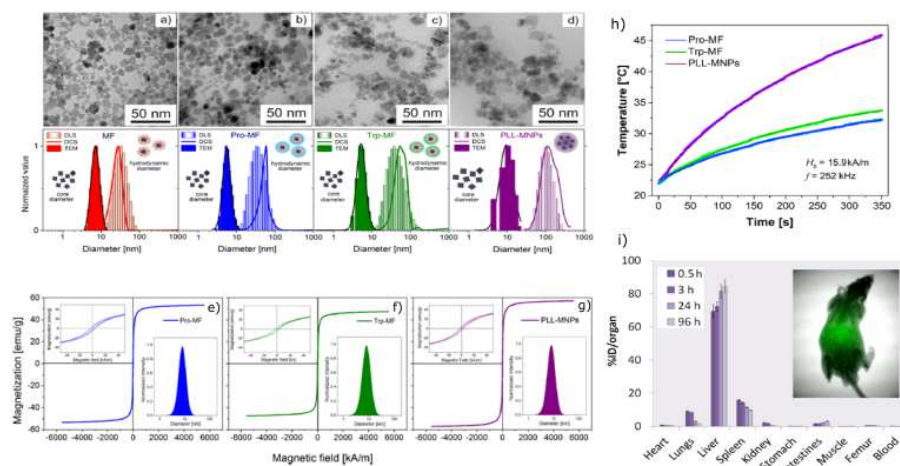
Magnetické nanočastice boli pripravené koprecipitáciou železitých a železnatých iónov v zásaditom prostredí postupom opísaným v našich predchádzajúcich prácach [1,2]. Častice boli ďalej modifikované vybranými aminokyselinami - prolínom, tryptofánom a poly-L-lyzínom, pričom vznikli stabilné kolooidné magnetické kvapaliny označené ako Pro-MF, Trp-MF a PLL-MNPs. Takto pripravené nanočastice boli charakterizované z hľadiska rozmerovej distribúcie pomocou metódy dynamického rozptylu svetla  $D_{HYDR}$ , diferenciálnej centrifugačnej sedimentácie DCS,  $D_{DCS}$ , a tiež elektrónovej mikroskopie  $D_{TEM}$  (Obr.1a-d). Namerané hodnoty zeta potenciálu  $\xi$  blízko 30 mV indikujú dostatočnú stabilitu vzoriek. Z meraní závislosti zeta potenciálu od pH bol nájdený izoelektrický bod vzoriek (IEP). Meraním vzoriek v statickom magnetickom poli boli zaznamenané magnetizačné krivky, z ktorých boli zistené hodnoty magnetizácie  $M_S$  a ich fitovaním bol získaný rozmer magnetického jadra nanočastíc  $D_{MAG}$  (Obr.1e-g). Pomocou UV/VIS spektro-

**Tabuľka 1:** Fyzikálne vlastnosti magnetických nanočastíc modifikovaných prolínom (Pro), tryptofánom (Trp) a PLL.

	Vzorky		
	Pro-MF	Trp-MF	PLL-MNPs
$D_{HYDR}$ [nm]	41.5±0.3	49.7±0.5	112.6±0.3
$\xi$ [mV]	28.6±1.5	25.0±1.8	34.4±0.9
IEP	6.05	6.03	10.8
$D_{DCS}$ [nm]	53.8±0.4	58.5±0.5	107.8±0.6
$D_{TEM}$ [nm]	8.5±0.3	8.6±0.1	11.1±1.0
$M_S$ (300 K) [emu/g]	53.4±0.1	47.1±0.1	57.2±0.2
$D_{MAG}$ [nm]	9.6±0.1	10.0±0.1	9.9±0.1
modif./ MNPs [mg/mg]	0.9	0.25	0.13
SAR [W/g]	47.9	55.7	99.7

skopie bolo stanovené množstvo príslušnej aminokyseliny vo vzorkách vyjadrené ako hmotnosť modifikantu (aminokyseliny) pripadajúca na jednotku hmotnosti magnetitu. Ako komplementárna metóda na potvrdenie týchto výsledkov bola použitá termogravimetrická analýza. Pripravené vzorky boli skúmané aj z hľadiska hypertermie, teda bola meraná ich schopnosť ohrevu - produkcie tepla pôsobením striedavého magnetického poľa. Vypočítané hodnoty SAR koeficientu pre častice modifikované prolínom a tryptofánom indikujú nižšiu ohrievaciu schopnosť, avšak vzorka PLL-MNPs vykazovala veľmi dobrú schopnosť ohrevu (Obr.1h). Vlastnosti získané z jednotlivých techník sú zhrnuté v tabuľke 1.

Amino modifikované magnetické nanočastice boli ďalej značené rádionuklidmi  $^{131}\text{I}$  a  $^{177}\text{Lu}$ . Po procese značenia bola meraná výťažnosť tejto reakcie a rádiochemická čistota vzoriek. Vzorky značené jódom mali nižšiu výťažnosť a ich stabilita vo fyziologickom roztoku resp. v sére nebola dostatočujúca. Lepšie výsledky boli získané pre vzorky značené lutéciom, pričom vzorky PLL-MNPs pripravené pri zvýšenej teplote (80 °C) mali výnimočne dobrú stabilitu v obidvoch skúšobných médiách po dobu viac ako 96 hodín, a tiež vysokú rádiochemickú čistotu. Práve tieto vzorky  $^{177}\text{Lu}$ -PLL-MNPs (80 °C) boli vybrané na štúdium biologickej distribúcie v organizme. Biodistribúcia rádio-značených nanočastíc bola študovaná na laboratórnych potkanoch kmeňa Wistar. Po intravenózne aplikácii nanočastíc (0,1 ml, zodpovedá 6  $\mu\text{g}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4$  /g hmotnosti pokusného zvierat'a) bola monitorovaná distribúcia častíc meraním rádioaktivity vo vybraných cieľových orgánoch vo zvolených



**Obr. 1:** (a-d) Snímky z TEM a distribúcie veľkosti častíc získané z DLS, DCS a TEM; (e-g) magnetizačné krivky a distribúcie veľkosti častíc z magnetizačných meraní; (h) časová závislosť teploty (ohrevu) a SAR z hypertermických meraní a (i) biodistribúcia nanočastíc  $^{177}\text{Lu}$ -PLL-MNPs (80 °C).



časových intervaloch ( $t = 0,5, 3, 24$  a  $96$  hodín). Výsledky sú zobrazené na Obr.1i [3].

## Záver

Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že vzorka poly-L-lyzínom modifikovaných nanočastíc dosiahla z hľadiska hypertermie najlepšie výsledky, pričom po značení lutéciom pri vyššej teplote ( $^{177}\text{Lu-PLL-MNPs}$  ( $80\text{ }^\circ\text{C}$ )) dosahovala veľmi dobrú *in vitro* a *in vivo* stabilitu a rádiochemickú čistotu. Zároveň umožnila monitorovanie biodistribúcie po dobu až  $96$  hodín. Tieto výsledky sú predpokladom pre ďalšie štúdium terapie tumorov založenej na hypertermii v kombinácii s rádioaktivitou, teda teranostickému prístupu k liečbe rakoviny.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Khmara I., Koneracka M., Kubovcikova M., Zavisova V., Antal I., Csach K., Kopcansky P., Vidlickova I., Csaderova L., Pastorekova S. and Zatovicova M., "Preparation of poly-L-lysine functionalized magnetic nanoparticles and their influence on viability of cancer cells", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **427**, (2017), 114–121, doi: 10.1016/j.jmmm.2016.11.014.
- [2] Antal I., Koneracka M., Kubovcikova M., Zavisova V., Khmara I., Lucanska D., Jelenka L., Vidlickova I., Zatovicova M., Pastorekova S., Bugarova N., Micusik M., Omasotova M. and Kopcansky P., "d,l-lysine functionalized  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles for detection of cancer cells", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **163**, (2018), 236–245, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.022.
- [3] Mirković M., Milanović Z., Perić M., Vranješ-Đurić S., Ognjanović M., Antić B., Kuraica M., Krstić I., Kubovcikova M., Antal I., Sobotova R., Zavisova V., Jurikova A., Fabian M. and Koneracka M., "Design and preparation of proline, tryptophan and poly-l-lysine functionalized magnetic nanoparticles and their radiolabeling with  $^{131}\text{I}$  and  $^{177}\text{Lu}$  for potential theranostic use", *International Journal of Pharmaceutics*, **628**, (2022), 122 288, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122288.

## Nanopórovitá silika ako nosič liečiva

V. Zeleňák<sup>1</sup>, E. Beňová<sup>1</sup>, A. Zeleňáková<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>2</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

\* email korešpondujúceho autora: vladimir.zelenak@upjs.sk

---

**ABSTRAKT** Vývoj nových, účinnejších systémov podávania liečiv je veľmi dôležitou otázkou, ktorú musí dnešná moderná spoločnosť riešiť. Lieky sú nevyhnutnou súčasťou ľudského života a v prípade potreby slúžia na vyvolanie terapeutického účinku pri rôznych chorobných stavoch. Vzhľadom na starnutie populácie, spotreba liekov v posledných rokoch neustále stúpa s čím súvisí aj množstvo zdokumentovaných nežiaducich účinkov spôsobených liekmi. Táto otázka je zvlášť aktuálna na Slovensku, kde je spotreba liekov podľa najaktuálnejších správ OECD jedna z najvyšších v rámci Európskej únie. Osobitne lieky s nízkou špecifickosťou a rozpustnosťou vedú k tomu, že pre dosiahnutie požadovaného terapeutického efektu sú pacienti nútení užívať ich vysoké dávky, čo vedie k vedľajším účinkom. Zvlášť sa to týka liekov s úzkym terapeutickým oknom, ako napríklad cytotoxické chemoterapeutiká, antivirotiká.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** nanopórovitá silika; podávanie liečiv; hydrofóbne liečivá; antivirotiká

---

## Úvod

Vysoké a/alebo časté dávky liekov, ich následná absorpcia na nežiaducich miestach majú za následok suboptimálnu koncentráciu bioaktívnych látok v cieľových miestach účinku, čo vedie k zoslabeniu terapeutického efektu. Nedostatok špecificity liekov a ich vysoké dávky vedú k interakciám liečiv so zdravými tkanivami alebo bunkami. Napríklad vankomycín, antibiotikum s baktericídnym účinkom proti grampozitívnym baktériám, vyžaduje pre optimálnu účinnosť vysokú nárazovú dávku. Avšak táto dávka nesmie presiahnuť hmotnosť viac ako 4 g, pretože potom liek pôsobí nefrotoxicky. Na druhej strane, pri znížení dávky je koncentrácia liečiva príliš nízka a liečivo má malú terapeutickú účinnosť.

Riešením načrtnutých problémov je vývoj biokompatibilných nosičov liečiv, ktoré sú schopné prijať vysoké dávky molekúl liečiva a liečivo dopraviť cielene bez jeho predčasného uvoľnenia. Použitím takýchto systémov je možné dopraviť lieky priamo na miesto terapeutického účinku, čo môže viesť k zníženiu dávky liekov a s tým súvisiacich nežiaducich vplyvov spojených s užívaním nadmerného množstva liečiva. Využitie nosičov je obzvlášť prospešné v prípade liečiv, ktorých aplikácia je sťažená napr. ich hydrofóbnosťou. Príkladom môže byť protirakovinové liečivo paclitaxel, u ktorého dosiahnutie účinnej koncentrácie v mieste účinku je v dôsledku jeho nízkej rozpustnosti pomerne obtiažne. Vývoj nových systémov na

podávanie liečiv má okrem spoločenských aspektov aj značné ekonomické benefity. Vytvorením účinnejších systémov na podávanie hydrofóbných liekov by bolo možné ročne ušetriť viac ako 8 miliárd USD.

V priebehu posledných troch desaťročí boli na dopravu liečiv alebo bioaktívnych látok vyvinuté rôzne typy nosičov, napr. polyméry, mikroguličky, nanočastice, dendriméry a lipozómy. Efektívne a moderné systémy na dodávku liekov musia v čo najväčšej miere spĺňať niekoľko požiadaviek: (i) nosný materiál musí byť biokompatibilný; (ii) systém má mať schopnosť adsorbovať a uskladniť veľké množstvo liečiva; (iii) nemá dochádzať k predčasnemu uvoľneniu, resp. vylúhovaniu liečiva z materiálu; (iv) materiál má vykazovať špecificitu k tkanivám alebo bunkám, resp. umožniť cieleň, vektorový transport liečiva; (v) rýchlosť uvoľňovania liečiva má byť kontrolovateľná, aby bolo možné dosiahnuť jeho účinnú lokálnu terapeutickú koncentráciu. Násť materiál, ktorý by mal vysokú afinitu k liečivu potrebnú pre jeho uzavretie, a súčasne bol schopný ochotne uvoľniť liečivo po dosiahnutí určitého terapeutického miesta v organizme (bunky, tkanivá) je netriviálne. U vyššie uvedených materiálov (polyméry, mikroguličky, dendriméry, lipozómy) dochádza často za fyziologických podmienok k ich rýchlej štruktúrnej degradácii vplyvom rôznych chemických faktorov (napr. pH). Zvyčajne je u týchto biologicky degradovateľných materiálov ťažké zabrániť predčasnemu uvoľneniu liečiva z ich pórovitého systému a v mnohých prípadoch uvoľnenie liečiva začína ihneď po zavedení materiálu do organizmu. Preto je dôležité vyvinúť nosiče, ktoré by nepodliehali rýchlej degradácii a ktoré by nevykazovali vylúhovanie liečiva skôr, kým transportný systém nedosiahne určené miesto účinku. Tým sa zabezpečí vysoká terapeutická koncentrácia liečiva práve v požadovanom mieste. Preto sa súčasný výskum v oblasti nosičov liečiv sústreďuje na vývoj systémov, ktoré sú rigidné a štruktúrne stabilné, a ktoré sú súčasne schopné dopraviť veľké množstvo liečiva bez predčasného uvoľnenia k cieľovému tkanivu, alebo dokonca aj k vnútrobunkovým organelám.

Medzi štruktúrne stabilné materiály, ktoré sú z tohto hľadiska veľmi perspektívne patria nanopórovité materiály na báze oxidu kremičitého. Oxid kremičitý má vhodné chemické vlastnosti, stabilitu a biokompatibilitu. Okrem týchto faktorov, použitie usporiadaného nanopórovitého oxidu kremičitého ako nosiča liečiva má aj ďalšie výhody vyplývajúce z jednoduchosti prípravy, ľahkej povrchovej modifikácie, veľkosti povrchu a veľkosti a objemu pórov. Unikátna usporiadaná nanopórovitá štruktúra SiO<sub>2</sub> umožňuje efektívne uzatvorenie liečiv a ich následné riadené uvoľňovanie. Veľkosť pórov je možné pri syntéze cielene meniť, takže do takýchto materiálov je možné uzavrieť liečivá rôznej veľkosti. Osobitnú pozornosť si vyžaduje ľahká povrchová modifikácia, prostredníctvom ktorej je možné ovplyvniť vlastnosti povrchu tak, aby bol hydrofóbnejší alebo hydrofilnejší. Na povrch materiálu je možné naviazať rôzne funkčné skupiny, ktoré ovplyvňujú rýchlosť uvoľňovania liečiva, alebo je možné povrch modifikovať špecifickými záchytnými liganďami, ktoré umožňujú cieleň transport liečiva k požadovanému miestu účinku. Pórovitý oxid kremičitý je schopný uchovávať a postupne uvoľniť terapeuticky vý-

znamné liečivá, avšak, používa sa aj na zvýšenie biokompatibility iných systémov. Výhodou nanočastíc oxidu kremičitého je, že sú netoxické a biokompatibilné. Povrchovo modifikované častice nanopórovitého oxidu kremičitého sú absorbované živočíšnymi a rastlinnými bunkami *in vitro* bez pozorovanej cytotoxicity. Preto sú takéto častice perspektívne aj v rámci vývoja novej generácie nosičov liečiv a biosenzorov pre intracelulárne riadené uvoľňovanie liečiv a pre zobrazovacie aplikácie (bioimaging).

V posledných rokoch sa čoraz väčší dôraz kladie na vývoj nosičov umožňujúcich ciele uvoľňovanie liečiva vplyvom fyzikálnych a chemických stimulov. Na základe týchto poznatkov a veľkého potenciálu usporiadanej nanopórovitej siliky na dodávanie liečiv sme v našich predchádzajúcich prácach popísali rôzne mezoporézne častice oxidu kremičitého na uvoľňovanie liečiva riadené pH [1,2] uvoľňovanie riadené redoxným potenciálom [3], uvoľňovanie liečiva riadené teplotou [4] alebo uvoľňovanie liečiva riadené svetlom [5,6]. Okrem fyzikálno-chemickej charakterizácie sme študoval biokompatibilitu a cytotoxicitu pripravených systémov *in vitro* na bunkách U87 MG a SKBR3 [1,2,7,8] ako aj *in vivo* testy na laboratórnych zvieratách [9].

## Záver

V rámci tejto práce sme sa sústredili na uzatváranie antivirov, ako napr. Lopinavir, do mezopórovitej siliky. Lopinavir je slabo rozpustné liečivo. Približne 40% uznávaných liekov dostupných na trhu je slabo rozpustných vo vode a takmer 70% nových kandidátskych liekov vykazuje nízku rozpustnosť vo vode, čo vedie k zníženiu biologickej dostupnosti. Výhodou nanopórovitej siliky je, že môže byť použitá ako pre hydrofilné aktívne látky, tak aj pre lieky zle rozpustné vo vode zvýšením ich rozpustnosti a následným zvýšením ich biologickej dostupnosti. Keď sú molekuly liečiva nerozpustného vo vode obsiahnuté v mezoporéznom oxide kremičitom, uzatvorenie v mezopóroch môže znížiť kryštalizáciu amorfného liečiva. V porovnaní s kryštalickým liečivom amorfné liečivo nevykazuje energiu kryštálovej mriežky, čo následne vedie k zlepšenej rýchlosti rozpúšťania a zvýšenej biologickej dostupnosti. V rámci konferencie budú prezentované výsledky, získané pri uzatváraní liečiva lopinavir v mezopórovitom systéme.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

**Literatúra**

- [1] Beňová E., Bergé-Lefranc D., Zeleňák V., Almáši M., Huntošová V. and Hornebecq V., "Adsorption properties, the pH-sensitive release of 5-fluorouracil and cytotoxicity studies of mesoporous silica drug delivery matrix", *Applied Surface Science*, **504**, (2020), 144 028, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.144028.
- [2] Beňová E., Hornebecq V., Zeleňák V., Huntošová V., Almáši M., Máčajová M. and Bergé-Lefranc D., "pH-responsive mesoporous silica drug delivery system, its biocompatibility and co-adsorption/co-release of 5-fluorouracil and naproxen", *Applied Surface Science*, **561**, (2021), 150 011, doi: 10.1016/j.apsusc.2021.150011.
- [3] Žid L., Zeleňák V., Girman V., Bednarčík J., Zeleňáková A., Szűcsová J., Hornebecq V., Hudák A., Šuleková M. and Váhovská L., "Doxorubicin as cargo in a redox-responsive drug delivery system capped with water dispersible ZnS nanoparticles", *RSC Advances*, **10**(27), (2020), 15 825–15 835, doi: 10.1039/d0ra02091e.
- [4] Zauska L., Bova S., Benova E., Bednarcik J., Balaz M., Zelenak V., Hornebecq V. and Almasi M., "Thermosensitive drug delivery system SBA-15-PEI for controlled release of nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium salt: A comparative study", *Materials*, **14**(8), (2021), 1880, doi: 10.3390/ma14081880.
- [5] Zeleňák V., Beňová E., Almáši M., Halamová D., Hornebecq V. and Hronský V., "Photo-switchable nanoporous silica supports for controlled drug delivery", *New Journal of Chemistry*, **42**(16), (2018), 13 263–13 271, doi: 10.1039/c8nj00267c.
- [6] Beňová E., Zeleňák V., Halamová D., Almáši M., Petruľová V., Psoťka M., Zeleňáková A., Bačkor M. and Hornebecq V., "A drug delivery system based on switchable photo-controlled p-coumaric acid derivatives anchored on mesoporous silica", *Journal of Materials Chemistry B*, **5**(4), (2017), 817–825, doi: 10.1039/c6tb02040b.
- [7] Almáši M., Beňová E., Zeleňák V., Madaj B., Huntošová V., Brus J., Urbanová M., Bednarčík J. and Hornebecq V., "Cytotoxicity study and influence of SBA-15 surface polarity and pH on adsorption and release properties of anticancer agent pemetrexed", *Materials Science and Engineering: C*, **109**, (2020), 110 552, doi: 10.1016/j.msec.2019.110552.
- [8] Zeleňáková A., Szűcsová J., Nagy L., Girman V., Zeleňák V. and Huntošová V., "Magnetic characterization and moderate cytotoxicity of magnetic mesoporous silica nanocomposite for drug delivery of naproxen", *Nanomaterials*, **11**(4), (2021), 901, doi: 10.3390/nano11040901.
- [9] Almáši M., Matiašová A.A., Šuleková M., Beňová E., Ševc J., Váhovská L., Lisnichuk M., Girman V., Zeleňáková A., Hudák A. and Zeleňák V., "In vivo study of light-driven naproxen release from gated mesoporous silica drug delivery system", *Scientific Reports*, **11**(1), doi: 10.1038/s41598-021-99678-y.

## Identifikácia SiO<sub>2</sub>@MNPs nanočastíc pre efektívnu magnetickú separáciu RNA

A. Antošová<sup>1</sup>, Z. Bednáriková<sup>1</sup>, M. Kubovčíková<sup>1</sup>, I. Antal<sup>1</sup>, M. Gančár<sup>1</sup>, R. Sobotová<sup>1</sup>, D. Fedunová<sup>1</sup>, V. Závišová<sup>1</sup>, A. Zeleňáková<sup>2</sup>, M. Barutiak<sup>2</sup>, M. Koneracká<sup>1</sup>, Z. Gažová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.v.i., Watsonova 47, 040 01 Košice

<sup>2</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

\* email korešpondujúceho autora: antosova@saske.sk

**ABSTRAKT** Študovali sme biologickú aktivitu SiO<sub>2</sub>@MNPs - superparamagnetických nanočastíc oxidu železnato-železitého (MNPs) obalených vrstvou oxidu kremičitého (SiO<sub>2</sub>) s rozdielnou hrúbkou dosiahnutou použitím rôzneho pomeru tetraetylortosilikátu (TEOS) ku magnetitu. Naším cieľom bolo selektovať vzorky s najvyšším potenciálom viazať a separovať RNA. Zistili sme, že väzbová afinita nanočastíc voči RNA a účinnosť jej magnetickej separácie sú závislé od veľkosti nanočastíc v súvislosti s pomerom TEOS/MNPs (v/w). Biologicky najúčinnnejšie boli rozmerovo menšie SiO<sub>2</sub>@MNPs s pomermi TEOS/MNPs rovnými 2,0 a 1,0. SiO<sub>2</sub>@MNPs s pomerom 2,0 bola následne modifikovaná rôznymi organickými ligandmi s cieľom zvýšiť ich separačnú účinnosť. Najlepšie výsledky boli získané pre nanočastice modifikované chitozánom (Chit)-SiO<sub>2</sub>@MNPs a 3-aminopropyltrietyloxysilánom (APTES)-SiO<sub>2</sub>@MNPs. Cytotoxická štúdia ukázala ich zanedbateľný toxický účinok na sledované bunkové línie. Naše výsledky dokazujú, že (Chit)- a (APTES)-SiO<sub>2</sub>@MNPs sú sľubnými kandidátmi na klinickú aplikáciu v súvislosti s extrakciou vírusovej RNA.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; oxid kremičitý; ligandy; separácia RNA

## Úvod

Nanočastice sú materiály s jedinečnými vlastnosťami, ktoré sú dané ich zložením a výrazne vysokým pomerom povrchu k objemu [1]. Magnetické nanočastice (MNPs) majú okrem toho ďalšie významné vlastnosti, ako napr. nenulový magnetický moment, dobrú disperzibilitu, homogénnu rozpustnosť a rýchle a účinné viazanie biomolekúl. Po aplikácii vonkajšieho magnetického poľa vytvárajú nanočastice klástre, čo umožňuje ich separáciu z roztoku spolu s naviazanými biomolekulami, ako sú enzýmy, nukleové kyseliny (NK) a proteíny [2]. Tento prístup ponúka vysokú špecifickosť, rýchlu separáciu, dobrú reprodukovateľnosť a dnes je široko používaný v mnohých biotechnologických a medicínskych oblastiach [2–4]. Z tohto hľadiska MNPs vďaka svojim unikátnym vlastnostiam predstavujú užitočný a jednoduchý systém na efektívne koncentrovanie, purifikáciu a separáciu NK [5], ktorý je v prípade klinických vzoriek nevyhnutný na detekciu RNA vírusov a baktérií pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). V súčasnosti boli nasyntetizované rôzne mikrometrové magnetické častice obalené SiO<sub>2</sub>, ktoré skrátili purifikačné postupy

PCR a zvýšili účinnosť a citlivosť detekcie RNA [6,7]. V prípade nanočastíc, vysoký pomer povrchu k objemu ponúka možnosť efektívnejšej separácie NK v porovnaní s mikročasticami. SiO<sub>2</sub>@MNPs poskytujú navyše väzby medzi NK a oxidom kremičitým, ktoré závisia od jeho dehydratácie, medzimolekulových elektrostatických interakcií a vodíkových väzieb [8,9]. Modifikácia SiO<sub>2</sub>@MNPs organickými ligandami umožňuje zvýšenie ich špecifickosti a separačnej efektivity [10].

## Experimentálne metódy a výsledky

SiO<sub>2</sub>@MNPs s rôznym pomerom TEOS/MNPs boli pripravené dvojstupňovou syntézou na základe postupu opísaného v práci Khmara *a kol.* [11] a podľa protokolu BOMB [12]. SiO<sub>2</sub>@MNPs s pomerom TEOS/MNPs (v/w) rovnými 2,0 (SiO<sub>2</sub>@MNPs 2,0) boli modifikované organickými ligandami: polylyzín (PLL), chitozán, 3-amino-propyltriethoxysilán (APTES), 3-merkaptopropyltrimetyloxysilán (MPTMS) a 3-trimethoxysilylpropylmetakrylát (MMSP). Schopnosť študovaných SiO<sub>2</sub>@MNPs viazať RNA bola detegovaná pomocou fluorescenčnej metódy vytesňovania etídium bromidu (EtBr) [13]. Koncentrácia zásobného roztoku v pufrí (10 mM TRIS-0,1 mM EDTA, pH 8,0, bez DNA, RNA) bola 1 mM. 1 mg RNA bol rozpustený v 1 mL 10 mM fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,4), sonifikovaný po dobu 10 minút a následne zriedený tlmivým roztokom 10 mM TRIS-EDTA na finálnu koncentráciu 50 µg/mL. Následne boli pripravené roztoky RNA s EtBr v koncentračnom pomere 5:1. Nanočastice SiO<sub>2</sub>@MNPs boli pridané ku komplexom RNA-EtBr v širokom koncentračnom rozsahu (pomer SiO<sub>2</sub>@MNPs k RNA-EtBr bol od 500:1 do 1:200). Schopnosť nanočastíc viazať sa do RNA bola sledovaná pomocou fluorescencie EtBr ( $\lambda_{ex}$ =545 nm;  $\lambda_{em}$  = 595-700 nm), ktorá bola zaznamenaná po 30 minútach inkubácie v tme pri 25 °C v čiernej 96-jamkovej platničke pomocou spektrofotometra Synergy Mx (BioTek Company, USA). Vzorky boli vyhodnocované voči samotným SiO<sub>2</sub>@MNPs (kontrola = 0%) a samotnej RNA bez prítomnosti SiO<sub>2</sub>@MNPs (kontrola = 100 %). Každý experiment bol uskutočnený 3 až 6-krát a uvádzané hodnoty predstavujú priemer nameraných údajov.

Hodnoty EC<sub>50</sub> predstavujú koncentráciu SiO<sub>2</sub>@MNPs s 50 % účinnosťou vytesnenia EtBr z RNA, čo zodpovedá ich väzobnému potenciálu (Tabuľka 1). Nemodifikované SiO<sub>2</sub>@MNPs s TEOS/MNPs pomerom 0,4 a 1,0 vykazovali najnižšie hodnoty EC<sub>50</sub>, a teda najvyššiu afinitu k RNA. Najnižšia účinnosť bola zistená pre vzorku s pomerom TEOS/MNPs = 3,0. Pre vyššie pomery TEOS/MNPs = 4,0 a 5,0 bolo pozorované zvýšenie účinnosti vytesnenia EtBr. V prípade modifikovaných nanočastíc SiO<sub>2</sub>@MNPs 2,0 najvyššiu afinitu voči RNA mali SiO<sub>2</sub>@MNPs modifikované ligandmi APTES, Chit a PLL.

Na sledovanie účinnosti separácie RNA pomocou SiO<sub>2</sub>@MNPs bol použitý jednoduchý protokol "viazanie-premytie-elúcia". RNA (1 mg/mL) bola inkubovaná v prítomnosti SiO<sub>2</sub>@MNPs (40 mg/mL) a väzbového tlmivého roztoku (1,25 M NaCl) s 10 % obsahom PEG 20 000. RNA naviazaná na SiO<sub>2</sub>@MNPs bola extrahovaná po-

**Tabuľka 1:** RNA-väzbový potenciál a účinnosť magnetickej separácie SiO<sub>2</sub>@MNPs s rôznymi pomermi TEOS/MNPs (0,4; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0) a SiO<sub>2</sub>@MNPs (2,0) modifikovaných organickými ligandmi.

Vzorky	Biologická aktivita	
	Väzbový potenciál EC <sub>50</sub> [mg/mL]	Separáčnā efektivita [%]
Nemodifikované SiO <sub>2</sub> @MNPs pomer TEOS/MNPs		
0,4	0,8	N/A
1,0	0,8	36,5
2,0	2,1	37,6
3,0	N/A	7,1
4,0	5,3	6,6
5,0	4,8	3,6
Modifikované SiO <sub>2</sub> @MNPs 2,0		
2,0 (kontrola)	1,6*	3,9
PLL	3,4	34,0
Chit	1,3	58,6
2,0 (kontrola)	13,5 <sup>†</sup>	7,4
MMSP	5,2	2,3
MPTMS	4,0	0,4
APTES	1,8	66,8

\* Hodnoty EC<sub>50</sub> vzťahované na hmotnosť magnetitu

<sup>†</sup> Hodnoty EC<sub>50</sub> vzťahované na kompletnú hmotnosť SiO<sub>2</sub>@MNPs (vrátane SiO<sub>2</sub> a ligandov)

N/A – nedalo sa určiť

užitím vonkajšieho magnetického póla, následne bola v eluovanom roztoku stanovená koncentrácia RNA. SiO<sub>2</sub>@MNPs 1,0 a 2,0 extrahovali 36,5 %, resp. 37,6 % RNA, pričom SiO<sub>2</sub>@MNPs s vyššími pomermi TEOS/MNPs vykazovali veľmi slabú separáčnú účinnosť od ~4 % do 7 %. Na základe najlepšej separáčnej účinnosti boli SiO<sub>2</sub>@MNPs s pomerom 2,0 modifikované organickými ligandmi. Získané výsledky poukazujú na to, že prítomnosť ligandov viedla v niektorých prípadoch k zvýšeniu RNA-separáčnej efektivity, konkrétne v prípade Chit na hodnotu 58,6 % a APTES na hodnotu 66,8 %.

Pre nemodifikované SiO<sub>2</sub>@MNPs a SiO<sub>2</sub>@MNPs 2,0 modifikované PPL a Chit bola stanovená ich cytotoxicita pomocou LDH metódy. Obličkové bunky línie HEK 293 boli inkubované 24 h a 48 h v prítomnosti zvyšujúcej sa koncentrácie nanočastíc (0,01 – 50 µg/mL). V prípade nemodifikovaných SiO<sub>2</sub>@MNPs pri ich najvyššej koncentrácii (50 µg/mL) došlo po 24 h k zníženiu prežívania buniek až na ~72 %. Po 48 h inkubácii bola životaschopnosť buniek porovnateľná so životaschopnos-



ťou kontrolných buniek. Nanočastice modifikované Chit spôsobili pokles životaschopnosti buniek o ~15 %. Tento efekt nebol pozorovaný po 48 h inkubácii kedy bolo prežívanie buniek porovnateľné s kontrolnými bunkami. Na základe získaných výsledkov je možné konštatovať, že zvýšenie koncentrácie SiO<sub>2</sub>@MNPs, pomeru TEOS/MNPs a druh povrchovej modifikácie ligandmi významne neovplyvnili morfológiu a počet živých buniek ani po 48 h inkubácii.

## Záver

V tejto štúdií sme sa zamerali na identifikáciu SiO<sub>2</sub>@MNPs nanočastíc vhodných na magnetickú separáciu RNA. Fluorescenčná technika vytesňovania EtBr ukázala, že SiO<sub>2</sub>@MNPs s pomermi TEOS/MNPs 1,0 a 2,0 vykazovali najvyššiu afinitu k RNA. Najlepšia RNA-separačná účinnosť bola určená pre SiO<sub>2</sub>@MNPs 2,0, a to ~37 %. Modifikáciu povrchu SiO<sub>2</sub>@MNPs 2,0 organickými ligandmi APTES, Chit a PLL sme dosiahli ďalšie zvýšenie ich väzbového potenciálu. Takmer 2-násobné navýšenie separačnej efektivity (~69 %) bolo pozorované pre nanočastice modifikované s APTES. Naše štúdie ukázali, že študované SiO<sub>2</sub>@MNPs nemajú výrazný vplyv na prežívanie buniek. Získané výsledky poukazujú na to, že SiO<sub>2</sub>@MNPs sú sľubnými kandidátmi pre klinickú aplikáciu v súvislosti s extrakciou vírusovej RNA.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Jans H. and Huo Q., "Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis", *Chem. Soc. Rev.*, **41**(7), (2012), 2849–2866, doi: 10.1039/c1cs15280g.
- [2] Tang C., He Z., Liu H., Xu Y., Huang H., Yang G., Xiao Z., Li S., Liu H., Deng Y., Chen Z., Chen H. and He N., "Application of magnetic nanoparticles in nucleic acid detection", *Journal of Nanobiotechnology*, **18**(1), doi: 10.1186/s12951-020-00613-6.
- [3] Xie H., Dong J., Duan J., Hou J., Ai S. and Li X., "Magnetic nanoparticles-based immunoassay for aflatoxin b1 using porous g-c3n4 nanosheets as fluorescence probes", *Sensors and Actuators B: Chemical*, **278**, (2019), 147–152, doi: 10.1016/j.snb.2018.09.089.
- [4] Geeitha S. and Thangamani M., "Qualitative analysis for improving prediction accuracy in parkinson's disease detection using hybrid technique", *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, **16**(2), (2019), 393–399, doi: 10.1166/jctn.2019.7738.
- [5] Srivastava M., Srivastava N., Mishra P. and Malhotra B.D., "Prospects of nanomaterials-enabled biosensors for COVID-19 detection", *Science of The Total Environment*, **754**, (2021), 142363, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142363.

- [6] Akutsu J., Tojo Y., Segawa O., Obata K., Okochi M., Tajima H. and Yohda M., "Development of an integrated automation system with a magnetic bead-mediated nucleic acid purification device for genetic analysis and gene manipulation", *Biotechnology and Bioengineering*, **86**(6), (2004), 667–671, doi: 10.1002/bit.20049.
- [7] Ashtari P., He X., Wang K. and Gong P., "An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles", *Talanta*, **67**(3), (2005), 548–554, doi: 10.1016/j.talanta.2005.06.043.
- [8] Hossain S., Rahman M., Nahar Y., Rahman A., Sharafat M.K., Hossain M., Ochiai B., Elaissari A. and Ahmad H., "A simple in situ synthesis of iron oxide magnetic nanoparticles embedded in thermosensitive polymer for DNA capture", *Journal of Materials Research*, **35**(18), (2020), 2441–2450, doi: 10.1557/jmr.2020.192.
- [9] Hu W.P., Chen Y.C. and Chen W.Y., "Improve sample preparation process for miRNA isolation from the culture cells by using silica fiber membrane", *Scientific Reports*, **10**(1), doi: 10.1038/s41598-020-78202-8.
- [10] Palma R.D., Trekker J., Peeters S., Bael M.J.V., Bonroy K., Wirix-Speetjens R., Reekmans G., Laureyn W., Borghs G. and Maes G., "Surface modification of  $\gamma$   $\text{Fe}_2\text{O}_3$ @ $\text{SiO}_2$  magnetic nanoparticles for the controlled interaction with biomolecules", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **7**(12), (2007), 4626–4641, doi: 10.1166/jnn.2007.18116.
- [11] Khmara I., Kubovcikova M., Koneracka M., Kalska-Szostko B., Zavisova V., Antal I., Rajnak M., Dankova Z., Kavecansky V., Omastova M. and Kopcansky P., "Preparation and characterization of magnetic nanoparticles", *Acta Physica Polonica A*, **133**(3), (2018), 704–706, doi: 10.12693/APhysPolA.133.704.
- [12] Oberacker P., Stepper P., Bond D.M., Höhn S., Focken J., Meyer V., Schelle L., Sugrue V.J., Jeunen G.J., Moser T., Hore S.R., von Meyenn F., Hipp K., Hore T.A. and Jurkowski T.P., "Bio-on-magnetic-beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation", *PLOS Biology*, **17**(1), (2019), e3000107, doi: 10.1371/journal.pbio.3000107.
- [13] Goodman C.M., Chari N.S., Han G., Hong R., Ghosh P. and Rotello V.M., "DNA-binding by functionalized gold nanoparticles: Mechanism and structural requirements", *Chemical Biology & Drug Design*, **67**(4), (2006), 297–304, doi: 10.1111/j.1747-0285.2006.00372.x.

## Využitie experimentálnych magnetických nanočastíc NANO VIR na izoláciu vírusovej RNA z biologických vzoriek

**J. Košuth**<sup>1</sup>, **B. Kočíková**<sup>2</sup>, **A. Jacková**<sup>2</sup>, **J. Mačák**<sup>3</sup>, **E. Beňová**<sup>4</sup>, **V. Zeleňák**<sup>4</sup>, **A. Zeleňáková**<sup>5</sup>, **Š. Vilček**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 040 01 Košice

<sup>2</sup> Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

<sup>3</sup> Synlab Slovakia s.r.o., Opatovská cesta 10, 040 01 Košice

<sup>4</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>5</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

\* email korešpondujúceho autora: jan.kosuth@upjs.sk

**ABSTRAKT** Magnetické nanočastice (MNP) s povrchovou vrstvou na báze siliky predstavujú vhodný nástroj pre použitie v diagnostike patogénnych ochorení. Špecifické MNP schopné viazať nukleové kyseliny sa môžu využiť na izoláciu vírusovej nukleovej kyseliny, ktorá môže byť následne použitá pri detekcii génov vírusových ako dôkaz prítomnosti patogénu v analyzovanej vzorke. V tejto štúdii sme overili a experimentálne potvrdili vhodnosť experimentálnych MNP (eMNP) pripravených v rámci projektu NANO VIR na izoláciu vírusovej RNA. Úspešnú izoláciu RNA vírusu sme preukázali na dvoch experimentálnych modeloch, i.) izolácia a dôkaz prítomnosti vírusovej RNA v živočíšnom tkanive (dôkaz RNA vírusu hepatitídy E v tkanive pečene prasat'a) a ii.) izolácia a dôkaz vírusovej RNA v klinických vzorkách v tekutom transportnom médiu (dôkaz RNA vírusu SARS-CoV-2 v nosohltanových steroch). Všetky testovane eMNP sa ukázali ako vhodné pre izoláciu vírusovej RNA, pričom viaceré z nich ukázali porovnateľnú účinnosť pri izolácií ako komerčné MNP.

**KLÍČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; izolácia RNA; RT-qPCR; SARS-CoV-2; HEV

## Úvod

Súčasný pokrok v oblasti molekulárnej biológie a sekvenovania umožňuje rapídnu aplikáciu získaných poznatkov do aplikovaného výskumu vrátane molekulárnej diagnostiky. Táto nahrádza tradičnejšie kultivačné a metódy a antigénové testy. Dôkaz genómu patogénu v klinickej vzorke predstavuje rýchle a jednoznačné potvrdenie prítomnosti infekčného agensa. Extrakcia nukleových kyselín (NK) je jedným z prvotných krokov takejto diagnostiky a nevyhnutným predpokladom pre mnohé experimenty. Konvenčné metódy izolácie NK sú časovo náročné, s nízkym výťažkom a otáznou čistotou. V porovnaní s konvenčnými metódami, extrakcia NK na tuhej fáze (SPE, Solid Phase Extraction), ktorá je súčasťou väčšiny komerčných kolónkových extrakčných kitov umožňuje rýchlu a efektívnu izoláciu NK. Alternatívu predstavujú magnetické nanočastice (MNP) obalené silikou, ktoré kombinujú

rýchlosť a efektivitu SPE kolóniek s praktickosťou využitia magnetu na oddelenie NK naviazanej na povrch MNP. Súčasne predstavujú jednoduchý, veľmi účinný a ľahko automatizovateľný spôsob izolácie nukleových kyselín. Hlavnou podmienkou je vývoj a dostupnosť MNP schopných účinne viazať NK. V rámci projektu NANOVIR bola pripravená séria experimentálnych MNP (eMNP) s rozličnými povrchovými modifikáciami s cieľom efektívnej reverzibilnej väzby NK na nanočastice. Účinnosť tejto väzby sme testovali izoláciou vírusovej RNA z klinických vzoriek infikovaných dvoma rôznymi RNA vírusmi, vírus hepatitídy E v tkanive pečene prasaťa a vírus SARS-CoV-2 v nosohltanových steroch.

## Experimentálne metódy

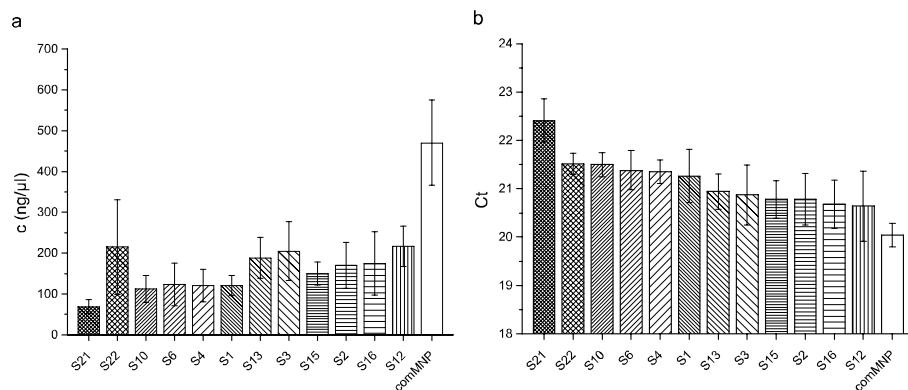
**Experimentálne magnetické nanočastice (eMNP).** Séria eMNP projektu NANOVIR: a) eMNP bez ligandov/povrchovej modifikácie (S1), b) eMNP s povrchovo naviazaným ligandom (S2, 3, 4, 6, 10, 12, 13, 15, 16) a c) eMNP s povrchovo modifikovaným poréznym povrchom (S21, S22 a S23). Vzorky/biologický materiál. Experimentálna vzorka tkaniva pečene ošípanej prirodzene infikovanej vírusom hepatitídy E (HEV), anonymizované vzorky sterov z nosohltanu a hrdla pacientov infikovaných vírusom SARS-CoV-2 (štandardné klinické vzorky vo vírusovom transportnom médiu).

**Izolácia vírusovej RNA.** Celková RNA bola izolovaná pomocou komerčne dostupných kitov: MagMAX™ – 96 Total RNA Isolation Kit a MagMax™ Viral RNA isolation Kit. MNP v komerčného kitu (comMNP) boli nahradené eMNP. Koncentrácia nahradených eMNP bola upravená na 130 mg/ml.

**Kvantifikácia izolovanej vírusovej RNA.** Množstvo izolovanej RNA sme kvantifikovali spektrofotometricky a detekciou/kvantifikáciou vírusovej RNA kvantitatívnou real-time RT-PCR (RT-qPCR). RT-qPCR: RNA vírusu HEV bola detegovaná jednokrokovou RT-qPCR pomocou kitu iTaq Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad) použitím špecifických PCR primérov a hybridizačnej sondy. RNA vírusu SARS-CoV-2 v izolátoch zo sterov bola detegovaná pomocou komerčného IVD-certifikovaného kitu COVID-19 Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Labsystems Diagnostics).

## Výsledky a diskusia

Cieľom našej práce bolo charakterizovať súbor experimentálnych nanočastíc (eMNP) s hľadiska ich využitia pri izolácii vírusovej RNA z biologických vzoriek. Väzba vírusovej RNA s eMNP bola testovaná na dvoch principiálne odlišných modeloch klinických vzoriek: i.) živočíšne tkanivo (vzorka pečene ošípanej infikovaná HEV) a ii.) klinické vzorky výterov v tekutom transportnom médiu (vzorky nosohltanových výterov pacientov infikovaných SARS-CoV-2).

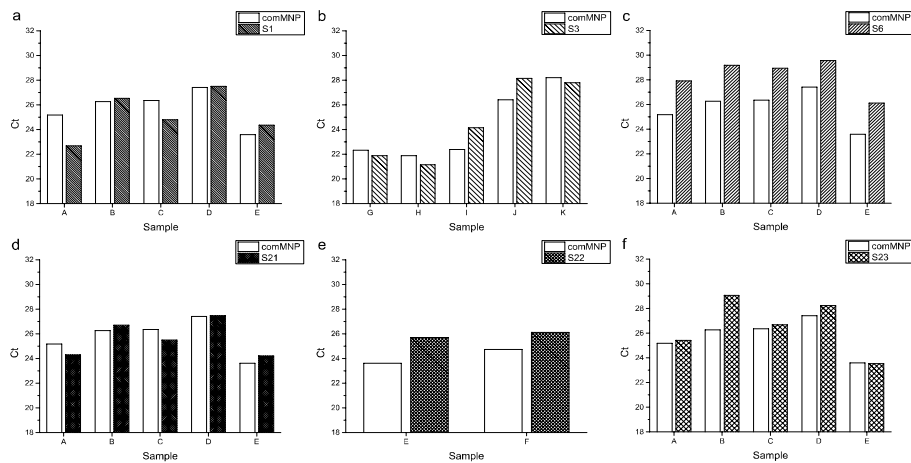


**Obr. 1:** Porovnanie účinnosti izolácie RNA z tkaniva pečene prasaťa infikovaného vírusom hepatitídy E (HEV) pomocou komerčných comMNP a experimentálnych MNP (S1-S22). a) spektrofotometrické stanovenie koncentrácie, b) Ct hodnoty kvantifikácie vírusovej RNA pomocou RT-qPCR. Hodnoty predstavujú priemer piatich opakovaných analýz.

**Aplikácia eMNP na izoláciu vírusovej RNA z tkaniva.** Testy so živočíšnym tkanivom boli uskutočnené na súbore 12 eMNP. Naše experimenty ukazujú, že všetky testované eMNP boli vhodné na izoláciu vírusovej RNA, ktorá bola aplikovateľná pre následnú RT-qPCR analýzu. Najvyššie množstvo izolovanej RNA (obr. 1a) bolo získané pri využití komerčných nanočastíc (comMNP, 470 ng/μl). Z testovaných eMNP bolo najvyššie množstvo RNA získané so vzorkou eMNP s povrchovo naviazaným ligandom MMSP - S12 (217 ng/μl), najnižšie so vzorkou eMNP s poréznym povrchom - S21 (69 ng/μl).

Pri hodnotení množstva vírusovej RNA v izolovaných vzorkách pomocou RT-qPCR (obr. 1b), boli dosiahnuté povzbudivé výsledky. Zatiaľ čo priemerná Ct hodnota kvantifikovanej vírusovej RNA izolovanej comMNP predstavovala hodnotu Ct = 20,0, vzorka eMNP bez ligandu naviazaného na magnetické jadro (S1) poskytla priemernú Ct = 21,2, čo naznačuje len mierne nižšiu účinnosť izolácie/detekcie vírusu. V súlade s koncentráciou RNA, najlepšie hodnoty Ct dosiahli vzorky S12 a S16 (priemerná Ct = 20,6), čo je porovnateľné s orgMNP z komerčného kitu. Na druhej strane vzorky S21 a S22 ako zástupcovia eMNP s poréznym povrchom viedli k priemernému Ct = 22,4 a 21,5.

**Aplikácia eMNP na izoláciu vírusovej RNA z výteru v kvapalnom médiu.** Šesť vybraných eMNP sa ďalej použilo na izoláciu vírusovej RNA z kvapalných vzoriek nosohltanových výterov pacientov infikovaných SARS-CoV-2. Hoci koncentrácia izolovanej RNA z klinických vzoriek bola pod limitom pre spoľahlivé spektrofotometrické meranie, úspešná izolácia vírusovej RNA bola potvrdená pomocou RT-



**Obr. 2:** RT-qPCR detekcia SARS-CoV-2 RNA izolovanej rôznymi MNP. Porovnanie hodnôt Ct SARS-CoV 2 špecifického génu ORF1ab detegovaného v RNA izolovanej z klinických výterov pomocou komerčných (comMNP) a experimentálnych magnetických nanočastíc (eMNP) – S1, S3, S6, S21, S22 a S23.

qPCR. Získané hodnoty Ct detegovaných vírusových génov naznačujú, že pripravené eMNP viažu vírusovú RNA veľmi vysokou efektívnosťou a majú vysoký potenciál pre využitie na izolácie RNA. Vírusová RNA bola detegovateľná vo všetkých testovaných izolátoch pomocou všetkých eMNP, to znamená, že aplikácia akýchkoľvek pripravených eMNP pri izolácii vírusovej RNA a následnej detekcii by dokázala potvrdiť infekciu SARS-CoV-2 v každej analyzovanej klinickej vzorke.

Vírusová RNA izolovaná pomocou comMNP (tu reprezentovaná hodnotami Ct génu ORF1ab) bola detegovaná v analyzovaných vzorkách medzi Ct = 21,9 až 28,2 (obr. 2). Na základe hodnôt Ct sme porovnateľné množstvá vírusovej RNA získali aj pomocou eMNP bez vrstvy ligandu (S1) a eMNP s modifikovanou poréznou vrstvou - S21 (obr. 2a, d). Ďalšie dva povrchovo modifikované eMNP (S3 a S23, obr. 2b, f) vykazovali o niečo nižšiu účinnosť izolácie. Najnižšia účinnosť bola dosiahnutá pri povrchovo modifikovaných eMNP – S22 a S6 (obr. 2e, c).

## Záver

Testovanie všetkých 13 eMNP na vzorke pečene prasat'a preukázalo, že RNA bola úspešne izolovaná nezávisle od eMNP použitých na jej izoláciu. Táto RNA by sa mohla použiť v diagnostickej RT-qPCR, v ktorej boli hodnoty Ct porovnateľné alebo blízke hodnotám získaným komerčným kitom. Podobne vysoká účinnosť izolácie vírusovej RNA testovanými eMNP bola dosiahnutá aj so vzorkami nosohltanových výterov pacientov infikovaných vírusom SARS-CoV-2. So všetkými testova-

nými eMNP sme boli schopní izolovať vysoko kvalitnú vírusovú RNA. Porovnanie s komerčnými MNP ukazuje porovnateľný výťažok izolovanej vírusovej RNA. Ukázalo sa, že dve vzorky - nemodifikované S1 a porézne povrchovo modifikované S21 eMNP vykazujú výsledky účinnosti podobné komerčným MNP.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Analýza biokompatibility magnetických nanočastíc $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ s *in vitro* modelom pľúcneho karcinómu A549

J. Vargová<sup>1</sup>, A.A. Matiašová<sup>1</sup>, V. Bul'ková<sup>1</sup>, Z. Jendželovská<sup>1</sup>, R. Jendželovský<sup>1</sup>, J. Ševc<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 040 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: juraj . sevc@upj s . sk

**ABSTRAKT** Jedným z perspektívnych riešení diagnosticko-terapeutických problémov ochorenia COVID-19 a ďalších vírusových ochorení je využitie magnetických nanočastíc obalených pórovitou silikou, ktoré by mohli byť použité ako nosiče antivirotických liečiv v *in vivo* systéme. Magnetické nanočastice predstavujú transportný systém, z ktorého sa naviazané liečivo kontrolovane uvoľňuje počas dlhšej doby a ktorý umožňuje ich vektorové celenie magnetickým poľom do cieľového orgánu za účelom lokálneho zvýšenia koncentrácie liečiva. Pred testovaním transportných vlastností v *in vivo* podmienkach bola preskúmaná biokompatibilita magnetických nanočastíc s *in vitro* modelom pľúcneho karcinómu A549, ako aj schopnosť nanočastíc prenikať do buniek v smere magnetického poľa. Naše výsledky ukázali, že magnetické častice prenikajú do buniek aj bez vplyvu magnetického poľa. S využitím testu metabolickej aktivity, analýz celularity a viability buniek a imunofluorescenčných značení sme zistili, že prítomnosť magnetických nanočastíc má vplyv na prechodné zníženie viability a metabolickej aktivity kultivovaných buniek. Na základe dosiahnutých výsledkov je možné konštatovať, že magnetické nanočastice sú bunkami tolerovateľné v *in vitro* podmienkach, a preto je možné uvažovať o ich využití ako transportného systému v živých organizmoch.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** feromagnetické nanočastice; bunková línia A549; viabilita; metabolická aktivita; subcelulárna lokalizácia; magnetické pole

## Úvod

Feromagnetické nanočastice na báze siliky ( $\text{SiO}_2$ ) a oxidu železa ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), označované aj ako magnetické *core-shell* nanočastice  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ , sú vďaka svojím jedinečným vlastnostiam perspektívnym kandidátom na biomedicínske aplikácie pri zabezpečení transportu liečiva uskladneného v póroch nanočastíc do cieľových orgánov v živom organizme. Magnetické nanočastice predstavujú transportný systém, z ktorého sa naviazané liečivo kontrolovane uvoľňuje počas dlhšej doby a ktorý umožňuje ich vektorové celenie magnetickým poľom do cieľového orgánu za účelom lokálneho zvýšenia koncentrácie liečiva. Takýmto spôsobom by mohli byť navrhnuté magnetické *core-shell* nanočastice použité ako nosiče antivirotických liečiv pri riešení diagnosticko-terapeutických problémov ochorenia COVID-19 a ďalších vírusových ochorení. Navrhnutý systém by zefektívnením transportu



do cieľového orgánu umožnil zníženie potrebnej dávky liečiva, čím by došlo k redukcii vedľajších nepriaznivých účinkov liečiva na organizmus pacienta. Vzhľadom k potenciálnym rizikám spojeným s možnou toxicitou [1,2], resp. zlou tolerovateľnosťou nanočastíc v živom organizme [3,4], sme sa rozhodli pred ich testovaním v *in vivo* podmienkach overiť ich biokompatibilitu s *in vitro* modelom pľúčného karcinómu A549.

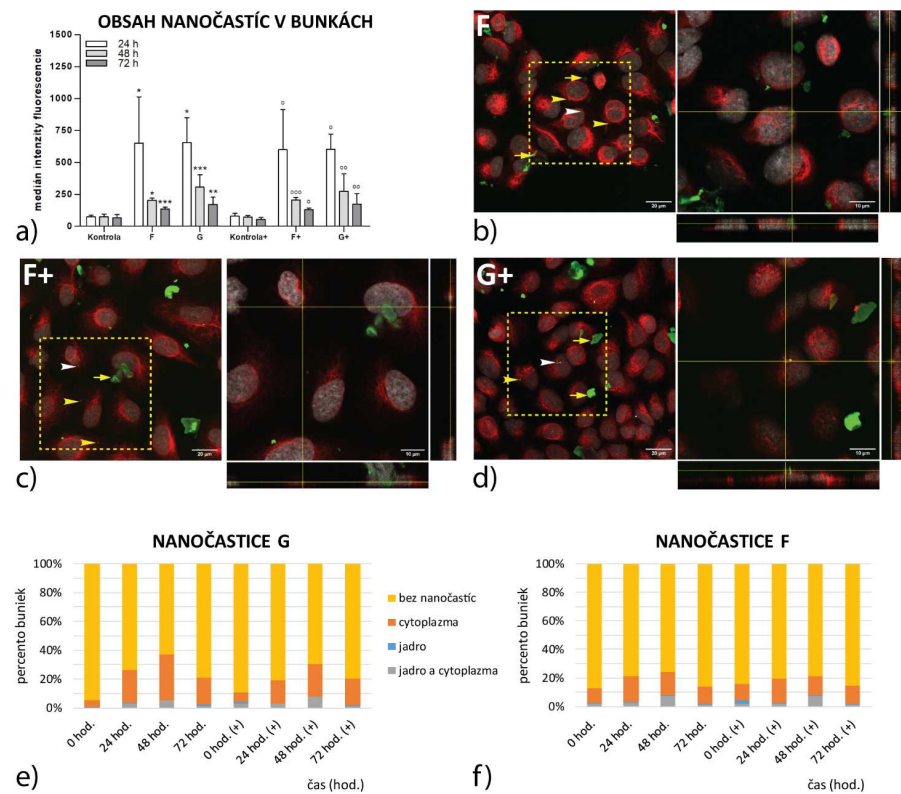
## Experimentálne metódy a výsledky

V experimente bola použitá ľudská bunková línia karcinómu pľúc A549 (ATCC Rockville). Bunky boli kultivované za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a 95 % vlhkosť) v médiu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) s 10 % fetálnym tel'acím sérom (Biosera) a antibiotikami (1 % Antimykotikum a 50 µg/ml gentamycín, Biosera). Bunky A549 boli pasážované a nasadené na kultivačné plasty nasledovne: a) do 12-jamkových platničiek (TPP) pre štúdium viability a počtu buniek v počte 32 400 buniek/jamku pre každý časový interval (24, 48 a 72 hod.); b) do 96-jamkových platničiek (TPP) pre analýzu metabolickej aktivity (MTT) buniek v počte 3 400 buniek/jamku pre každý časový interval (24, 48, 72 hod.) a c) na mikroskopické sklíčka s 12-jamkovou silikónovou mriežkou (ibidi) v počte 14 000 buniek/jamku pre mikroskopické analýzy vplyvu nanočastíc na bunky a ich lokalizáciu v bunkách v intervale bezprostredne po inkubácii (časový interval 0 hod.), alebo v počte 5 000 buniek/jamku pre analýzy vykonané v časových intervaloch 24, 48 a 72 hod. po inkubácii. K bunkám boli pridané roztoky s dvoma typmi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanočastíc pracovne nazývanými F a G, konjugovanými s fluorescenčnou značkou fluoresceín-5-izotiokyanát (FITC). *Core-shell* nanočastice sú tvorené nepórovitou magnetickou magnetitovou nanočasticou Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> predstavujúcou jadro (angl. *core*) a dvomi vrstvami materiálu z SiO<sub>2</sub> tvoricimi obal nanočastíc (angl. *shell*). Pórovitosť povrchovej vrstvy SiO<sub>2</sub> bola dosiahnutá použitím surfaktantu Brij S10, ktorý bol následne odstránený buď procesom extrakcie (nanočastice F) alebo kalcinácie (nanočastice G). Pre analýzy vnútrobunkového obsahu častíc, viability, celkového počtu buniek, metabolickej aktivity, bunkového cyklu, ako aj pre mikroskopické analýzy boli bunky inkubované s nanočasticami (finálna koncentrácia 100 µg/ml) po dobu 30 min. pri laboratórnej teplote v externom magnetickom poli alebo mimo magnetického poľa (kontroly). Následne boli vzorky vo zvolenom časovom intervale (0, 24, 48 a 72 hodín) spracované pre analýzy viability, počtu buniek a metabolickej aktivity (MTT test), analýzy bunkového cyklu a vnútrobunkového obsahu fluorescenčných častíc, alebo fixované pre účely mikroskopických analýz. Celularita a viabilita buniek bola po trypsinizácii analyzovaná pomocou prístroja Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter), metabolická aktivita bola vyhodnotená pomocou MTT testu (roztok MTT, konc. 0.5 mg/ml, SERVA Electrophoresis GmbH) na základe merania absorbancie rozpusteného formazánu pri 584 nm pomocou spektrofluoroluminometra BMG FLUOstar Optima (BMG Labtech GmbH).

Analýza bunkového cyklu a obsah fluorescenčných častíc v bunkách boli vyhodnotené prietokovým cytometrom BD FACSAria II SORP (BD Biosciences) pomocou softvéru ModFit 3.3 (Verity Software House), resp. FlowJo (Tree Star Inc.). Pre identifikáciu nanočastíc v bunkách a analýzy ich vplyvu na proliferáciu, boli bunky na sklíčkach fixované 4 % paraformaldehydrom, cytoskelet bol vizualizovaný protilátkou chicken-anti Vimentin (1:500, Abcam) a donkey anti-chicken IgG AF594 (1:500, Abcam), jadro farbičkou DRAQ5 (Cell Signalling Technology). Proliferujúce bunky boli označené protilátkou rabbit-anti Ki67 (Cell Signalling Technology 1:400) a donkey anti-rabbit IgG AF555 (1:500, Abcam). Vzorky boli zamontované médiom ProLong<sup>®</sup> Gold s nukleárnym markerom DAPI (Cell Signalling Technology). Imunofluorescenčne značené vzorky boli analyzované a nasnímané pomocou konfokálneho mikroskopu Leica SP5 TCS X (Leica Microsystems, Mannheim, Nemecko) vybaveného softvérom LAS AF alebo pomocou epifluorescenčného mikroskopu Leica Thunder Imager Dmi8 (Leica Microsystems) a softvéru LAS X. Výsledky všetkých analýz reprezentuje priemerná hodnota z troch opakovaní spolu so smerodajnými odchýlkami ( $\pm$ SD). Dáta boli analyzované pomocou softvéru GraphPad Prism (GraphPad Software) s využitím analýzy variancie s Tukeyho post-testom alebo pomocou nepárového t-testu.

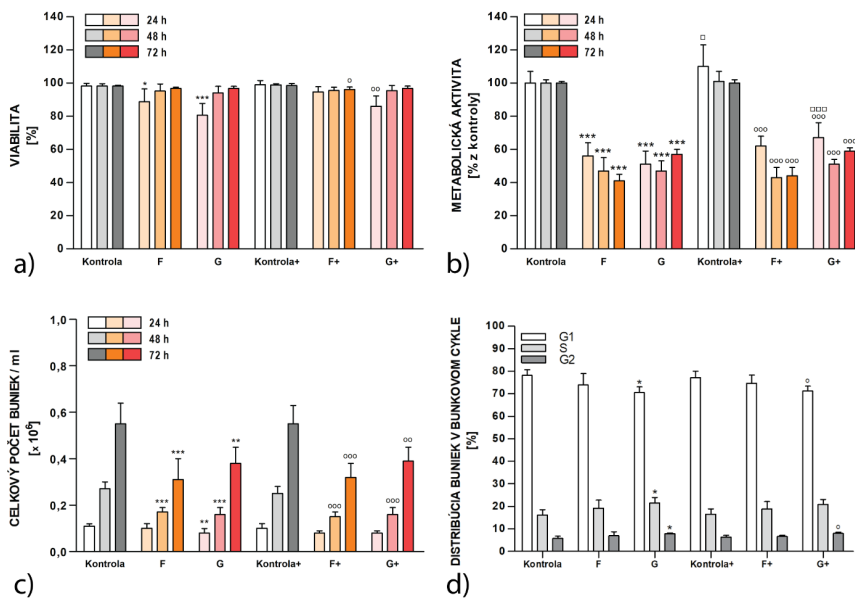
V prvom kroku sme sa zamerali na analýzu prítomnosti nanočastíc F a G v bunkách A549 po kultivácii v externom magnetickom poli po dobu 30 minút. Ako kontrola slúžili bunky s nanočasticami, ktoré neboli vystavené magnetickému poľu. Cytometrická analýza intenzity fluorescencie nanočastíc indikovala prítomnosť fluorescenčne aktívnych nanočastíc v bunkách vo všetkých časových intervaloch (0-72 hodín) bez ohľadu na to, či boli bunky vystavené magnetickému poľu, alebo nie (obr.1a). Na základe mikroskopickej analýzy sme zistili, že zhluky fluorescenčne označených nanočastíc F a G je možné identifikovať v jadrách buniek, ako aj v perinukleárnom priestore (obr.1b-d). Prítomnosť zhlukov nanočastíc bola analyzovaná v jednotlivých kompartmentoch buniek (obr.1e,f). Zistili sme, že nanočastice sú najčastejšie prítomné v perinukleárnom priestore. Fakt, že neboli zaznamenané významné rozdiely medzi skupinami s a bez expozície v magnetickom poli, indikuje, že externé magnetické pole nemá vplyv na prenikanie nanočastíc do buniek.

V druhom kroku sme analyzovali vplyv magnetických nanočastíc na viabilitu, metabolickú aktivitu, celkový počet a proliferáciu buniek (obr.2). Uvedené analýzy boli vybrané tak, aby indikovali prípadný nepriaznivý vplyv magnetických nanočastíc na životné funkcie buniek, ktorý by kontraindikoval využitie nanočastíc ako nosičov liečiv pre biomedicínske aplikácie. Na základe našich analýz sme zistili, že inkubácia buniek s magnetickými nanočasticami spôsobí prechodný pokles viability, a to bez ohľadu na to, či boli bunky s nanočasticami vystavené magnetickému poľu alebo nie. Inkubácia s nanočasticami spôsobila tiež zníženie celkovej metabolickej aktivity buniek. Uvedené výsledky naznačujú, že magnetické nanočastice nepôsobia na bunky toxicky, ale skôr predstavujú záťaž, ktorú vedú bunky tolerovať. Následne sme sa zamerali na vyšetrovanie celkovej početnosti buniek v porovnaní s kontrolou, ktorá by mala indikovať prípadné zmeny v raste bunkových populácií,



**Obz. 1:** Obsah nanočastic bol meraný na základe intenzity fluorescence pomocou prietokového cytometra (a). Mikrofotografie buniek inkubovaných s nanočasticami bez magnetického poľa (b) a s magnetickým poľom (označené symbolom +) (c, d), interval 0 hodín. Nanočastice sú zobrazené zelenou farbou, cytoskelet červenou a jadrá buniek sivou farbou. Žlté šípky ukazujú na nanočastice v blízkosti buniek, biele šípky na nanočastice v bunkách. Početnosť buniek obsahujúcich zhluky nanočastic bola manuálne vyhodnotená na mikrofotografických snímkach z konfokálneho mikroskopu (e, f). Skupiny ovplyvnené nanočasticami boli štatisticky porovnané s neovplyvnenou kontrolou (Kontrola; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Skupiny ovplyvnené nanočasticami v externom magnetickom poli boli štatisticky porovnané s kontrolnou skupinou vystavenou externému magnetickému poľu (Kontrola+;  $p < 0.05$ ,  $\circ\circ p < 0.01$ ,  $\circ\circ\circ p < 0.001$ ).

ako jedného z parametrov kondície buniek kultivovaných s magnetickými nanočasticami. Naše výsledky odhalili signifikantné zníženie celkovej celularity bunkových populácií kultivovaných s magnetickými nanočasticami v porovnaní s kontrolnými bunkami. Vzhľadom k tomu, že sa nám nepodarilo preukázať vplyv inku-



**Obr. 2:** Analýza viability (a), metabolickej aktivity (b), celkovej početnosti (c) a distribúcie buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu (d). Skupiny ovplyvnené nanočasticami boli štatisticky porovnané s neovplyvnenou kontrolou (Kontrola; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Skupiny ovplyvnené nanočasticami v externom magnetickom poli boli štatisticky porovnané s kontrolnou skupinou vystavenou externému magnetickému poľu (Kontrola+;  $\circ p < 0.05$ ,  $\circ\circ p < 0.01$ ,  $\circ\circ\circ p < 0.001$ ). Skupiny bez expozície magnetickému poľu (Kontrola, F, G) boli štatisticky porovnané s korešpondujúcimi skupinami (Kontrola+, F+, G+;  $\square p < 0.05$ ,  $\square\square p < 0.001$ ).

bácie s nanočasticami na parametre bunkového cyklu ani frakciu proliferujúcich buniek, predpokladáme, že rozdiel v celkovej celularite medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami spôsobil iniciálny pokles početnosti populácií buniek v dôsledku zníženej viability na 24. hodinu vo vzorkách kultivovaných s nanočasticami F a G. Naše výsledky potvrdili, že bunky pomerne dobre tolerujú aj použitú koncentráciu magnetických nanočastíc bez zmien, ktoré by indikovali cytotoxický efekt častíc na bunky.

## Záver

V tejto práci sme skúmali biokompatibilitu magnetických nanočastíc  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  s *in vitro* modelom pľúcneho karcinómu A549. Zistili sme, že magnetické nanočastice prenikajú do buniek aj bez vplyvu magnetického poľa, pričom najčastejšie

boli zhluky nanočastíc detegované v perinukleárnom priestore. Napriek prítomnosti nanočastíc v bunkách bol zaznamenaný len prechodný pokles viability, ktorý indikuje absenciu cytotoxického efektu. Výsledky analýz metabolickej aktivity ako aj celkovej celularity poukazujú na fakt, že prítomnosť magnetických nanočastíc v použitej (vysoko nefyziologickej) koncentrácii predstavuje pre bunky záťaž, s ktorou sa vedia vysporiadať. Naše výsledky naznačujú, že testované magnetické nanočastice môžu byť v klinicky relevantných dávkach dobre tolerovateľné a potenciálna záťaž, ktorú budú pre organizmus predstavovať, by mohla byť kompenzovaná benefitmi spojenými s nižšími koncentráciami podávaných liečiv, ak by sa potvrdila hypotéza o efektívnom smerovaní magnetických nanočastíc v krvnom riečisku do cieľového orgánu.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Liu G., Gao J., Ai H. and Chen X., "Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles", *Small*, **9**(9-10), (2012), 1533–1545, doi: 10.1002/sml.201201531.
- [2] Lewinski N., Colvin V. and Drezek R., "Cytotoxicity of nanoparticles", *Small*, **4**(1), (2008), 26–49, doi: 10.1002/sml.200700595.
- [3] Gupta A.K. and Gupta M., "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications", *Biomaterials*, **26**(18), (2005), 3995–4021, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012.
- [4] Malhotra N., Lee J.S., Liman R.A.D., Ruallo J.M.S., Villaflores O.B., Ger T.R. and Hsiao C.D., "Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles: A review", *Molecules*, **25**(14), (2020), 3159, doi: 10.3390/molecules25143159.

## Izolácia vírusovej RNA využitím modifikovaných magnetických nanopartikul

**B. Kočíková<sup>1</sup>, A. Pavlová<sup>1</sup>, E. Beňová<sup>2</sup>, J. Košuth<sup>3</sup>, V. Zelenák<sup>2</sup>, A. Zelenáková<sup>4</sup>, A. Jacková<sup>1</sup>, Š. Vilček<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

<sup>2</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>3</sup> Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 040 01 Košice

<sup>4</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

\* email korešpondujúceho autora: bozena.kocikova@uvlf.sk

**ABSTRAKT** V práci sa testovala účinnosť 12 magnetických nanopartikul na báze oxidov železa na izoláciu RNA z klinickej vzorky hepatitídou E infikovanej pečene diviaka. Po izolácii RNA bola v každom izoláte meraná koncentrácia, ako aj prahový cyklus (Ct hodnota) použitím metódy RT-qPCR. Najvyššia koncentrácia RNA (470 ng/ $\mu$ l) bola nameraná pri použití komerčných magnetických nanopartikul z kitu. Z testovaných nanopartikul bola najvyššia koncentrácia nameraná u vzorky S12 (217 ng/ $\mu$ l), naopak najnižšia u vzorky S21 (69 ng/ $\mu$ l). Hodnota prahového cyklu (Ct) získaná z RT-qPCR v prípade použitia komerčných nanopartikul bola 20; porovnateľné hodnoty Ct s komerčným kitom dosiahli iba magnetické nanopartikuly S12 a S16 (Ct = 20,64 a 20,69).

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanopartikuly; izolácia RNA; RT-qPCR; koncentrácia; Ct hodnota

## Úvod

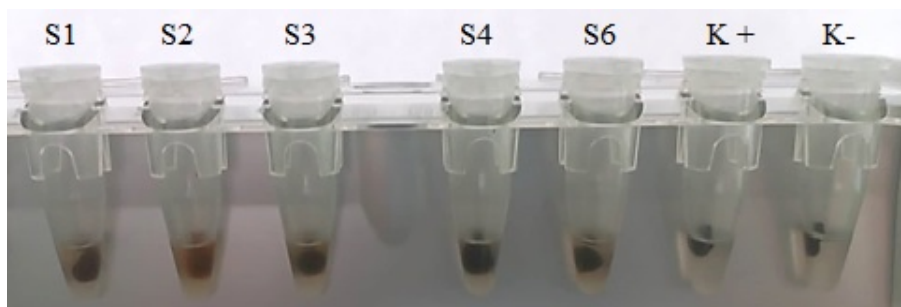
Z pohľadu diagnostiky vírusových ochorení je dôležitá rýchla a efektívna metóda detekcie u pacientov ešte pred prepuknutím klinických príznakov. Hoci sú v súčasnosti snahy vedcov zamerané na rozvoj nových rýchlych a spoľahlivých diagnostických testov, RT-qPCR sa pri detekcii vírusov stále považuje za zlatý štandard [1]. Rôzne druhy extrakcie vírusovej RNA môžu mať veľký vplyv na účinnosť RT-qPCR. Z viacerých metód izolácie RNA/DNA z klinického materiálu, magnetická separácia sa pre jej metodickú jednoduchosť, ako aj možnosť čiastočnej automatizácie s využitím robotických staníc, stala v poslednom období najobľúbenejšou izolačnou metódou [2]. Klúčovou zložkou magnetickej separácie sú supermagnetické častice na báze siliky a oxidu železa, na ktoré sa viaže RNA (alebo DNA). Modifikácia povrchu nanočastíc s využitím ligandov mení aktívne centrá na povrchu siliky, ktoré slúžia na naviazanie molekúl DNA a RNA. Cieľom tejto práce bolo overiť kvalitu pripravených modifikovaných magnetických nanopartikul na izoláciu vírusovej RNA s použitím metódy RT-qPCR.

## Experimentálne metódy a výsledky

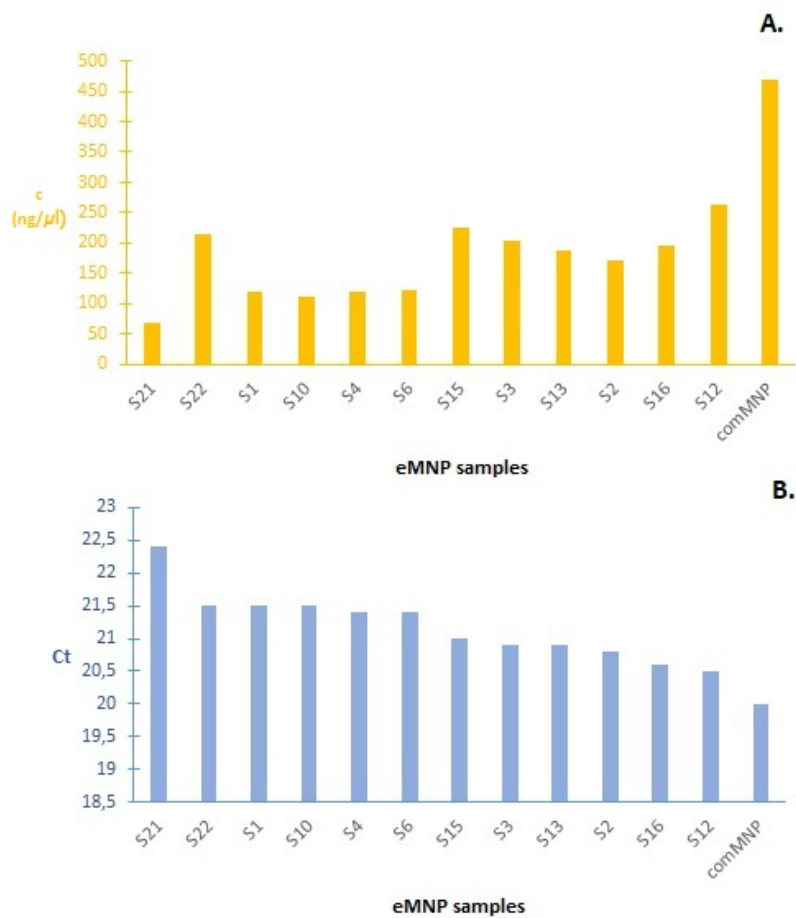
Celkovo bolo testovaných 12 magnetických nanopartikul (koncentrácia 130 mg/ml) na báze oxidov železa ( $\text{FeO}_x\text{@SiO}_2$ ) pripravených na spoluriešiteľskom pracovisku 3-krokovou syntézou: 1. syntéza magnetického jadra, 2. obalenie magnetického jadra neporéznou vrstvou siliky, 3. modifikácia povrchu rôznymi ligandami alebo obalenie poréznou vrstvou  $\text{SiO}_2$ . RNA bola izolovaná z 5 mg pozitívnej, vírusom hepatitídy E (HEV) infikovanej klinickej vzorky pečene diviaka komerčným kitom MagMax<sup>TM</sup> - 96 Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania). V komerčnom kite boli komerčné magnetické nanopartikelky (comMNP) postupne nahradené experimentálne pripravenými nanopartikelkami (eMNP) (Obr. 1). V prípade izolovanej RNA bola meraná koncentrácia (A260) a čistota (A260/280). Prítomnosť HEV bola detegovaná pomocou RT-qPCR [3] s iTaq Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) použitím CFX Opus 96 Real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). V RT-qPCR bola zisťovaná hodnota Ct (prahový cyklus). RNA izolácia bola s použitím eMNP opakovaná päťkrát, následne bola pre každú nanopartikelku vypočítaná priemerná hodnota koncentrácie, ako aj Ct hodnota z RT-qPCR.

Kým čistota vyzolovanej RNA bola vysoká ( $\text{A260/280} = 1,97 - 2,08$ ) u všetkých magnetických partikul, koncentrácia značne varíovala. Naše experimenty ukázali, že najvyššia koncentrácia RNA ( $470 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) bola nameraná pri použití comMNP z kitu. V prípade testovaných eMNP bola najvyššia koncentrácia nameraná v prípade vzorky S12 ( $217 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ), naopak najnižšia u vzorky S21 ( $69 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) (Obr. 2A).

Hlavný parameter v diagnostike vírusových ochorení predstavuje hodnota prahového cyklu (Ct) získaná z RT-qPCR. Zatiaľ čo hodnota Ct v prípade použitia comMNP bola 20, S1 nanopartikelky (vrstva siliky bez ligandov) vykazovali trochu nižšiu schopnosť detekcie vírusu (Ct = 21,26). Porovnateľné hodnoty Ct s komerčným kitom dosiahli iba magnetické nanopartikelky S12 a S16 (Ct = 20,64 a 20,69) zo skupiny nanopartikelk s ligandami modifikovaným povrchom. Naopak, nanopartikelky S21 a



**Obr. 1:** Magnetické nanopartikelky v magnetickom stojane počas izolácie RNA.  $K^+$ ,  $K^-$  - nanopartikelky z komerčného kitu.



**Obr. 2:** Testovanie eMNP na izoláciu RNA. **A.** – hodnoty koncentrácie izolovanej RNA, **B.** – Ct hodnoty RT-qPCR.

S22, obalené poréznu vrstvou siliky, dosahovali vyššie Ct (22,41 a 21,51) (Obr.2B).

## Záver

V tejto práci bol testovaný vplyv povrchových modifikácií magnetických nanopartikul na izoláciu vírusovej RNA. Výsledky ukázali, že všetky eMNP sú schopné izolovať RNA z klinickej vzorky pečene diviaka infikovanej HEV. Dva typy eMNP (S12 a S16) dosiahli porovnateľné hodnoty Ct ako comMNP z komerčného kitu. Žiadna zo



sledovaných vzoriek magnetických nanopartikul nedosiahla nižšie hodnoty Ct ako komerčný kit. Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že systematická syntéza magnetických nanopartikul s využitím rôznych ligandov naviazaných na magnetické jadro, predstavuje jednu z perspektív pre prípravu eMNP s lepšími izolačnými schopnosťami pre aplikáciu v biologickom výskume, diagnostike a terapii.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Ambrosi C., Prezioso C., Checconi P., Scribano D., Sarshar M., Capannari M., Tomino C., Fini M., Garaci E., Palamara A.T., Chiara G.D. and Limongi D., "SARS-CoV-2: Comparative analysis of different RNA extraction methods", *Journal of Virological Methods*, **287**, (2021), 114 008, doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114008.
- [2] Berensmeier S., "Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**(3), (2006), 495–504, doi: 10.1007/s00253-006-0675-0.
- [3] Jothikumar N., Cromeans T.L., Robertson B.H., Meng X. and Hill V.R., "A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis e virus", *Journal of Virological Methods*, **131**(1), (2006), 65–71, doi: 10.1016/j.jviromet.2005.07.004.



## **Časť IV**

# **Prihlásené prednášky**



## Určovanie štruktúry látok pomocou práškovej RTG difrakcie

**J. Bednarčík**<sup>1,\*</sup>,

<sup>1</sup> *Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice*

\* email korešpondujúceho autora: jozef.bednarcik@upjs.sk

---

**ABSTRAKT** RTG prášková difrakcia predstavuje hlavnú a nezastupiteľnú metódu na skúmanie atómovej štruktúry látok. Použitie RTG žiarenia s vlnovými dĺžkami na úrovni medzi-atomárnych vzdialeností ( $\sim 10^{-10}$ m) umožňuje pozorovať difrakčné javy v dôsledku pravidelného usporiadania atómov. Týmto spôsobom je možné z experimentálne nameranej uhlovej závislosti difraktovanej intenzity určiť typ kryštalickej štruktúry a presne kvantifikovať základnú stavebnú bunku, ktorej opakovaním vzniká celý kryštál. V tomto príspevku je predstavený nový práškový RTG difraktometer s usporiadaním Bragg-Brentano, ktorý bol zakúpený v rámci projektu NANOVIR. Séria difrakčných meraní na kalibračnej práškovej vzorke LaB<sub>6</sub> bola vykonaná s cieľom posúdiť priebeh uhlového rozlíšenia v závislosti od difrakčného uhla  $2\theta$  pre rôzne hodnoty otvoru divergentnej štrbiny.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** RTG prášková difrakcia; Bragg-Brentano goniometer; uhlové rozlíšenie difraktometra

---

### Úvod

Užitočnosť metódy práškovej RTG difrakcie, ako jedného z najdôležitejších nástrojov pri štruktúrnej charakterizácii materiálov, bola testovaná počas viac ako 100 rokov úspešného používania v akademickej i priemyselnej sfére [1,2]. Difrakčný záznam predstavuje závislosť difraktovanej intenzity od uhla  $\theta$ , pod ktorým dopadá monochromatické RTG žiarenie vzhľadom na povrch skúmanej látky. Difrakčný uhol  $\theta_{hkl}$ , pri ktorom je pozorované výrazné difrakčné maximum, je popísaný známou Braggovou rovnicou

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl}, \quad (3)$$

kde  $\lambda$  je vlnová dĺžka dopadajúceho monochromatického RTG žiarenia a  $d_{hkl}$  predstavuje medzirovinnú vzdialenosť prislúchajúcu typu rovín s Millerovými indexami (hkl). V prípade kryštalických látok s kubickou symetriou platí nasledovný vzťah

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}}, \quad (4)$$

v ktorom  $a$  predstavuje mriežkový parameter. Z vyššie uvedených dvoch vzťahov vyplýva, že v prípade práškovej vzorky, ktorá je tvorená veľkým počtom náhodne orientovaných kryštálikov, je vo výslednom RTG zázname pozorovaných niekoľko difrakčných maxím [1]. Poloha prislúšného difrakčného maxima je daná medzirovinnou vzdialenosťou  $d_{hkl}$  systému paralelných kryštalografických rovín. Tá je

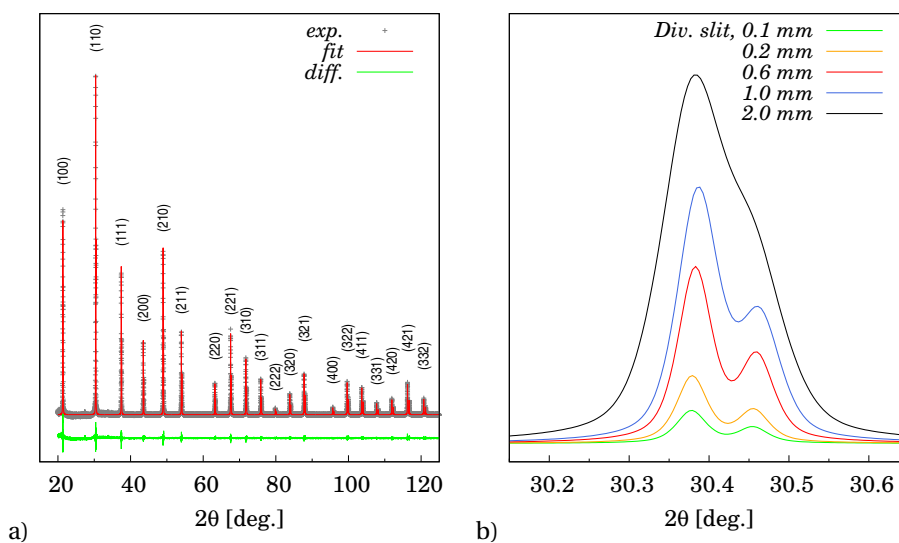


**Obr. 1:** a) Kompaktný (stolný) práškový difraktometer D2-Phaser Bruker. b) Detailný pohľad na Bragg-Brentano goniometer s automatickým meničom vzoriek (6 pozícií).

určená typom rovín a mriežkovými parametrami. Analýzou RTG práškového záznamu možno určiť fázové zloženie skúmanej látky a kvantifikovať príslušné mriežkové parametre. Profil difrakčných línií v sebe obsahuje dôležitú informáciu o stave mikroštruktúry, ktorá je určená preferenčnou orientáciou kryštálov, ich veľkosťou a distribúciou, či prítomnosťou rôznych typov štruktúrnych porúch [1,2].

### Experimentálne metódy a diskusia výsledkov

Na obrázku 1a je znázornený kompaktný práškový difraktometer Bruker D2-Phaser, ktorý bol zakúpený v rámci projektu NANO VIR na Ústav fyzikálnych vied PF UPJŠ. Na tomto mieste je potrebné poznamenať, že sa jedná o vôbec prvý prístroj svojho druhu, ktorý predstavuje rozšírenie experimentálneho vybavenia ústavu o metódu RTG práškovej difrakcie. Táto metodika poskytuje fundamentálne informácie o štruktúrnom stave látok a preto má veľmi široké uplatnenie v rôznych vedných disciplínach. Uvedený difraktometer disponuje držiakom na 6 vzoriek (Obr.2b), čo prispieva k jeho efektívnemu využitiu. Monochromatické žiarenie s vlnovou dĺžkou  $\lambda = 0.15418$  nm je generované klasickou vákuovou trubicou s medeným terčikom (Cu- $K\alpha_{1,2}$  žiarenie). Nakoľko výkon vákuovej trubice je limitovaný na 300 W (30 kV, 10 mA), postačuje chladenie integrovaným chladičom s relatívne malou kapacitou chladiaceho média. To umožňuje prevádzku prístroja s jednoduchým striedavým napätím 220 V. Difraktované RTG lúče sú registrované mikropásikovým detektorom SSD160. Tento typ lineárneho detektora obsahuje 160 mikropásikov, ktoré pokrývajú uhlový rozsah  $\sim 5^\circ$ . V dôsledku toho je zber dát oproti bodovému scintilačnému detektoru NaI podľa údajov výrobcu až 150 krát rýchlejší. Práškový difraktometer Bruker D2 Phaser používa usporiadanie v reflexnej Bragg-Brentano geometrii. Na



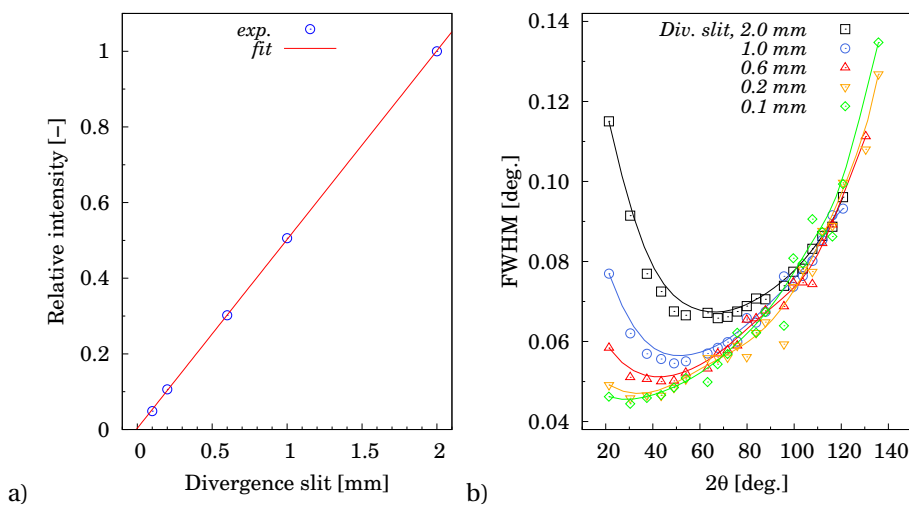
**Obr. 2:** a) RTG záznam kalibračnej práškovej vzorky  $\text{LaB}_6$  nameranej s divergentnou štrbinou 0,6 mm. b) Zmena tvaru reflexie (110) v závislosti od veľkosti otvoru divergentnej štrbiny.

potlačenie efektu preferenčnej orientácie kryštálov možno vzorku počas experimentu rotovať (až do 30 rpm) okolo osi definovanej normálovým smerom k horizontálnej rovine podložného sklíčka, na ktorom je umiestnená vzorka.

Typický RTG záznam je určený štart ( $2\theta_1$ ) a stop ( $2\theta_2$ ) pozíciou uhla, ktoré definujú interval merania  $\langle 2\theta_1, 2\theta_2 \rangle$ . Ďalej sa definuje krok  $\delta 2\theta$  (typicky  $0,01^\circ$ ), s ktorým sa budú dáta zaznamenávať. V závislosti od zvolených nastavení sa v jednom difrakčnom zázname nameria spolu  $N$  hodnôt ( $N = (2\theta_2 - 2\theta_1) / \delta 2\theta$ ) pozícií  $2\theta$  a príslušnej intenzity. Výsledná štatistika nameraných dát je podmienená nielen stavom štruktúry vzorky ale aj zvolenou dobou merania na jeden bod.

V tejto práci bola pozornosť venovaná štúdiu uhlového rozlíšenia prístroja Bruker D2 Phaser v závislosti od veľkosti otvoru divergentnej štrbiny, ktorej hlavnou úlohou je nastavenie výšky RTG lúča. Šírka lúča je nemenná a dosahuje hodnotu 10 mm. Sériu difrakčných meraní na kalibračnej vzorke  $\text{LaB}_6$  v závislosti od veľkosti otvoru divergentnej štrbiny bola vykonaná na intervale  $2\theta$  od 20 do  $140^\circ$ , pričom veľkosť kroku  $\delta 2\theta$  bola  $0,004^\circ$ . Na obrázku 2a je znázornený RTG difrakčný záznam kalibračnej práškovej vzorky  $\text{LaB}_6$ . Priebeh pozorovaných difrakčných máxím bol aproximovaný pseudo-Voigtovou funkciou<sup>1</sup>, ktorá veľmi dobre vystihuje tvar experimentálnych profilov (viď diferenčnú krivku na Obr.2a). Ako vyplýva z

<sup>1</sup>pseudo-Voigtova funkcia  $pV(x)$  je definovaná ako lineárna kombinácia Gaussovej  $G(x)$  a Lorentzovej funkcie  $L(x)$ , t.j.  $pV(x) = \alpha G(x) + (1 - \alpha)L(x)$ , kde  $\alpha \in \langle 0, 1 \rangle$  predstavuje zmiešavací koeficient.



**Obr. 3:** a) Relatívna zmena intenzity difraktovaného RTG žiarenia v závislosti od veľkosti otvorenia divergentnej štrbiny. b) Porovnanie uhlovej závislosti FWHM pre jednotlivé veľkosti divergentnej štrbiny.

porovnania profilov reflexie (110) na Obr.2b, znižovanie otvoru divergentnej štrbiny spôsobuje pokles šírky píku<sup>2</sup>, čo indikuje zlepšenie uhlovej rezolúcie pre menšie veľkosti otvorenia divergentnej štrbiny. Znižovanie otvoru divergentnej štrbiny spôsobuje zmenšenie veľkosti (výšky) RTG lúča, ktorá vedie k poklesu celkovej intenzity dopadajúceho žiarenia na vzorku, čo sa odzrkadlí na poklese amplitúdy jednotlivých píkov. Na obrázku 3a je znázornený priebeh relatívnej intenzity difraktovaného RTG žiarenia v závislosti od veľkosti otvorenia divergentnej štrbiny. Experimentálne body boli získané integráciou plochy príslušného difrakčného záznamu a normované vzhľadom na meranie s maximálnym otvorením divergentnej štrbiny (2,0 mm). Ako vidieť z Obr.3a relatívna intenzita lineárne narastá so zväčšujúcim sa otvorom divergentnej štrbiny.

Na získanie funkcie inštrumentálneho rozlíšenia boli difrakčné profily v každom difrakčnom zázname fitované pseudo-Voigtovou funkciou. Priebeh plnej šírky difrakčného profilu FWHM v závislosti od difrakčného uhla  $2\theta$  predstavuje funkciu inštrumentálneho rozlíšenia<sup>3</sup>, ktorá predstavuje základnú charakteristiku difraktometra. Na obrázku 3b je uvedené porovnanie funkcií inštrumentálneho rozlíšenia v závislosti od veľkosti divergentnej štrbiny. Z uvedeného porovnania vyplýva, že so znižujúcou sa veľkosťou štrbiny dochádza k výraznému poklesu šírky difrakčných reflexií pre uhly  $2\theta$  menšie ako  $50^\circ$ . To svedčí o zlepšení uhlového rozlíšenia

<sup>2</sup>plná šírka v polovičnej výške, v angl. odbornej lit. označovanej ako *Full-Width at Half-Maximum – FWHM*

<sup>3</sup>v angl. odbornej lit. označovaná ako *Instrument Resolution Function – IRF*



v tomto intervale uhlov. Na druhej strane, pre difrakčné uhly  $2\theta$  väčšie ako  $90^\circ$  badať monotónny nárast šírky pík, pričom tento nezávisí od veľkosti divergentnej štrbiny.

### Záver

V tomto príspevku bol predstavený nový práškový RTG difraktometer Bruker D2 Phaser, ktorý bol na Ústav fyzikálnych vied PF UPJŠ zakúpený v rámci projektu NANOVIR. Sériá difrakčných meraní na kalibračnej práškovej vzorke  $\text{LaB}_6$  bola vykonaná s cieľom posúdiť priebeh uhlového rozlíšenia v závislosti od difrakčného uhla  $2\theta$  pre rôzne hodnoty otvoru divergentnej štrbiny. Merania ukázali, že zmenšovanie otvoru divergentnej štrbiny spôsobuje pokles šírky píku a tak prispieva k zlepšeniu uhlového rozlíšenia. Tento trend je pozorovaný pre difrakčné uhly menšie ako  $50^\circ$ . V prípade difrakčných reflexií pozorovaných pri uhloch väčších ako  $90^\circ$  badať monotónny nárast šírky píkov s uhlom  $2\theta$ , ktorý nezávisí od veľkosti divergentnej štrbiny. Získané výsledky popisujú uhlové rozlíšenie nového difraktometra a budú veľmi nápomocné pri voľbe optimálnych nastavení pri štúdiu atomárnej štruktúry látok pomocou práškovej RTG difrakcie.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Valvoda V., Polcarová M. and Lukáč P., *Základy strukturní analýzy*, Karolinum, Praha, 1. vydanie (1992).
- [2] Pecharsky V. and Zavalij P., *Fundamentals of Powder Diffraction and Structural*, Springer Science & Business Media, Inc., New York (2005).

## Syntéza core-shell magnetických nanočastíc Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> s rôznymi typmi obalov pre diagnosticko-terapeutické aplikácie

E. Beňová<sup>1,\*</sup>, N. Király<sup>1</sup>, V. Zelenák<sup>1</sup>, A. Zelenáková<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>2</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

\* email korešpondujúceho autora: e.va.benova@upj.s.sk

**ABSTRAKT** Pre riešenie diagnosticko-terapeutických aplikácií boli pripravené 3-vrstvové core-shell magnetické nanočastice tvorené magnetickým jadrom Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (core) a rôznymi typmi obalov (shell), ktoré boli kombináciou nepórovitej vrstvy oxidu kremičitého SiO<sub>2</sub>, pórovitej vrstvy oxidu kremičitého SiO<sub>2</sub>, kyseliny olejovej a organických ligandov. Nanočastice boli charakterizované dostupnými fyzikálno-chemickými metódami (infračervená spektroskopia, termická analýza, adsorpcia/desorpcia didusíka). Nanočastice modifikované organickými ligandami boli následne študované pre potencionálne diagnostické aplikácie v súvislosti s ochorením Covid-19. Nanočastice obsahujúce pórovitú vrstvu SiO<sub>2</sub> boli testované z hľadiska možnosti uskladnenia a uvoľňovania antivírusového liečiva Lopinavir. Pripravené materiály boli následne postúpené na biologické testovanie.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; syntéza; diagnostika; uvoľňovanie liečiv

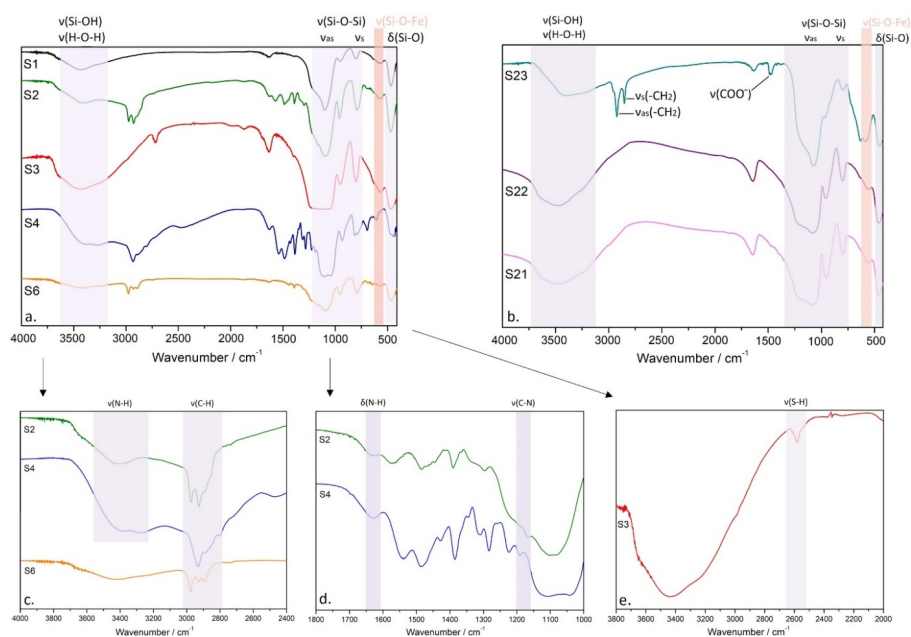
## Úvod

Materiály na báze magnetických nanočastíc sú široko používané v rôznych oblastiach výskumu ako napríklad v katalýze, magnetickej separácii ale aj biomedicine ako kontrastné látky pre zobrazovacie metódy, ciele podávanie liečiv či pri liečbe rakoviny lokalizovanou hypertermickou chemoterapiou [1,2]. Magnetické vlastnosti umožňujú, aby bol pohyb nanočastíc riadený vonkajším magnetickým poľom. Z dôvodu ľahkej oxidácie nanočastíc Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> na Fe<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, sa na zachovanie magnetických vlastností používa ochranná vrstva na báze prírodných a syntetických polymérov, ako napr. oxid kremičitý (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>). Kremičitý obal zároveň zlepšuje biokompatibilitu, fyzikálno-chemickú stabilitu a umožňuje modifikáciu nanočastíc širokou škálou organických ligandov a tým rozširuje ich aplikačné možnosti. Magnetické nanočastice obalené oxidom kremičitým majú veľký potenciál aj v diagnostických aplikáciách, keďže dokážu efektívne viazať, extrahovať či prečistiť biomolekuly RNA, DNA, enzýmy a iné organické molekuly. Oxid kremičitý, ktorý obaluje magnetické nanočastice, má veľkú schopnosť viazať nukleové kyseliny. Vďaka veľkému povrchu nanočastíc sa na nich efektívne zachytí veľké množstvo vírusovej RNA. Naviazané molekuly RNA je pomerne ľahko izolovať pomocou externého magnetu pre účely diagnostiky metódou PCR [3]. Pre dosiahnutie lepšieho výťažku

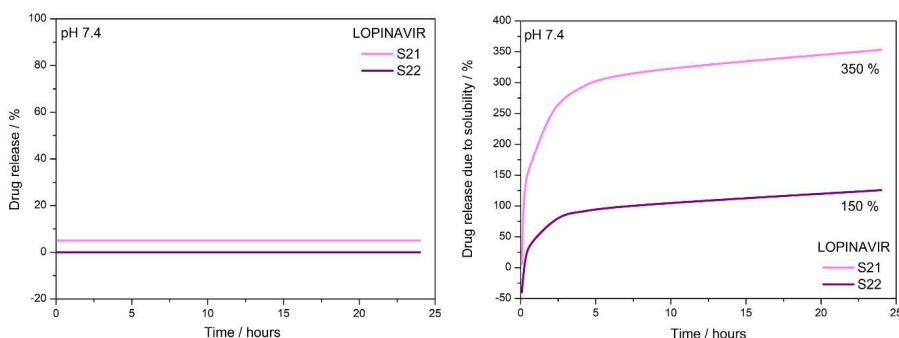
separácie nukleových kyselín boli syntetizované magnetické nanočastice s kremičitým obalom, ktorých povrch bol navyše modifikovaný 12 rôznymi organickými ligandami alebo pórovitou vrstvou  $\text{SiO}_2$ . Keďže pórovité nanočastice majú veľký potenciál aj pri terapeutických aplikáciách, pripravené magnetické nanočastice s pórovitou vrstvou  $\text{SiO}_2$  boli testované aj ako potenciálne nosiče liečiv. Do pórov magnetických nanočastíc boli adsorbované molekuly antivírusového liečiva Lopinavir. Nevýhodou Lopinaviru je, že je takmer nerozpustný vo vode. Mezopórovité nanočastice sa považujú za sľubné nosiče nerozpustných liečiv, pretože dokážu zvýšiť ich rozpustnosť vo vode a tým zvýšiť ich biologickú dostupnosť. Schopnosť mezopórovitých nanočastíc zvýšiť rozpustnosť a rýchlosť rozpúšťania liečiv je spôsobená ich mezopórami, ktoré dokážu zabrániť kryštalizácii liečiva a ponechať ho v jeho amorfnej forme [4].

### Experimentálne metódy a diskusia výsledkov

Syntéza magnetického jadra (1.vrstva) bola uskutočnená podľa postupu uvedeného v BOMB protokole [5] ko-precipitáciou železnatých a železitých iónov. Pripravené magnetické nanočastice boli obalené nepórovitou vrstvou oxidu kremiči-



**Obř. 1:** Infračervené spektrá vybraných nanočastíc s prislúchajúcimi absorpčnými pásmi.



**Obr. 2:** Uvoľňovacie profily liečiva Lopinavir vykreslené vzhľadom na množstvo uzavretého liečiva (vľavo) a vzhľadom na rozpustnosť liečiva (vpravo).

tého (2. vrstva) kde bol ako prekursor použitý tetraetoxysilán (TEOS). V inom prípade sa na vytvorenie obalu magnetických nanočastíc použili molekuly kyseliny olejovej. Kyselina olejová vytvorí okolo magnetických nanočastíc hydrofóbný obal, ktorý zabezpečí rovnomernú disperziu nanočastíc a tým zvýši aj ich stabilitu. Organická modifikácia (3.vrstva) pripravených nanočastíc bola prevádzaná metódou graftingu. Pomocou refluxu v bezvodom toluéne bola na povrch magnetických nanočastíc naviazaných 12 rôznych ligandov. V prípade pórovitých nanočastíc bol na vytvorenie 3.vrstvy použitý pórovitý oxid kremičitý. Pri syntéze bol ako prekursor použitý TEOS, a ako surfaktanty zodpovedné za porozitu materiálu boli použité cetrimónium bromid (CTAB) a polyetylén glycol oktadecyl éter (Brij S10). Pri syntéze boli použité rôzne surfaktanty za účelom pripraviť nanočastice s rôznou veľkosťou povrchu a s rôznou veľkosťou pórov. Úspešná syntéza pripravených systémov bola potvrdená transmisnou elektrónovou mikroskopiou, infračervenou spektroskopiou (Obr.1), termickou analýzou aj adsorpciou/desorpciou didusíka.

Pórovité nanočastice boli testované aj z hľadiska schopnosti adsorpcie/desorpcie liečiv pre možné terapeutické aplikácie. Do pórovitých magnetických nanočastíc boli adsorbované molekuly vo vode nerozpustného liečiva Lopinavir. Molekuly liečiva boli do pórovitých nanočastíc adsorbované metódou impregnácie (do 50 mg vzorky bolo impregnovaných 100 mg liečiva). Uvoľňovanie liečiv bolo prevádzané do fyziologického roztoku s pH 7.4 a do tlmivého roztoku s pH 2. Na obrázku 2 sú znázornené uvoľňovacie profily Lopinaviru pri pH 7.4. Na obrázku vľavo je uvoľňovací profil liečiva vzhľadom na množstvo uzavretého liečiva. Z uvoľňovacieho profilu vyplýva, že liečivo sa z pórov nanočastíc neuvolňuje. A teda uvoľnené množstvá Lopinavir-u sú zanedbateľné. Na obrázku vpravo je uvoľňovací profil Lopinaviru vzhľadom na jeho rozpustnosť vo vode ( $7,7 \times 10^{-3}$  mg/L). Z uvoľňovacieho profilu vyplýva, že uzavretím molekúl lopinaviru do mezopórov nanočastíc sa podarilo zvýšiť jeho rozpustnosť až o 350 % v prípade vzorky S21 a o 150 % v prípade vzorky S22.

## Záver

Úspešne sme pripravili 3-vrstvové magnetické nanočastice tvorené magnetickým jadrom, nepórovitou vrstvou SiO<sub>2</sub> a organickými ligandami alebo pórovitou vrstvou SiO<sub>2</sub>. Pripravené nanočastice sa líšili povrchovými skupinami (12 rôznych organických ligandov), veľkosťou povrchu, veľkosťou pórov a tým aj fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Uzavretím molekúl liečiva Lopinavir do mezopórov pripravených nanočastíc sa nám podarilo zvýšiť jeho rozpustnosť až o 350 %.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Arsalani S., Löwa N., Kosch O., Radon P., Baffa O. and Wiekhorst F., "Magnetic separation of iron oxide nanoparticles to improve their application for magnetic particle imaging", *Physics in Medicine & Biology*, **66**(1), (2021), 015 002, doi: 10.1088/1361-6560/abcd19.
- [2] Comanescu C., "Magnetic nanoparticles: Current advances in nanomedicine, drug delivery and MRI", *Chemistry*, **4**(3), (2022), 872–930, doi: 10.3390/chemistry4030063.
- [3] da Silva Bruckmann F., Nunes F.B., da Rosa Salles T., Franco C., Cadoná F.C. and Rhoden C.R.B., "Biological applications of silica-based nanoparticles", *Magnetochemistry*, **8**(10), (2022), 131, doi: 10.3390/magnetochemistry8100131.
- [4] Yang G., Li Z., Wu F., Chen M., Wang R., Zhu H., Li Q. and Yuan Y., "Improving solubility and bioavailability of breviscapine with mesoporous silica nanoparticles prepared using ultrasound-assisted solution-enhanced dispersion by supercritical fluids method", *International Journal of Nanomedicine*, **15**, (2020), 1661–1675, doi: 10.2147/ijn.s238337.
- [5] Oberacker P., Stepper P., Bond D.M., Höhn S., Focken J., Meyer V., Schelle L., Sugrue V.J., Jeunen G.J., Moser T., Hore S.R., von Meyenn F., Hipp K., Hore T.A. and Jurkowski T.P., "Bio-on-magnetic-beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation", *PLOS Biology*, **17**(1), (2019), e3000 107, doi: 10.1371/journal.pbio.3000107.

## Porovnanie morfológických a magnetických vlastností nanočastíc $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ obalených organickými ligandmi

J. Szücsová<sup>1,\*</sup>, A. Zelenáková<sup>1</sup>, Ľ. Nagy<sup>1</sup>, M. Barutiak<sup>1</sup>, E. Beňová<sup>2</sup>, V. Zelenák<sup>2</sup>, V. Závistová<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

<sup>2</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>3</sup> Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.v.i., Watsonova 47, 040 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: jaroslava.szucsova@upjs.sk

---

**ABSTRAKT** Pripravili a charakterizovali sme vzorky magnetických nanočastíc typu jadro-obal pozostávajúce z jadra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obaleného vrstvou  $\text{SiO}_2$ . Vzorky boli obalené organickými ligandmi APTES, CPTMS a MMSP. Boli skúmané ich magnetické vlastnosti, veľkosť a morfológia. Magnetické vlastnosti boli študované v jednosmernom poli do 5 T v teplotnom rozsahu 2-300 K. Veľkosť a morfológia častíc boli určené zo snímkov zhotovených pomocou SEM. Modifikácia povrchu nanočastíc rôznymi ligandmi spôsobuje zmenu magnetických a štruktúrnych vlastností nanočastíc a vedie k modifikácii aktívnych centier na povrchu vrstvy  $\text{SiO}_2$ , na ktoré sa môžu viazať molekuly DNA a RNA.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; ligand; SEM; jadro-obal; biomedicínske aplikácie

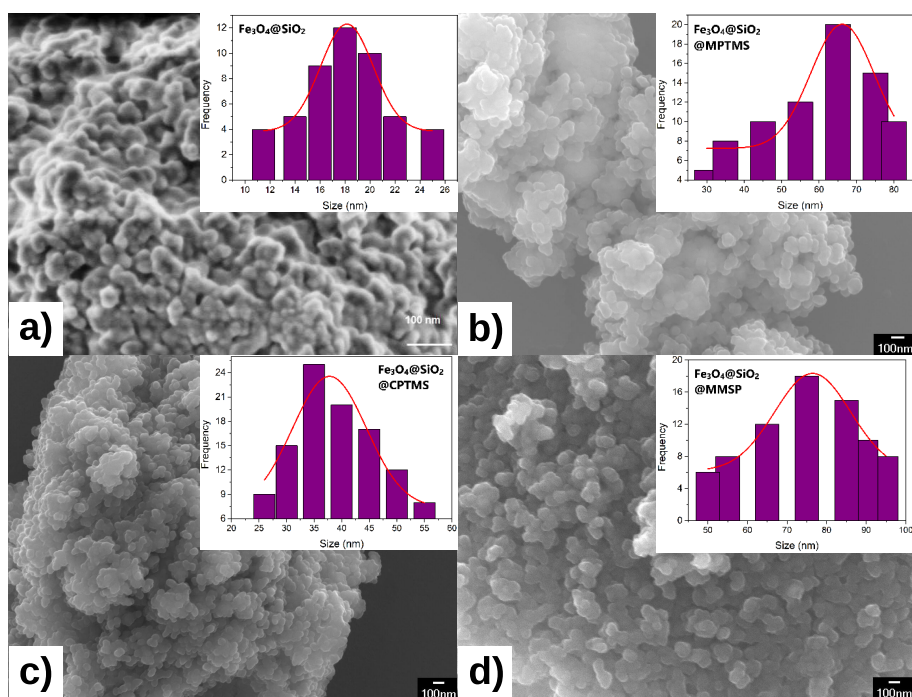
---

### Úvod

Magnetické nanočastice majú široké uplatnenie v rôznych technologických oblastiach a v posledných rokoch sa uplatňuje aj ich potenciál v medicíne, kde sa využívajú ich unikátne a škálovateľné vlastnosti, akými sú vysoký pomer povrchu k objemu a vysoká mobilita vo voľnom stave. Zaujímavá je aj ich schopnosť vstúpiť do buniek, resp. môžu byť navrhnuté tak, aby sa viazali na špecifické bunky. Je dobre známe, že konvenčné magnetické nanočastice s vhodne upraveným povrchom možno použiť na efektívnu magnetickú separáciu a purifikáciu vzoriek DNA a RNA a tiež v diagnostických metódach na identifikáciu rôznych druhov baktérií a vírusov [1,2]. Obalovanie a funkcionalizácia nanočastíc rôznymi zlúčeninami sa využíva na modifikáciu ich vonkajšej povrchovej vrstvy podľa ich použitia na špecifické biomedicínske aplikácie. Napríklad testy RT-PCR, ktoré sa používajú na detekciu genetického materiálu vírusu, sú založené na magnetických nanočasticiach, na ktorých povrchu môže byť genetický materiál zachytený a tak naviazaný. Pre tieto účely je dôležité, aby mal povrch čo najviac voľných aktívnych centier, na ktorých je možné naviazať genetický materiál. Organické ligandy sú jedny zo zlúčenín, ako sú napr. polyméry, ktoré dokážu vytvárať voľné aktívne väzbové centrá a ich aplikáciou sa dá kontrolovať, aký typ molekúl sa bude viazať na povrch nanočastíc [3,4].

## Experimentálne metódy a diskusia výsledkov

Magnetitové nanočastice obalené oxidom kremičitým ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) boli syntetizované podľa protokolu BOMB [5]. Pripravené magnetické nanočastice boli modifikované organickými ligandmi: 3-(merkaptopropyl)trimetoxysilán(MPTMS), 3-(chlórpropyl)trimetoxysilán(CPTMS) a 3(trimetoxysilyl)propylmetakrylát(MMSP). Snímky boli získané pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu (SEM) JEOL JSM-7000F (JEOL, Ltd.). Vzorky pre SEM boli pripravené nasledovne: 2 mg práškovej vzorky boli zriedené v 10 ml destilovanej vody, homogenizované v ultrazvukovom kúpeli a nakvapkané na sklenené mikroskopické sklíčko, ktoré bolo vložené a odstredené v rotačnom pot'ahovači. Takto pripravené sklíčka boli následne naprášené nanovrstvou uhlíka. Merania magnetických vlastností vybraných vzoriek boli realizované na magnetometri na báze SQUID-u: MPMS 5XL (Quantum Design, Inc.) v aplikovanom externom jednosmernom poli do 5 T a rozsahu teplôt od 5 K do 300 K. Mikrofotografie získané zo SEM prezentované na obr.1 znázorňujú morfológiu a veľkosť nanočastíc, ktoré majú skôr sférický tvar a sú agregované do väčších zhlukov. Každá vzorka, okrem prvej potiahnutej iba obalom  $\text{SiO}_2$ , pozostávala z na-



**Obr. 1:** SEM snímky vzoriek: a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ , b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MPTMS}$ , c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CPTMS}$ , d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MMSP}$ .

**Tabuľka 1:** Porovnanie veľkostí častíc získaných rôznymi metódami.

Vzorka	Spôsob určenia veľkosti častice [nm]		
	Magneticky	SEM	Hydrodynamicky
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub>	3.25	18.6	104
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @MPTMS	4.22	66.19	162
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @CPTMS	5.59	37.7	152
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @MMSP	4.63	76.4	168

nočastíc Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> potiahnutých vrstvou ligandu, kde rôzne ligandy prispeli k rôznym fyzikálno-chemickým vlastnostiam a konečným celkovým veľkostiam nanočastíc. Na obr.1 sú uvedené aj histogramy pre všetky štyri vzorky, ktoré demonštrujú štatistickú distribúciu veľkosti nanočastíc.

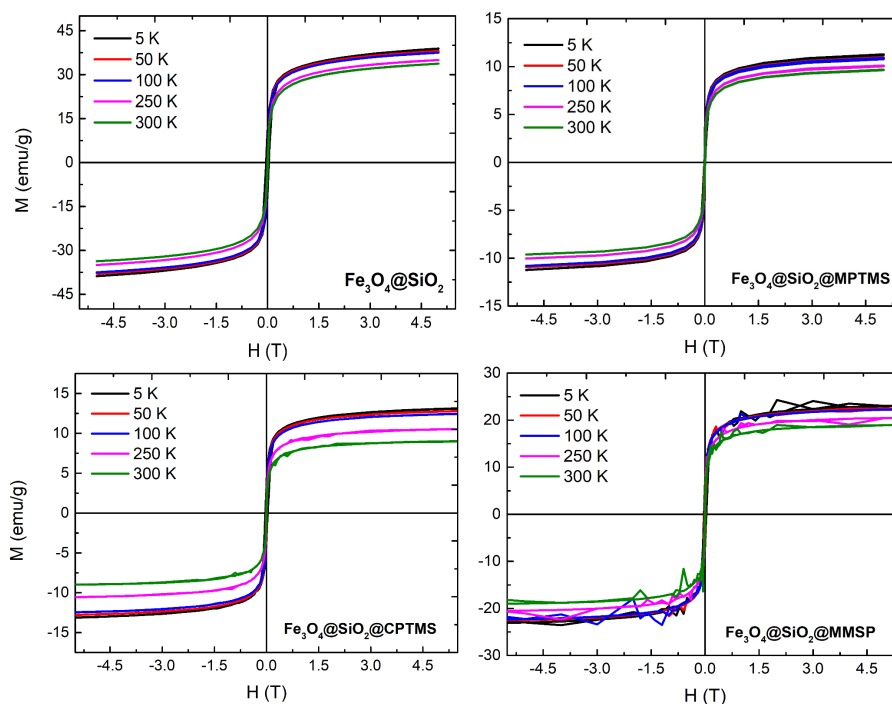
Všetky jadrá Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> boli pripravené podľa rovnakého protokolu syntézy, ktorý určil ich veľkosť, a boli potiahnuté vrstvou oxidu kremičitého a potom následne modifikované organickými ligandmi. Nanočastice bez ligandovej vrstvy mali celkovú veľkosť cca. 20 nm, nanočastice potiahnuté CPTMS tvorili najtenšiu vrstvu ligandu, ktorá mala hrúbku okolo 20 nm a naopak, druhý obal vzorky potiahnutý MMSP mal hrúbku približne 58 nm. Hydrodynamická veľkosť nanočastíc sa merala aj metódou DLS (Dynamic Light Scattering) a potvrdilo sa, že na príspevku ku celkovej veľkosti nanočastíc sa najviac podieľala vrstva ligandu MMSP, najmenšiu veľkosť mali nanočastice potiahnuté ligandom CPTMS. Toto porovnanie medzi veľkosťami nanočastíc získanými z magnetických meraní, meraní SEM a DLS je uvedené v tabuľke 1.

Magnetické vlastnosti merané v DC režime a závislosť magnetizácie  $M$  od vonkajšieho magnetického poľa  $H$  sú znázornené na obr.2. Nanočastice vykazovali superparamagnetické správanie pri všetkých teplotách, čo znamená, že všetky nanosystémy mali nulovú koercitivitu. Hodnota magnetizácie bola najvyššia pri vzorke, ktorá nemala vrstvu ligandov, pri 5 K ~ 38 emu/g. Významný pokles magnetizácie bol pozorovaný pri vzorkách potiahnutých ligandom (pre MPTMS pri 5 K ~ 11 emu/g a pre CPTMS pri 5 K ~ 13 emu/g). Vo vzorke potiahnutej MMSP sa magnetizácia znížila na ~ 23 emu/g. Keďže z magnetických meraní možno pozorovať len vlastnosti magneticky rezonantných zlúčenín, vypočítali sme veľkosť magnetického jadra pre každú vzorku pomocou Langevinovej distribučnej funkcie.

## Záver

V tejto práci sme skúmali obalovanie superparamagnetických nanočastíc špecifickými ligandami. Obalenie nanočastíc vrstvou SiO<sub>2</sub> zaistí uje ich biokompatibilitu a modifikácia povrchu nanočastíc rôznymi ligandami vedie k modifikácii aktívnych centier na povrchu SiO<sub>2</sub>, na ktoré sa môžu viazať molekuly DNA a RNA. Mera-





**Obr. 2:** Namerané hodnoty magnetizácie pre všetky štyri vzorky.

ním SEM a DLS sa potvrdilo, že ligandy prispeli k celkovej veľkosti nanočastíc. Prítomnosť ligandov mala vplyv aj na magnetické vlastnosti, kde je možné pozorovať výrazný pokles magnetizácie. Ligandové skupiny sa líšia svojim chemickým zložením, molekulovou hmotnosťou a funkčnými skupinami, čo bolo tiež zodpovedné za rozdielnu hrúbku druhého obalu. Najhrubší obal bol pozorovaný pre vzorku s ligandom MMSP, zatiaľ čo povlak s CPTMS ligandom s chlórovou skupinou vytvoril najtenší obal.



**POĎAKOVANIE** Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Shinkai M., "Functional magnetic particles for medical application", *Journal of Bio-science and Bioengineering*, **94**(6), (2002), 606–613, doi: 10.1016/s1389-1723(02)80202-x.

- [2] Olsvik O., Popovic T., Skjerve E., Cudjoe K.S., Hornes E., Ugelstad J. and Uhlén M., “Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology”, *Clinical Microbiology Reviews*, **7**(1), (1994), 43–54, doi: 10.1128/cmr.7.1.43.
- [3] Abdolrahimi M., Vasilakaki M., Slimani S., Ntallis N., Varvaro G., Laureti S., Meneghini C., Trohidou K.N., Fiorani D. and Peddis D., “Magnetism of nanoparticles: Effect of the organic coating”, *Nanomaterials*, **11**(7), (2021), 1787, doi: 10.3390/nano11071787.
- [4] Yang H.Y., Li Y. and Lee D.S., “Functionalization of magnetic nanoparticles with organic ligands toward biomedical applications”, *Advanced NanoBiomed Research*, **1**(5), (2021), 2000 043, doi: 10.1002/anbr.202000043.
- [5] Oberacker P., Stepper P., Bond D.M., Höhn S., Focken J., Meyer V., Schelle L., Sugrue V.J., Jeunen G.J., Moser T., Hore S.R., von Meyenn E., Hipp K., Hore T.A. and Jurkowski T.P., “Bio-on-magnetic-beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation”, *PLOS Biology*, **17**(1), (2019), e3000 107, doi: 10.1371/journal.pbio.3000107.

## Zlepšenie akustického prostredia v laboratóriu SLTEM

V. Girman<sup>1,\*</sup>,

<sup>1</sup> *Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice*

\* email korešpondujúceho autora: vladimir.girman@upjs.sk

---

**ABSTRAKT** Moderné elektrónové mikroskopy majú extrémnu citlivosť na prostredie, v ktorom sa nachádzajú. Netýka sa to len samotného laboratória, ale aj širokého okolia. Teplotu, vlhkosť a čistotu prostredia v laboratóriu vieme kontrolovať s veľkou presnosťou. Vždy sa však musíme nejakým spôsobom vysporiadať so závažnejšími vplyvmi, ako sú elektromagnetické polia a mechanické vibrácie. Elektromagnetické polia vieme v súčasnosti pomerne úspešne tieniť alebo kompenzovať. Najväčší problém však predstavujú mechanické vibrácie, ktoré rovnako ako elektromagnetické polia môžu byť externé alebo môžu pochádzať priamo z prostredia laboratória. Vybudovať laboratórium elektrónovej mikroskopie s dobrým tienením mechanických vibrácií je s rastúcim optickým výkonom elektrónových mikroskopov čoraz väčšia výzva.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** Transmisná elektrónová mikroskopia; akustické vibrácie

---

### Úvod

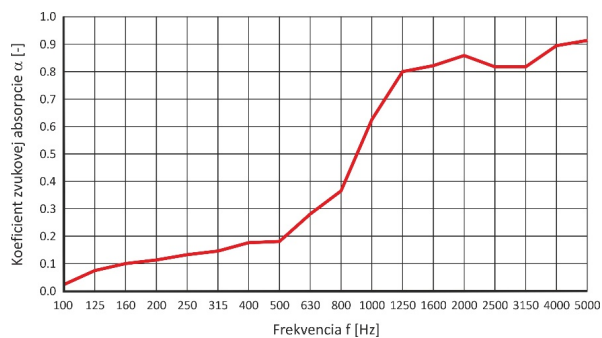
Elektrónové mikroskopy sú čoraz výkonnejšie, a netýka sa to len samotnej optickej sústavy, ale aj dokonalejších a novších analytických techník. Na zlepšenie rozlišovacej schopnosti elektrónových mikroskopov je vyvíjané nesmierne úsilie zamerané predovšetkým na vývoj detektorovej techniky a elektrónovej optiky. Vďaka tomu je v súčasnosti najlepšia dosiahnutá hodnota rozlišovacej schopnosti 0.039 nm [1]. Aby sme sa mohli priblížiť k takýmto hodnotám rozlišovacej schopnosti je potrebné zabezpečiť stabilitu elektrónového lúča. Jeho priemer sa pohybuje v rozmedzí niekoľkých desiatok až jednotiek nanometrov. Akýkoľvek posuv len o niekoľko nanometrov, napr. v dôsledku vibrácií, znamená pri zázname obrazu výrazné zníženie kvality. Obyčajne sa rušivými vplyvmi počíta už pri výstavbe laboratória a súčasťou dizajnu je aj tlenie okolitých vplyvov. Dobrým príkladom je rekonštrukcia laboratória na Univerzite v Cardiffe (UK), kde je laboratórium v tesnej blízkosti rušnej cesty a vlakovej trati vo vzdialenosti do 75 m [2]. Pri rekonštrukcii bola v laboratóriu inštalovaná masívna vzduchová platňa s celkovou hmotnosťou 10 500 kg, na ktorej bol inštalovaný mikroskop. Externé mechanické vibrácie sa podarilo znížiť pod úroveň 10 Hz. Aplikovanie takýchto technických možností sú však vysoko nad bežným štandardom. Obvykle je v už postavených budovách možné použiť len korkovú alebo pieskovú základňu pod mikroskop a tlenie akustickou penou na stenách miestnosti.

## Experimentálne metódy a diskusia výsledkov

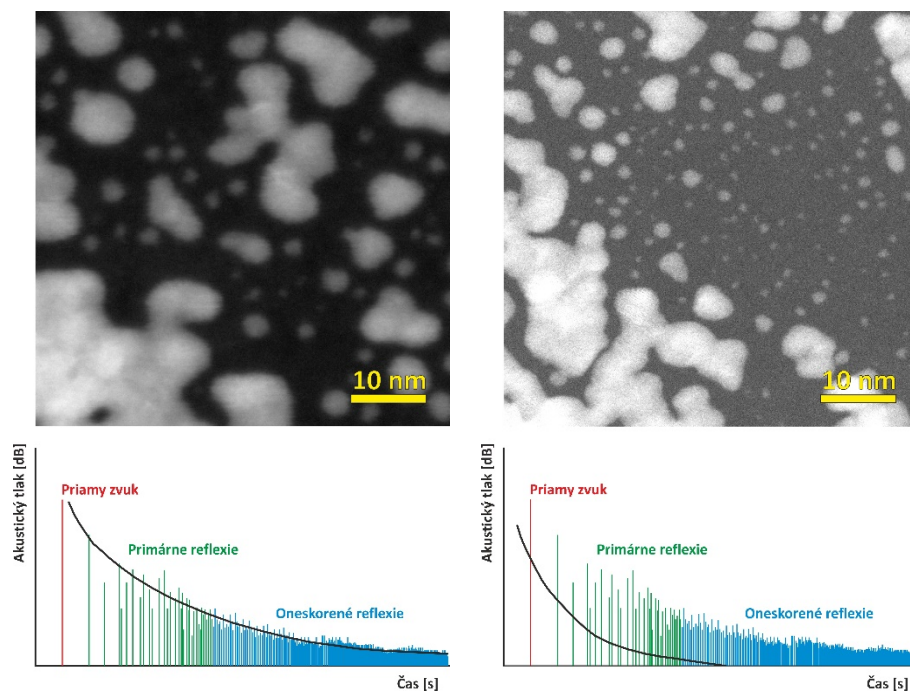
Spoločné laboratórium transmisnej elektrónovej mikroskopie (SLTEM) na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach je vybavené vysoko rozlišovacím transmisným elektrónovým mikroskopom JEOL 2100F UHR, ktorého rozlišovacia schopnosť dosahuje 0.19 nm. Počas rekonštrukcie bola v tvare pôdorysu mikroskopu vytvorená masívna betónová základňa izolovaná od budovy hrubou korkovou stenou. Časom sa však ukázalo, že je potrebné zlepšiť tlmenie mechanických vibrácií, nie však externých, ale pochádzajúcich priamo z laboratória. Pre tento účel bolo laboratórium SLTEM vybavené akustickou penou (obr. 1). Panely akustickej peny majú tvar dosky o hrúbke 2 cm, na ktorej sú výbežky s ihlanovým profilom o výške 5 cm. Takáto akustická pena dokáže s veľkou účinnosťou pohltiť zvukové frekvencie hlavne v stredných a vysokých frekvenčných pásmach, ako je vidno z meraní na obr. 2, ktoré boli vykonané na Ústave fyzikálneho inžinierstva VUT v Brne [3].



**Obr. 1:** Laboratórium SLTEM pred inštaláciou akustickej peny (vľavo) a po inštalácii (vpravo).



**Obr. 2:** Meranie zvukovej pohltivosti akustickej peny s ihlanovým profilom. Prevzaté z [3].



**Obr. 3:** Nanočastice zlata na amorfnom uhlikovom filme. Vľavo pred inštaláciou akustickej peny, vpravo po jej inštalácii.

Zdrojov zvukového šumu v laboratóriu SLTEM je niekoľko. Všetky pochádzajú z podporných sústav samotného mikroskopu, napr. rotačné vývevy, ventilátory chladenia, chladiče vody, vzduchotechnika a pod.. Vo svojej podstate sú teda prirodzenou súčasťou prevádzky mikroskopu ako priamy zdroj zvukových vln. Ich rušivý vplyv je však zvyčajne ešte násobený akustikou miestnosti. Tvrdé rovné steny bez absorpčných vlastností v kombinácii s veľkým objemom miestnosti spôsobujú viacnásobné reflexie priamych zvukových vln a tvoria dozvuk predstavujúci významný frekvenčný šum. Materiál akustickej peny má výrazný absorpčný charakter, založený na fyzikálnom princípe premeny akustickej energie na tepelnú. Druhý pozitívny príspevok k celkovému efektu vyplýva z geometrie povrchu. Ihlany spôsobujú lámanie zvukových vln, ktoré neboli absorbované, do rôznych smerov, čím obmedzuje ich masívne šírenie v miestnosti laboratória. Silný priamy zvuk a dozvuk majú s rastúcim optickým výkonom mikroskopu silnejúci negatívny vplyv na kvalitu pozorovania. Prejavuje sa to tak, že pri snahe o zobrazenie atómov nie je možné pozorované miesto správne fokusovať, preparát sa nepravidelne pohybuje, alebo obrazové detektory zaznamenávajú rušený obraz preparátu. Na obr. 3 je možné porovnať rozdiel v kvalite pozorovania pred inštaláciou akustickej peny a po jej inšta-

lácii. Pozorovaným preparátom boli nanočastice zlata naparené na amorfný uhlíkový film. Pre pozorovanie bola použitá technika tmavého poľa v skenovaco/transmisnom režime, pri ktorej sa využíva vysoko uhlový prstencový detektor (High Angle Annular Dark Field – HAADF) a elektrónový lúč s účinným priemerom 0.5 nm. HAADF technika je z týchto dôvodov veľmi citlivá na externé vplyvy. V súvislosti s obidvoma obrázkami je treba poznamenať, že pozorované miesto nie je to isté, ale zväčšenie áno. Pri porovnaní pomocou škálovacej mierky je evidentné, že tlmenie zvukových vln v laboratóriu SLTEM prinieslo viac viditeľných detailov. V dolnej časti obr. 3 je možné vidieť zodpovedajúcu úroveň akustického tlaku reprezentovaného krivkami. Aj z týchto kriviek je zrejmé, že akustická pena priniesla nielen tlmenie dozvuku, ale čiastočne obmedzila aj vplyv priamych zvukových vln.

## Záver

Zlepšenie akustiky miestnosti laboratória SLTEM po inštalácii akustickej peny bolo výrazné. Okamžite sa to prejavilo aj na kvalite zobrazovania pozorovaných preparátov. Mikroskop je možné využívať pri väčších zväčšeniach, čo je najvýraznejšie cítiť pri špeciálnych technikách, napr. HAADF. Okrem priblíženia sa k technickým možnostiam mikroskopu definovaných výrobcom je pozitívnou stránkou aj skrátenie práce na mikroskope a zlepšenie pracovných podmienok pre operátorov mikroskopu.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: “Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)”, ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Jiang Y., Chen Z., Han Y., Deb P., Gao H., Xie S., Purohit P., Tate M.W., Park J., Gruner S.M., Elser V. and Muller D.A., “Electron ptychography of 2d materials to deep sub-ångström resolution”, *Nature*, **559**(7714), (2018), 343–349, doi: 10.1038/s41586-018-0298-5.
- [2] Davies T. E.: Can you operate electron microscope next to a freight train? [cit. 2023-06-07]. Dostupné na internete. URL: <https://www.labbulletin.com/articles/can-you-operate-electron-microscope-next-freight-train>
- [3] Bulletin: Protokol o měření [cit. 2023-06-07]. Dostupné na internete. URL: <https://www.akusticka-izolacia.sk/tovar-ceny/jehlany-7-cm/>

## Selekcia fluorescenčne značených magnetických nanočastíc $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ pre *in vitro* a *in vivo* analýzy

A.A. Matiašová<sup>1,\*</sup>, J. Vargová<sup>1</sup>, V. Bul'ková<sup>1</sup>, E. Beňová<sup>2</sup>, R. Jendželovský<sup>1</sup>, J. Ševc<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 040 01 Košice

<sup>2</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: anna.alexovic.matiasova@upj.s.sk

**ABSTRAKT** Magnetické core-shell nanočastice  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  boli pripravené s cieľom ich potenciálneho využitia ako nosičov liečiv pre cieleň transport v živom systéme. Pre testovanie ich biokompatibility *in vitro* je možná aplikácia viacerých prístupov, vrátane vizualizácie morfológie buniek pomocou mikroskopických techník. Keďže nanočastice predstavujú objekty rozlíšiteľné pomocou elektrónovej mikroskopie, ich rutinné zobrazovanie v bunkách a tkanivách sa môže javiť ako pomerne komplikovaná úloha. Pre analýzy prítomnosti nanočastíc v bunkách *in vitro* je alternatívou použitie fluorescenčnej a konfokálnej mikroskopie, ktoré v súčasnosti predstavujú univerzálne nástroje v biozobrazovaní, no vyžadujú konjugáciu nanočastíc s fluorescenčnými molekulami na detekciu signálu. V tomto experimente sme sa zamerali na selekciu typu nanočastíc, ktoré by boli pomocou zvolených mikroskopických prístupov rutinne identifikovateľné v bunkách *in vitro*, a zároveň by boli živým systémom dobre tolerovateľné pre ich ďalšie potenciálne aplikácie *in vivo*. Nanočastice označené ako typ A-G boli syntetizované viacerými prístupmi a konjugované s fluorescenčnou značkou fluoresceín-5-izotiokyanát (FITC). Vzorky boli v koncentrácii 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  pridané k modelovému *in vitro* systému, ktorý predstavovali bunky nádorovej línie pľúcneho karcinómu A549. Bunky boli kultivované 24 hod. od prídania nanočastíc a analyzované pomocou fluorescenčného a konfokálneho mikroskopu. Na základe získaných dát boli pre ďalšie experimentálne postupy zvolené nanočastice typu F a G, ktoré vykazovali najlepší fluorescenčný profil pre kolokalizačné štúdie, pričom bunky si zachovávali intaktný fenotyp.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; core-shell; fluorescenčná značka; biozobrazovanie; *in vitro*

## Úvod

Nanomateriály sú v súčasnej dobe aktívne využívané nielen v priemysle, ale aj v nanomedicíne ako nosiče liečiv [1] určené pre ich cieleň transport, či ako kontrastné látky v biozobrazovaní [2]. Nanočastice našli svoje miesto aj v biologickom výskume ako konjugáty proteínov alebo ich fragmentov pri zobrazovaní buniek a tkanív [3]. Pre aplikáciu novo syntetizovaných nanomateriálov ako nosičov liečiv do živého systému je však nevyhnutná ich dôkladná charakterizácia a analýza biokompatibility. Novo syntetizované materiály obsahujúce magnetit môžu byť v kombinácii s organickými fluorofórmami v *in vitro* modeloch študované pomocou fluorescenčnej a konfokálnej mikroskopie, pričom väzba s fluorofórom musí byť stabilná a systém

nesmie vykazovať známky toxicity [4]. V tejto práci sme sa zamerali na potenciálne aplikácie novo syntetizovaných materiálov na báze  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a  $\text{SiO}_2$ , ktoré boli pripravené odlišným spôsobom, s cieľom selekcie vhodného typu nanočastíc pre ďalšie analýzy v *in vitro* prostredí a ich potenciálne aplikácie ako nosičov liečiv *in vivo*.

## Experimentálne metódy

Magnetické nanočastice použité v experimente predstavovali systém tvorený kovovým jadrom ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), vrstvou tvorenou nepórovitým  $\text{SiO}_2$  alebo kyselinou olejovou a povrchovým pórovitým obalom ( $\text{SiO}_2$ ). V experimente bolo použitých 6 typov nanočastíc s odlišnými vlastnosťami, ktoré boli pripravené rôznymi spôsobmi (A, E - syntéza povrchovej vrstvy  $\text{SiO}_2$  pomocou surfaktantu CTAB; B, C - stredná vrstva tvorená kyselinou olejovou; F, G - povrchová vrstva z  $\text{SiO}_2$  pripravená extrakciou alebo kalcináciou surfaktantu BRIJ S10). Nanočastice boli konjugované s fluorescenčnou značkou FITC a pridané k bunkám nádorovej línie pľúcneho karcinómu A549 (ATCC Rockville). Bunky boli kultivované za štandardných podmienok v médiu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) s 10 % fetálnym tel'acím sérom (Biosera) a zmesou antibiotík (1 % prípravok Antibiotikum Antimykotikum 100× a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamycínu, Biosera) v inkubátore pri 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  a 95 % vlhkosti, pasážované a nasadené na mikroskopické sklíčka s 12-jamkovou silikónovou mriežkou (ibidi GmbH) v počte 5 000 buniek/jamku. Všetky nasledujúce kroky boli vykonávané v tme, keďže k bunkám boli pridané jednotlivé typy fluorescenčne značených nanočastíc pripravených v 0.1 M PBS (ďalej len PBS) vo finálnej koncentrácii 100  $\mu\text{l}/\text{ml}$ . Bunky boli kultivované 24 hod., premyté v PBS a 20 min. fixované 4 % paraformaldehydom v 0.1 M PB. Vzorky boli následne premyté v PBS, pričom časť vzoriek bola vysušená a montovaná do montovacieho média Prolong®Gold s nukleárnym markerom DAPI (Invitrogen) pre prvotnú analýzu fluorescencie nanočastíc pomocou fluorescenčného mikroskopu. Pre analýzu stability fluorescencie nanočastíc po permeabilizácii buniek nevyhnutnej pri imunoznačení vzoriek a pre meranie excitácie a emisie fluorescenčnej značky FITC, resp. možnej autofluorescencie nanočastíc (tzv. xy $\wedge$  skenovanie) pomocou konfokálneho mikroskopu, bola druhá časť vzoriek premývaná 30 min. v PBS s 0.03% Tritonom X-100 (ďalej len PBST), následne premytá v PBS, 20 min. značená pomocou jadrovej značky DRAQ5 (1:1000, Cell Signalling Technology), premytá v PBS, vysušená a zamontovaná rovnakým spôsobom. Tretia časť vzoriek bola spracovaná pre imunofluorescenčnú kolokalizáciu pripravených typov nanočastíc s markerom cytoskeletu buniek a na analýzu integrity buniek po kultivácii s nanočasticami. Nešpecifická proteínová aktivita bola blokováná 5 % roztokom normálneho oslieho séra (NOS, Jackson ImmunoResearch) v PBST. Následne bola pridaná primárna protilátka (*anti-vimentin made in chicken*, 1:500, Abcam) v PBST a vzorky boli inkubované cez noc pri 4 °C. Po inkubácii s primárnou protilátkou boli vzorky premyté v PBS a značené pomocou sekundárnej protilátky (*donkey anti-chicken AlexaFluor594*, 1:500, Jackson Im-

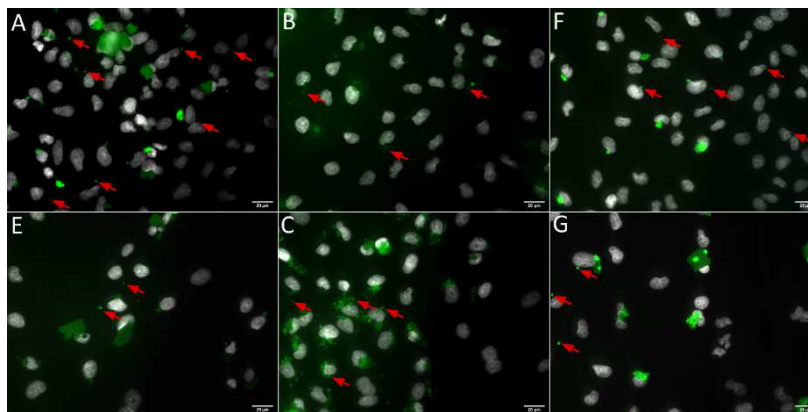


munoResearch) v PBST do dobu 2 hodín. Vzorky boli premyté v PBS, jadrá buniek boli značené pomocou DRAQ5, premyté v PBS, vysušené a zamontované. Analýzy fluorescence boli realizované pomocou fluorescenčného mikroskopu Leica DMI 6000 B, Leica Thunder Imager DMi8 a konfokálneho systému Leica TCS SP5 X (Leica Microsystems).

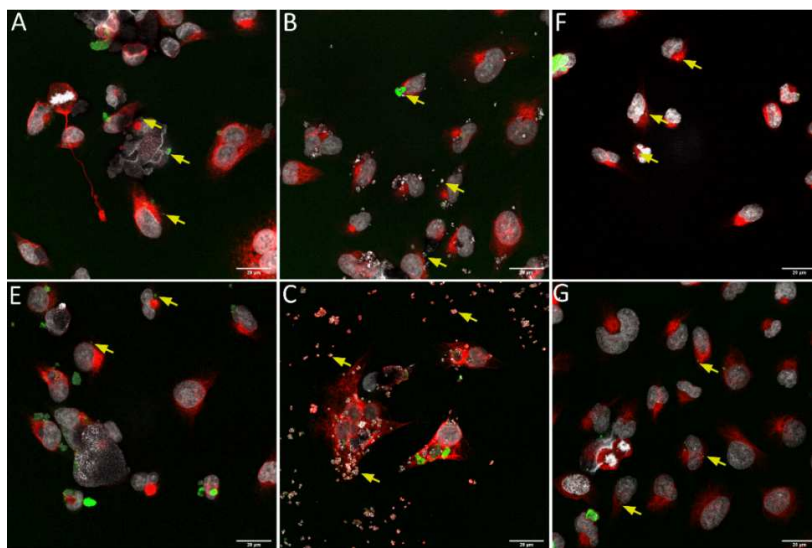
## Výsledky

V prvom kroku sme sa zamerali na analýzu fluorescenčného signálu FITC pomocou fluorescenčného mikroskopu vo vzorkách buniek A549 kultivovaných 24 hod. s nanočasticami. Z úvodných analýz vyplynulo, že u všetkých typov študovaných nanočastíc možno detegovať fluorescenčný signál v oblasti emisie FITC, avšak signál fluorescenčnej značky sa pri jednotlivých typoch nanočastíc odlišoval. Najjasnejší signál FITC bol zaznamenaný pri vzorkách A, F a G, pričom jadrá buniek, ktoré boli s nanočasticami kultivované si zachovali normálny tvar. Pomerne slabý signál bol zaznamenaný u nanočastíc typu E, ktoré vo vzorkách tvorili veľké zhluky. V prípade vzoriek B a C, u ktorých kovové jadro pokrýva kyselina olejová bolo pozorované výrazné zhlukovanie nanočastíc v okolí buniek (Obr.1).

Následné analýzy vzoriek pomocou konfokálnej mikroskopie (tzv.  $xy\lambda$  skenovanie) dokázali, že jednotlivé typy nanočastíc vykazujú okrem signálu FITC, aj excitáciu a emisiu v červenej a ďalej červenej oblasti viditeľného spektra (tzv. autofluorescenciu), čo môže sťažovať kolokalizačné analýzy pri imunoznačení buniek.  $xy\lambda$  skenovanie (excitácia 470nm - 650nm - každých 10 nm; zber 10 nm za excitač-



**Obr. 1:** Mikrofotografie nádorových buniek línie A549 kultivovaných 24 hod. s fluorescenčne značenými nanočasticami typu A-G. Nanočastice boli identifikované ako zhluky s rôznou intenzitou fluorescenčného signálu (zelená, FITC), jadrá buniek (sivá, DAPI), menšie zhluky nanočastíc (červené šípky).



**Obr. 2:** Mikrofotografie nádorových buniek línie A549 kultivovaných 24 hod. s fluorescenčne značenými nanočasticami typu A-G. Vzorky boli nasnímané pomocou konfokálneho mikroskopu (z-projekcie). Nanočastice typu F a G predstavujú vzorky s fluorescenčným signálom FITC (FITC, zelená) bez autofluorescencie v červenej oblasti a bez negatívneho vplyvu nanočastíc na *in vitro* bunkovú kultúru, zatiaľ čo vzorka B a hlavne vzorka C vykazuje jasne viditeľný signál v červenej oblasti spektra (červená, zodpovedá emisii AlexaFluor594) a v oblasti ďalej červenej (sivá, zodpovedá emisii DRAQ5). Cytoskelet buniek (červená, intermediárny filament vimentín), jadrá buniek (sivá, DRAQ5), menšie zhluky nanočastíc (žlté šípky).

nou vlnovou dĺžkou do 710 nm) odhalilo, že najvhodnejším typom nanočastíc pre kolokalizačné štúdie sú nanočastice typu F a G s fluorescenciou v oblasti emisného spektra FITC, zatiaľ čo ostatné typy nanočastíc, hlavne nanočastice B a C, vykazovali výraznú autofluorescenciu v červenej a ďalej červenej časti spektra viditeľného svetla. Navyše, kolokalizačná analýza cytoskeletu buniek s vybranými typmi nanočastíc odhalila, že najmenej vhodnými nanočasticami pre ďalšie *in vitro* a *in vivo* analýzy sú nanočastice typu B a C, nakoľko pri týchto typoch nanočastíc bola vo vzorkách pozorovaná narušená integrita buniek, ktorú sme v menšej miere zaznamenali aj v prípade buniek kultivovaných s nanočasticami typu A a E (Obr.2).

## Záver

V tejto práci sme sa zamerali na selekciu vhodného typu novo syntetizovaných nanočastíc  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  pre ich potenciálne aplikácie v živom systéme, ako nosičov

liečiv. Pre testovanie nanočastíc v *in vitro* modeloch je možné použiť vizualizačné techniky za pomoci konjugácie nanočastíc s fluorescenčnými molekulami. Z našich experimentov vyplýva, že vhodným typom nanočastíc pre ďalšie analýzy *in vitro*, ktoré by potvrdili alebo vyvrátili možnosť ich následnej aplikácie *in vivo* sú nanočastice typu F a G, ktorých pórovitá povrchová vrstva z SiO<sub>2</sub> bola pripravená extrakciou alebo kalcináciou surfaktantu BRIJ S10. Nanočastice typu F a G vykazovali najlepší fluorescenčný profil pre kolokalizačné štúdie, pričom bunky si zachovávali intaktný fenotyp.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Mitchell M.J., Billingsley M.M., Haley R.M., Wechsler M.E., Peppas N.A. and Langer R., "Engineering precision nanoparticles for drug delivery", *Nature Reviews Drug Discovery*, **20**(2), (2020), 101–124, doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.
- [2] Wáng Y.X.J. and Idée J.M., "A comprehensive literatures update of clinical researches of superparamagnetic resonance iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging", *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, **7**(1), (2017), 88–122, doi: 10.21037/qims.2017.02.09.
- [3] Piludu M., Medda L., Monduzzi M. and Salis A., "Gold nanoparticles: A powerful tool to visualize proteins on ordered mesoporous silica and for the realization of theranostic nanobioconjugates", *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(7), (2018), 1991, doi: 10.3390/ijms19071991.
- [4] Mahon E., Hristov D.R. and Dawson K.A., "Stabilising fluorescent silica nanoparticles against dissolution effects for biological studies", *Chemical Communications*, **48**(64), (2012), 7970, doi: 10.1039/c2cc34023b.



**Časť V**

**Prezentované príspevky**



## Štúdium morfológie magnetických nanočastíc pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie

*E. Nagy<sup>1</sup>, A. Zeleňáková<sup>1</sup>, P. Hrubovčák<sup>1</sup>, J. Szücsová<sup>1</sup>, M. Barutiak<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice*

\* email korešpondujúceho autora: lubos.nagy@student.upjs.sk

---

ABSTRAKT Pri výskume magnetických nanočastíc je dôležité potrebné poznať ich morfológiu - tvar a veľkostnú distribúciu pozorovaného súboru nanočastíc. Na určenie týchto parametrov je potrebné realizovať pozorovania pomocou elektrónovej mikroskopie. Z projektu NANOVIR bol zakúpený skenovací elektrónový mikroskop JEOL JSM-IT700HR. V tomto príspevku približujeme parametre tohto prístroja ako aj postup prípravy a pozorovania vzorky obsahujúcej magnetické nanočastice.

KLÚČOVÉ SLOVÁ magnetické nanočastice; skenovací elektrónový mikroskop

---

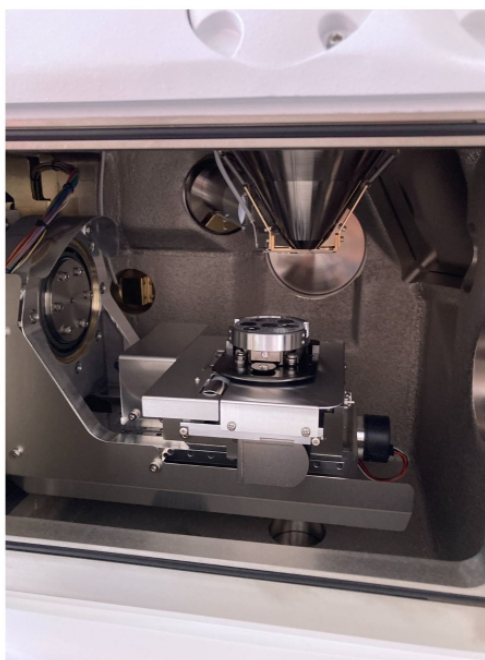
### Úvod

Aktuálne využitie nanomateriálov je možné pozorovať v mnohých technických a vedeckých odboroch, ako je napríklad elektronika, biomedicína a environmentálne inžinierstvo [1]. Veľký potenciál ich použitia sa ukazuje aj v biomedicínskej oblasti, kde prebieha intenzívny výskum so zameraním na vývoj nových, špecifických nanosystémov ukazujúce mnohé perspektíva, hlavne v oblasti zdokonaľovania terapie nádorových ochorení a rôznych diagnostických metód. Aby bolo možné jasne určiť oblasť použitia magnetických nanočastíc je nutné preskúmať ich magnetické, štruktúrne a morfológické vlastnosti. Morfológia nanočastíc - ich tvar a veľkostná distribúcia výrazne ovplyvňuje široké spektrum vlastností skúmaných systémov, ako napríklad hodnota magnetizácie nasýtenia, veľkosť magnetického momentu či silu vzájomných interakcií nanočastíc. Na získanie informácií o tvare a štruktúre vzoriek sa vo všeobecnosti využívajú rôzne druhy mikroskopie, hlavne transmisná (TEM) a skenovacia (SEM). Pri SEM mikroskopii emitované elektróny dopadajú na vzorku ale neprechádzajú ňou a po odraze od povrchu vzorky nesú informácie z povrchu materiálu do detektora, kde sú následne vyhodnocované. Tento typ mikroskopie sa používa na zobrazovanie povrchu materiálov a umožňuje zobrazovať jeho unikátne štruktúry, ako sú napríklad povrch bunkových tkanív, kryštalické štruktúry, geometriu a veľkostnú distribúciu pozorovaných objektov. Okrem získavania informácií o morfológií vzoriek umožňuje SEM elektrónová mikroskopia aj analýzu prvkového zloženia skúmaných materiálov. Za týmto účelom nám slúži tzv. EDS (energetický disperzný) detektor, ktorý vyhodnocuje prítomnosť jednotlivých prvkov v materiáli a ich vzájomný pomer. Princíp EDS detekcie spočíva vo vyvolaní excitovaného stavu elektrónov na povrchu materiálu, ktorý je bombardovaný elektrónovým zväzkom. Tento stav elektrónov v atónoch skúmanej vzorky

je nestabilný, preto sa atómy snažia vrátiť do svojho stabilného stavu. Pri tomto procese sa uvoľňuje energia vo forme charakteristických röntgenových lúčov, ktoré zodpovedajú prítomným prvkom v materiáli. Týmto vieme získať približnú pozíciu atómov na pozorovanom obraze vzorky [2].

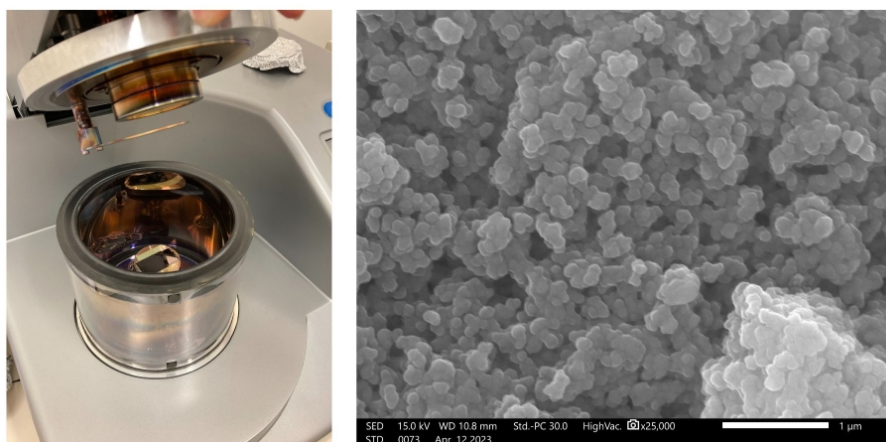
### Experimentálne metódy a diskusia výsledkov

Na štúdium magnetických nanoskopických systémov bol v rámci projektu NANO-VIR zakúpený skenovací elektrónový mikroskop JEOL JSM-IT700HR, ktorý ako zdroj elektrónov využíva Schotkyho katódu. Jedná sa o špeciálny typ wolfrámového vlákna, ktoré je dodatočne potiahnuté vrstvou  $ZnO_2$ . Táto modifikácia umožňuje emitovať vyšší a stabilnejší prúd elektrónov, čo je veľmi výhodné pre samotné pozorovanie, EDS analýzu a taktiež difrakciu spätného rozptylu elektrónov (pri použití EBSD detektor) [2]. Na prevádzku tejto katódy je potrebné ultra vysoké vákuum ( $10^{-8}$  až  $10^{-9}$  Pa), aby sa udržal povrch katódy čistý a aby sa zabránilo elektrickým výbojom. Táto požiadavka je dosiahnutá použitím niekoľkých vysoko-vákuových čerpadlami, čo však značne zvyšuje náklady na prevádzku. Zároveň tento typ mik-



**Obr. 1:** Obrázok naľavo - skenovací elektrónový mikroskop JEOL JSM-IT700HR. Obrázok napravo - pohľad do komory mikroskopu.





**Obr. 2:** Obrázok naľavo - naprašovanie vzorky vrstvou zlata. Obrázok napravo - obraz z pozorovania nanočastíc  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obalených  $\text{SiO}_2$ .

roskopu umožňuje realizáciu pozorovania v tzv. nízkom vákuu, ktoré sa využíva pri menej vodivých (napríklad biologických) preparátov a jeho súčasťou je aj EDS detektor.

Základnou podmienkou úspešného pozorovania pomocou SEM mikroskopie je mať dobre vodivý povrch pozorovanej vzorky, ktorý bude odvádzat' elektrický náboj. Tento náboj vzniká pri interakcii atómov vzorky a prúdom elektrónov a na pozorovacom obraze spôsobuje výrazne zosvetlenie. Tomuto nežiadúcemu efektu, ktorý výrazne znižuje kvalitu pozorovania, vieme predchádzať dvoma spôsobmi: i) použitím tenkej vrstvy vzorky, čím sa zabráni kumulovaniu náboja vo vrstvách vzorky a zároveň ii) naprašovaním vodivej vrstvy na povrch vzorky (napríklad uhlíkom alebo zlatom), pomocou ktorej sa náboj odvedie do držiaka vzorky. V prípade pozorovania vzoriek obsahujúcich nanočastice vieme pripraviť dostatočne tenkú vrstvu vzorky použitím tzv. spin-coutera, kde sa kvapalná vzorka kvapne na pozorovacie sklíčko a následne sa odstredí, čím vznikne tenký film na jeho povrchu. Takto nanesenú vzorku je nutné v ďalšom kroku naprašit' tenkou vrstvou uhlíka alebo zlata, čím dosiahneme súvislú vodivú vrstvu na celom povrchu. Následne sa toto sklíčko (ktoré samotné je nevodivé) pripevní na povrchu hliníkového držiaka vzorky použitím vodivej pasty/lepidla tak, aby bol povrch vzorky vo vodivom kontakte so samotným držiakom, ktorý vznikajúci náboj bude absorbovať. Vzorky s obsahom nanočastíc pozorujeme pri prúde 30 mA a urýchľovacom napätí 5-20 kV v ultra-nízkom vákuu. Výstupom nášho pozorovania sú obrázky nanočastíc vo vysokom rozlíšení, taktiež vyhodnotenie veľkostnej distribúcie, percentuálne zastúpenie jednotlivých prvkov vo vzorke ako aj poloha jednotlivých atómov získaných z EDS analýzy.

## Záver

V tomto príspevku sa venujeme charakterizácii a opisu SEM mikroskopu, ktorý bol zakúpený v rámci projektu NANO VIR. Taktiež opisujeme postup prípravy vzoriek obsahujúcich magnetické nanočastice na pozorovanie a udávame konfiguračné hodnoty rôznych parametrov mikroskopu, pri ktorom je možné pozorovať nanočastice vo vysokom rozlíšení.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANO VIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Navya P.N., Kaphle A., Srinivas S.P., Bhargava S.K., Rotello V.M. and Daima H.K., "Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials", *Nano Convergence*, **6**(1), doi: 10.1186/s40580-019-0193-2.
- [2] Bergaya F. and Lagaly G., *Handbook of clay science*, Elsevier, Oxford, 2nd edition (2013).

## Experimentálne štúdium magnetických nanočastíc pre magnetickú separáciu DNA/RNA

**M. Barutiak**<sup>1</sup>, A. Zeleňáková<sup>1</sup>, P. Hrubovčák<sup>1</sup>, E. Nagy<sup>1</sup>, J. Szücsová<sup>1</sup>, M. Lisnichuk<sup>1</sup>, E. Beňová<sup>2</sup>, A. Antošová<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

<sup>2</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>3</sup> Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.v.i., Watsonova 47, 040 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: michael.barutiak@student.upjs.sk

---

**ABSTRAKT** Práca sa zaoberá problematikou aplikácie magnetických nanočastíc ako separačných činidiel nukleových kyselín v RT-PCR testovaní. Cieľom práce je navrhnúť také nanočasticové systémy, ktoré by svojimi špecifickými vlastnosťami ako je tvar, veľkosť magnetického momentu, či prítomnosť ligandu na povrchu nanočastíc, urýchlili separáciu nukleových kyselín a zvýšili množstvo naviazaného genetického materiálu počas RT-PCR testovania. Potenciál magnetických nanočastíc viazať DNA/RNA molekuly je preskúmaný na nanočasticách typu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> obalených SiO<sub>2</sub> so špecifickým organickým ligandom na povrchu. Tento typ nanočastíc je zároveň charakterizovaný z hľadiska štruktúry, morfológie a magnetických vlastností.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; ligand; jadro-obal; separácia DNA/RNA

---

## Úvod

Magnetické nanočastice sú predmetom mnohých výskumov a prinášajú širokú škálu ich využitia vďaka svojim jedinečným vlastnostiam, ako je ich veľkosť alebo existencia vysokej hodnoty magnetického momentu. Zaujímavé je ich využitie v biomedicíne, kde sa ukazujú ako sľubné nosiče liečiv, ako zdroje tepla pri magnetickej hypertermii na liečbu nádorových ochorení, v zobrazovacích technikách a tiež v separačných technikách využívajúcich vonkajšie magnetické pole [1]. Separáčne techniky sú známe svojou časovou a technickou náročnosťou, čo často prináša negatívne dopady v procese diagnostiky a terapie rôznych vírusových a bakteriálnych ochorení. Taktiež špecifickosť rôznych vírusových a bakteriálnych ochorení obmedzuje možnosti použitia konvenčných separačných techník z dôvodu nízkej koncentrácie zachytených cieľových látok. Jedným z prístupov v tejto oblasti je magnetická separácia pomocou magnetických nanočastíc [2]. Tie sú vďaka svojmu špecifickému povrchu vhodné ako médium na separáciu cieľových látok. Ich magnetické vlastnosti výrazne znižujú časovú náročnosť celého separačného procesu vďaka rýchlemu naviazaniu a oddeleniu cieľových látok z biologickej vzorky pomocou vonkajšieho magnetického poľa [3]. Magnetické nanočastice vhodné na

magnetickú separáciu musia spĺňať 3 základné podmienky: i) vhodná veľkosť zabezpečujúca veľký interagujúci povrch nanočastíc, ii) dispozícia dostatočne veľkého magnetického momentu nanočastíc a iii) prítomnosť aktívnych látok - ligandov na ich povrchu viažúcich cieľové látky [4]. Magnetická separácia je užitočná metóda v diagnostickej mikrobiológii, kde zvyšuje špecifickosť a citlivosť iných detekčných metód, ako je PCR a poskytuje výraznú úsporu času v porovnaní s tradičnými diagnostickými metódami.

## Experimentálne metódy a výsledky

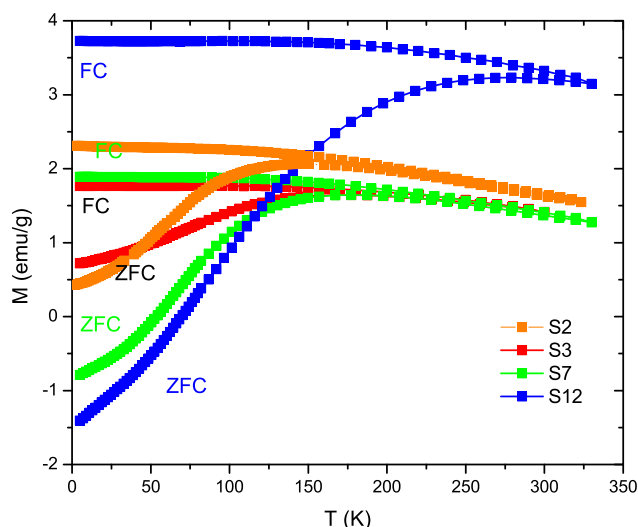
Magnetické jadro  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bolo syntetizované metódou ko-precipitácie. Príslušné množstvá  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  a  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  boli rozpustené v destilovanej vode v stechiometrickom pomere 2:1. Roztok sa zahrial na  $60\text{ }^\circ\text{C}$  a potom sa rýchlo pridalo 15 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Čierna zrazenina sa zachytila sedimentáciou, premyla vodou a vysušila pri izbovej teplote. Molárne pomery sa upravili tak, aby veľkosť pripravených nanočastíc bola približne do 10 nm [5]. Postup syntézy je opísaný nasledovne:



K získaným nanočasticiam  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sa pridali TEOS, aby sa získali nanočastice s jadrom a obalom z oxidu kremičitého, na ktorý sa potom naviazali rôzne ligandy. Pripravili sa štyri rôzne vzorky označené ako S2, S3, S7 a S12, kde vo vzorke S2 je 3-(aminopropyl)triethoxysilán (APTES)  $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$ , S3 je (3-merkaptopropyl)trimetoxysilán (MPTMS)  $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ , vo vzorke S7 je fenyln-3-aminopropyltrimetoxysilán (FAPTMS)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$  a vo vzorke S12 je 3-(trimetoxysilyl)propylmetakrylát (MMSP)  $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ . Ako východisko pre syntézu boli použité dvojvrstvé vzorky, ktorých štruktúrna charakterizácia potvrdila, že jadro tvoria magnetické nanočastice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obalené vrstvou  $\text{SiO}_2$ . Následne na túto základnú vzorku boli modifikované rôzne organické ligandy. Základ pre všetky štyri ligandované vzorky je totožný.

Pomocou röntgenovej difrakcie bolo potvrdené, že vzorky S2, S3, S7 a S12 majú rovnaké magnetické jadrá zložené z  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a obalu  $\text{SiO}_2$  a jednotlivé rozdiely v magnetickom správaní boli spôsobené prítomnosťou rôznych ligandov na ich povrchu. SEM pozorovania potvrdili sférický tvar nanočastíc. Zeta potenciál všetkých študovaných vzoriek (okrem vzorky S2) potvrdzuje dostatočne veľké záporné hodnoty, ktoré hovoria o ich dobrej koloidnej stabilite.

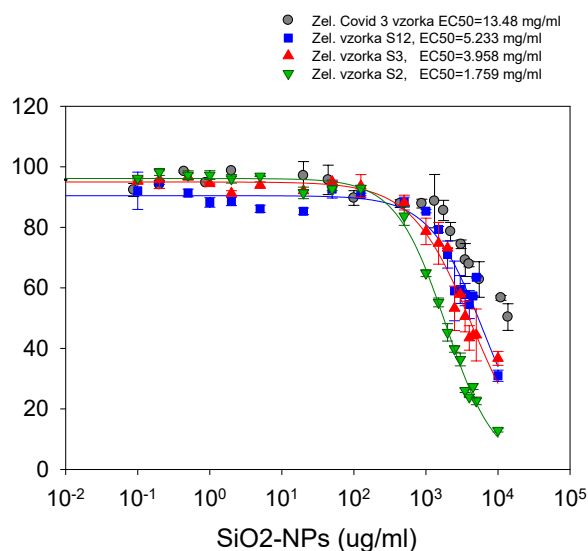
Magnetické vlastnosti sa merali na magnetometri MPMS 5XL na báze SQUID, Quantum Design, v teplotnom rozsahu od 2 K do 300 K a v jednosmernom poli do 50 000 Oe. Prášková vzorka bola zabezpečená proti pohybu a umiestnená v plastovom držiaku. Z nameraných magnetických výsledkov sme vytvorili graf kriviek ZFC-FC (Obr.1) našich štyroch nameraných vzoriek. Pri všetkých štyroch nameraných dátach môžeme vidieť náznaky prítomnosti silných medzičasticových interakcií, čo naznačuje FC plató [6,7]. Krivky majú podobný tvar pre vzorky S2, S3 a S7, čo



**Obř. 1:** Teplotná závislosť magnetizácie meraná v režimoch ZFC/FC pri 100 Oe pre 4 rôzne vzorky s organickými ligandmi. Modrý symbol predstavuje vzorku S12, oranžový symbol vzorku S2, červený symbol vzorku S3 a zelený symbol vzorku S7.

nám hovorí o podobnom magnetickom správaní, ktoré sa líši od vzorky S12. Keďže magnetické jadrá sú rovnaké pre všetky tri vzorky, dané rozdiely v tvaroch kriviek pripisujeme ligandom, ktoré sú viazané na magnetické jadrá a sú odlišné pre každú vzorku.

Vykonalí sme protokol extrakcie RNA pomocou MNP (magnetických nanopartikúl) a fluorescenčný test vytesnenia etídiumbromidu [8] na našich vzorkách S1, S2, S3 a S12 aby sme zistili potenciál našich vzoriek viazať RNA. Na skúmanie schopnosti študovaných nanočastíc SiO<sub>2</sub>@MNP extrahovať RNA sa použil jednoduchý väzobno-preplachovací-elučný protokol. Prebehla inkubácia 1 mg/ml RNA v zmesi s 80  $\mu$ l SiO<sub>2</sub>@MNP (40 mg/ml) a s väzobným pufrom obsahujúcim PEG 20 000. RNA naviazaná na SiO<sub>2</sub>@MNP sa extrahovala pomocou vonkajšieho magnetického poľa, po extrakcii nasledovalo stanovenie koncentrácie RNA v eluovanom roztoku. Vybrali sme si vzorky S1, S2, S3 a S12. Zo všetkých vzoriek sme navázili 10 mg a pridali sme 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Takto pripravené vzorky sme dali na 3 minúty sonifikovať. Po sonifikácii sme z každej vzorky odobrali 2-krát 100  $\mu$ l a vložili ich do ependorfiek a vytvorili tak nové vzorky S1A, S1B, S2A, S2B, S3A, S3B, S12A a S12B. Do každej ependorfky sme pridali 250  $\mu$ l polyetylén glykolu (PEG) a 80  $\mu$ l RNA. Pri našom meraní sme používali PEG s priemernou molárnou hmotnosťou približne 20 000 g/mol. Následne sme nechali vzorky stáť 5 minút. Po 5 minútach sme položili vzorky na magnet, kde sme očakávali, že magnet pritiahne nanočastice s naviazanou RNA k sebe a roztok sa vyčirí. Čirý roztok sme odobrali od usadených nanočastíc pri-



**Obr. 2:** Graf fluorescenčného testu vytesnenia etídiumbromidu.

tiahnutých magnetom a pomocou UV-VIS spektrofotometrie sme stanovili, koľko RNA ostalo v roztoku z každej vzorky S1A, S1B, S2A, S2B, S3A, S3B, S12A a S12B.

Schopnosť študovaných MNP viazať RNA sa zisťovala pomocou fluorescenčného testu vytesnenia etídiumbromidu (EtBr). EtBr bol rozpustený a bol pripravený 1 mM zásobný roztok v 10 mM roztoku TRIS-0,1 mM EDTA (pH 8,0, DNA, bez RNA). RNA bola rozpustená na koncentráciu 1 mg/ml v 10 mM fosfátovom pufrí (pH 7,4) a sonifikovaná 10 min. Koncentrácia RNA bola stanovená pomocou UV-VIS spektroskopie ( $\epsilon_{260} = 7800 \text{ l/M.cm}$ ). Zásobný roztok RNA bol potom zriedený pomocou 10 mM TRIS-EDTA pufru na  $50 \mu\text{g/ml}$ . Najprv sa roztoky RNA a EtBr inkubovali v pomere 5:1. Potom sa študované nanočastice  $\text{SiO}_2\text{@MNP}$  pridali ku komplexom RNA-EtBr v širokom rozsahu koncentrácií (pomer  $\text{SiO}_2\text{@MNP}$  k RNA-EtBr sa pohyboval od 500:1 do 1:200). Intenzita fluorescencie EtBr sa merala v 96-jamkovej platni po 30 minútach inkubácie v tme pri  $25^\circ\text{C}$  pomocou čítačky Synergy Mx (Bio-Tech). Excitačná vlnová dĺžka bola 545 nm a emisné spektrá sa detegovali v rozsahu 595 – 700 nm. Vzorky bez NP predstavovali kontrolu (100 %) [8]. Pridanie študovaných  $\text{SiO}_2\text{@MNP}$  (S1, S12, S3, S2) pri fluorescenčnom teste vytesnenia etídiumbromidu mohlo viesť k odstráneniu EtBr pozorovanému ako pokles intenzity fluorescencie. Väzba študovaných  $\text{SiO}_2\text{@MNP}$  na RNA viedla k poklesu fluorescencie EtBr v závislosti od koncentrácie. Z koncentračnej závislosti sa vypočítala hodnota EC50. Táto hodnota udáva koncentráciu MNP s 50 % účinnosťou odstránenia EtBr z povrchu RNA. Z nameraných výsledkov môžeme povedať že z testovaných vzoriek sa javí najlepšie vzorka S2 s ligandom APTES - 3-(aminopropyl)triethoxysilán

**Tabuľka 1:** Schopnosť študovaných nanočastíc viazať RNA.

SiO <sub>2</sub> @MNP	Biologická aktivita	
	Väzbový potenciál EC <sub>50</sub> [mg/mL]	Separáčna efektívnosť [%]
S1	13,48	7,43
S12	5,23	2,27
S3	3,96	0,42
S2	1,76	66,79

s najnižšou hodnotou EC<sub>50</sub> (Obr.2) a najvyššou RNA separačnou schopnosťou z pomedzi našich vzoriek (Tab.1). Tento výsledok je v zhode s tým čo sme aj očakávali, pretože vzorka S2 má naviazané funkčné amínové skupiny, ktoré majú voľné pozície a virálna RNA sa môže naviazať na tieto voľné centrá. Z prvej metodológie vyšla takisto najlepšia vzorka S2 (Tab.1).

## Záver

V tejto práci sme skúmali nami syntetizované nanočastice pozostávajúce z Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> jadra obaleného vrstvou SiO<sub>2</sub> so špecifickým organickým ligandom na povrchu. Nanočastice sme charakterizovali z hľadiska štruktúry, morfológie a magnetických vlastností a následne sme študovali ich potenciál viazať RNA. Táto štúdia pozostávala z dvoch testov a to z fluorescenčného testu vytesnenia etídiumbromidu a z protokolu extrakcie RNA pomocou MNPs. Z nameraných výsledkov nám vyšlo, že z našich vzoriek vyšla najlepšie vzorka S2 s ligandom APTES, ktorá vykazovala oveľa vyššiu účinnosť ako vzorka S1, ktorá ligand neobsahovala ako aj ostatné ligandované vzorky. Výsledky tejto práce majú význam pre ďalší výskum a návrh experimentov, ktoré umožnia nájsť magnetické nanočastice, ktoré budú mať rovnaké, prípadne lepšie separačné vlastnosti ako nanočastice používané v komerčnom KIT-e na magnetickú separáciu pomocou RT-PCR.

POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] He J., Huang M., Wang D., Zhang Z. and Li G., "Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **101**, (2014), 84–101, doi: 10.1016/j.jpba.2014.04.017.

- [2] Zhang X., Wang J., Li R., Dai Q., Gao R., Liu Q. and Zhang M., "Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> layered double hydroxide composite for magnetic separation of uranium", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **52**(30), (2013), 10 152–10 159, doi: 10.1021/ie3024438.
- [3] Shao M., Ning F., Zhao J., Wei M., Evans D.G. and Duan X., "Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> layered double hydroxide core-shell microspheres for magnetic separation of proteins", *Journal of the American Chemical Society*, **134**(2), (2012), 1071–1077, doi: 10.1021/ja2086323.
- [4] Uyttendaele M., Hoorde I.V. and Debevere J., "The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese", *International Journal of Food Microbiology*, **54**(3), (2000), 205–212, doi: 10.1016/S0168-1605(99)00196-8.
- [5] Mandel K., Hutter E., Gellermann C. and Sextl G., "Synthesis and stabilisation of superparamagnetic iron oxide nanoparticle dispersions", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **390**(1-3), (2011), 173–178, doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.09.024.
- [6] Poddar P., Srikanth H., Morrison S. and Carpenter E., "Inter-particle interactions and magnetism in manganese-zinc ferrite nanoparticles", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **288**, (2005), 443–451, doi: 10.1016/j.jmmm.2004.09.135.
- [7] Barutiak M., Zeleňáková A., Hrubovčák P., Nagy L., Szűcsová J., Beňová E. and Zeleňák V., "Comparison of magnetic properties of magnetic beads for magnetic separation", in "AIP Conference Proceedings", AIP Publishing (2023), doi: 10.1063/5.0136666.
- [8] Bednarikova Z., Kubovcikova M., Antal I., Antosova A., Gancar M., Kovac J., Sobotova R., Girman V., Fedunova D., Koneracka M., Gazova Z. and Zavisova V., "Silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, characterization and nucleic acid separation potential", *Surfaces and Interfaces*, **39**, (2023), 102 942, doi: 10.1016/j.surfin.2023.102942.



## Termosenzitivný systém SBA-15-PEI na riadené uvoľňovanie nesteroidného protizápalového liečiva

M. Almási<sup>1</sup>, L. Zauška<sup>1</sup>, V. Zeleňák<sup>1</sup>, V. Hornebecq<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>2</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, MADIREL, UMR 7246, 13397 Marseille, France

\* email korešpondujúceho autora: miroslav.almasi@upjs.sk

**ABSTRAKT** Materiál SBA-15 bol pripravený metódou sol-gel a funkcionalizovaný termosenzitívnymi polyetylénilimínovými polymérmi s rôznou molekulovou hmotnosťou (g.mol<sup>-1</sup>): 800 (SBA-15(C)-800), 1300 (SBA-15(C)-1300) a 2000 (SBA-15(C)-2000). Ako modelové liečivo bolo vybrané nesteroidné protizápalové liečivo (NSAID), diklofenak sodný, ktoré bolo zapuzdrené do pórov pripravených nosičov. Materiály boli charakterizované kombináciou infračervenej spektroskopie (IR), transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM), atómovej silovej mikroskopie (AFM), fotónovej krížovej korelačnej spektroskopie (PCCS), adsorpciou/desorpciou dusíka, termogravimetriou (TG) a malouhlovým rozptylom RTG žiarenia (SAXS). Uvoľňovanie liečiva z pripravených matric bolo realizované do dvoch modelových médií s rôznym pH, simulovaná telesná tekutina (pH = 7,4) a simulovaná žalúdočná tekutina (pH = 2) a taktiež pri rôznych teplotách: normálna telesná teplota (37°C) a zápalová teplota (42°C). Experimentálne výsledky preukázali ich vysoké uvoľňovanie liečiva do roztoku pri pH = 7,4 pre obe teploty, čo súvisí s vysokou rozpustnosťou diklofenaku sodného v mierne alkalickom prostredí. Pri pH = 2 sa pozoroval rozdiel v rýchlosti uvoľňovania liečiva medzi oboma teplotami. Pri vyššej teplote (42 °C) boli rýchlosti a množstvá uvoľneného liečiva dvakrát/trikrát vyššie v porovnaní s hodnotami dosiahnutými pri teplote 37 °C.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** mezoporézny oxid kremičitý; povrchová modifikácia; polyetylénilimíny; diklofenak sodný; teplota a pH

## Úvod

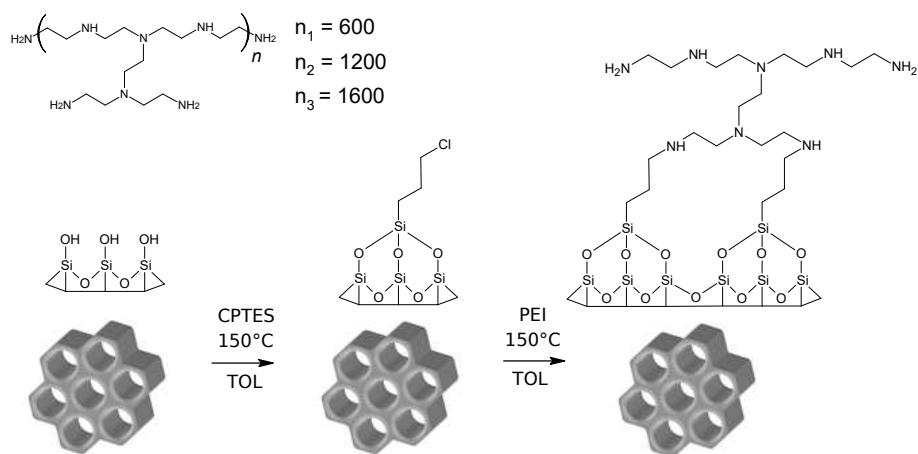
Onkologické alebo infekčné ochorenia často spôsobujú zápal v ľudskom tele. Zápal môže mať lokálny charakter, alebo sa môže šíriť po celom ľudskom tele, pričom je sprevádzaný príznakmi ako bolesť, horúčka a iné. Protizápalové lieky, ako sú nesteroidné protizápalové lieky (NSAID) a analgetiká, sú účinnými supresívami zápalu. Tieto lieky sú však často invazívne a návykové a môžu vykazovať negatívne dlhodobé vedľajšie účinky, ako je poškodenie pečene, obličiek, srdca a kostnej drene. Metódou, ktorá sa ukázala ako pomerne významná, je využitie systému cieleného podávania liekov (DDS) [1]. DDS sú biokompatibilné štruktúry, ako napríklad mezoporóvité formy oxidu kremičitého v ktorých je liečivo zapuzdrené a potom sa uvoľňuje až na cieľovom mieste. Polyetylénilimíny (PEI) majú zaujímavé vlastnosti a ukázali sa ako polyméry citlivé na pH a teplotu [2]. PEI (lineárne alebo rozvetvené formy) sú široko študované a aplikované v DDS ako potiahnutá monovrstva na anorganických nanočasticiach, napr. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, kde sa ako modelové

liečivo použila cisplatina [3], alebo bioorganické substráty ako celulóza na enkapsuláciu salicylátu sodného [2]. PEI bol tiež študovaný ako DDS pre doxorubicín bez akéhokoľvek podporného substrátu, ktorý bol zostavený do sférického nanogélu pomocou zosieťovania [4]. Jedinečnosť nami prezentovanej štúdie spočíva v skúmaní termosenzitívnych vlastností PEI polymérov, ktoré boli prvýkrát študované na poréznom kremičitom materiáli SBA-15, pričom ako protizápalové liečivo bol použitý diklofenak sodný.

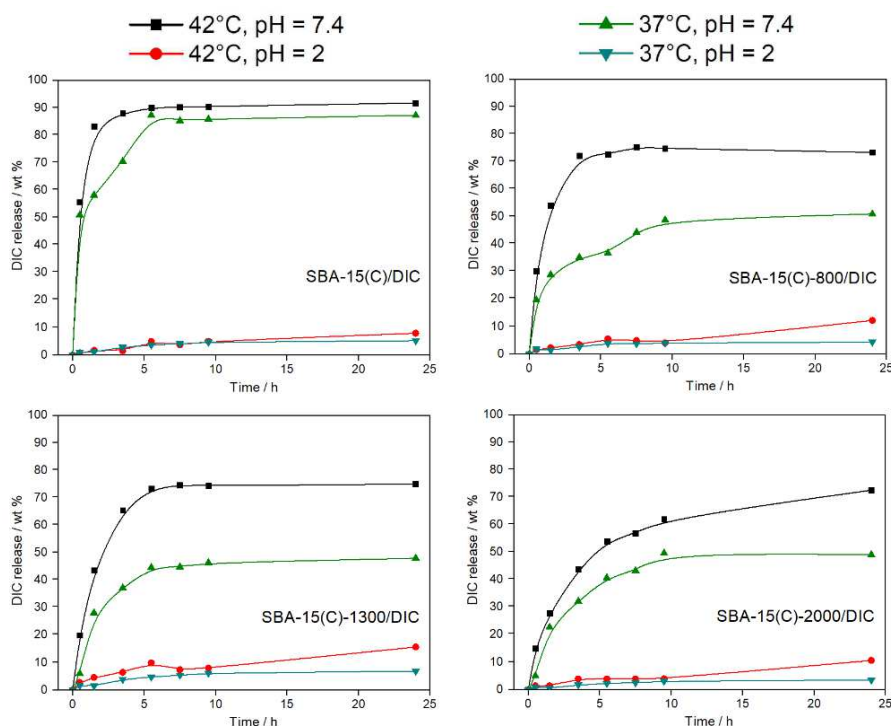
## Experimentálne metódy a výsledky

SBA-15 bola syntetizovaná hydrolýzou a polykondenzačnými reakciami TEOS vo vode s použitím Pluronic-123 ako povrchovo aktívnej látky, HCl ako katalyzátora (SBA-15(AS)) a následne bola zosyntetizovaná vzorka kalcinovaná pri teplote 600 °C (SBA-15(C)). Povrch SBA-15(C), ktorý obsahuje voľné hydroxylové skupiny bol následne modifikovaný molekulami 3-(chlórpropyl)-trimetoxysilánu v suchom toluéne. Tento krok bol nevyhnutný na vytvorenie kovalentnej väzby medzi povrchom SBA-15(C) a polyetylénimínmi prostredníctvom kondenzačnej reakcie. Na povrchovú úpravu boli použité molekuly PEI s rôznymi molekulovými hmotnosťami (800 g/mol (SBA-15(C)-800), 1300 g/mol (SBA-15(C)-1300) a 2000 g/mol (SBA-15(C)-2000), vid' Obr.1). Materiály pripravené opísanými postupmi boli následne použité ako nosiče pre protizápalové liečivo, diklofenak sodný a testované ako termosenzitívne nosiče liečiva.

Infračervená spektroskopia bola meraná na prístroji Nicolet 6700 a infračervené spektrá potvrdili úspešnosť kalcinácie materiálu SBA-15(AS), povrchovú mo-



**Obr. 1:** Schematické znázornenie procesu graftingu a povrchovej modifikácie materiálu SBA-15.



**Obz. 2:** Uvoľňovacie krivky liečiva diklofenak sodný z nemodifikovanej vzorky SBA-15(C)/DIC a modifikovaných materiálov SBA-15(C)-800/DIC, SBA-15(C)-1300/DIC a SBA-15(C)-2000/DIC pri rôznych teplotách a pH prostredia.

difikáciu chlórpropylovými skupinami, naviazanie PEI molekúl a taktiež zapuzdrenie liečiva. Merania adsorpcie/desorpcie dusíka boli realizované na prístroji ASAP 2020 a prostredníctvom tejto techniky boli študované textúrne vlastnosti (veľkosť povrchu, objem pórov) pripravených materiálov. Pôvodný nemodifikovaný materiál vykázal veľkosť špecifického povrchu  $814 \text{ m}^2/\text{g}$ , pričom hodnota sa znižovala modifikáciou PEI zlúčeninami ( $206 \text{ m}^2/\text{g}$  pre SBA-15(C)-800,  $184 \text{ m}^2/\text{g}$  pre SBA-15(C)-1300,  $144 \text{ m}^2/\text{g}$  pre SBA-15(C)-2000). Po uskladnení diklofenaku sodného dochádzalo k výraznému zníženiu veľkosti povrchov nosičov, pričom materiály sa javili ako nepórovité. Prostredníctvom fotónovej krížovej korelačnej spektroskopie (PCCS, Nanophox) boli analyzované veľkosti častíc. Pôvodný, nemodifikovaný materiál SBA-15(C) vykázal veľkosť častíc  $600 \text{ nm}$  a po PEI modifikácii sa veľkosť častíc prekvapivo znížila na hodnoty v intervale  $400\text{-}200 \text{ nm}$ . Uvedený jav možno vysvetliť lepšou separáciou častíc PEI polymérmí, oproti tendencii zhlukovania častíc v dôsledku hydrofóbných interakcií u nemodifikovaného mate-

riálu. Transmisná elektrónová mikroskopia (TEM, JEOL 2000FX), malouhlový rozptyl RTG žiarenia (SAXS, Rigaku Ultima IV) a atómová silová mikroskopia (AFM, Solver PRO) boli taktiež použité na charakterizáciu pripravených materiálov. TEM a SAXS potvrdili hexagonálne usporiadanie pórov v materiáloch a taktiež stabilitu nosičov po PEI modifikácií a uskladnení diklofenaku sodného. AFM bola použitá na potvrdenie naviazania PEI, ktoré sa prejavilo výrazným zvrásnením povrchu modifikovaných materiálov. Na základe hmotnostných zmien na termogravimetrických krivkách (TGA Q500) materiálov bolo vypočítané množstvo PEI a uskladneného liečiva. Enkapsulované množstvá DIC v mg na 1 g nosiča boli vypočítali ako hmotnosť sodnej soli diklofenaku v mg na meter štvorcový nosiča: SBA-15(C)-2000/DIC (0,985 mg/m<sup>2</sup>) SBA-15(C)-1300/DIC (0,971 mg/m<sup>2</sup>) SBA-15(C)-800/DIC (0,998 mg/m<sup>2</sup>) > SBA-15(C)/DIC (0,235 mg/m<sup>2</sup>). Zo získaných hodnôt je možné usúdiť, že afinita sodnej soli diklofenaku je podobná pre všetky materiály modifikované PEI v dôsledku tvorby vodíkových väzieb medzi primárnymi/sekundárnymi skupinami PEI molekúl a karboxylovými skupinami DIC. Uvoľňovacie krivky liečiva z pripravených matric pri pH = 7,4 a 2 a rôznych teplotách (37 a 42 °C) sú znázornené na Obr. 2. Vo všeobecnosti možno skonštatovať, že v kyslých podmienkach (pH = 2) sa sodná soľ diklofenaku protonizuje a transformuje na kyselinu diklofenakovú, ktorá má extrémne nízku rozpustnosť vo vode, čo sa prejavilo na nízkych množstvách uvoľneného liečiva v porovnaní s pH = 7,4. PEI modifikácia mala vplyv na množstvo uvoľneného DIC, nakoľko z modifikovaných materiálov boli uvoľnené menšie množstvá v porovnaní s nemoifikovanými v dôsledku tvorby vodíkových väzieb. Termosenzitivita PEI molekúl sa prejavila pri oboch hodnotách pH, nakoľko pri teplote 42 °C sa uvoľnilo väčšie množstvo liečiva v porovnaní s 37 °C (viď čierna a zelená krivka pre pH = 7,4 a červená a tyrkysová krivka pre pH = 2).

## Záver

V tejto práci sme pripravili, charakterizovali a opísali nové termosenzitívne materiály na báze mezoporézneho oxidu kremičitého SBA-15 funkcionalizovaného polyetylénimínmi na riadené uvoľňovanie liečiva diklofenaku sodného (DIC). Syntetizovaná matrica SBA-15 bola pripravená metódou sol-gél a povrchovo modifikovaná chlórpropylovými skupinami pomocou graftingu. Posledný syntetický krok pri príprave nosičov pozostával z kondenzačnej reakcie chlórpropylových skupín a molekúl PEI. Polyméry PEI na povrchu slúžia ako termosenzitívne molekuly, ktoré pri nižších teplotách medzi sebou vytvárajú vodíkové väzby a vďaka svojmu objemu blokujú vstup do pórov. Pri vyšších teplotách dochádza k narušeniu medzimolekulových interakcií, čo spôsobovalo uvoľnenie liečiva. Úspešná syntéza pripravených nosičov bola potvrdená výsledkami získanými použitím rôznych analytických techník, ako je infračervená spektroskopia (IR), malouhlovým rozptylom RTG žiarenia (SAXS), adsorpcia dusíka, transmisná elektrónová a atómová silová mikroskopia (TEM) a fotónová krížová korelačná spektroskopia (PCCS). V pripra-

vených materiáloch bolo zapuzdrené nesteroidné protizápalové liečivo diklofenak sodný. Množstvo inkorporovaného liečiva v pevných matriciach, PEI modifikovaných/nemodifikovaných vzorkách bolo stanovené TG analýzou. Následne boli uskutočnené experimenty s uvoľňovaním liečiva z pripravených materiálov do médií s rôznym pH (simulovaná žalúdočná tekutina, pH = 2 a simulovaná telesná tekutina, pH = 7,4) a teplotami (37 °C a 42 °C). Zo získaných kriviek uvoľňovania možno usúdiť, že v prípade pH sa uvoľnilo vyššie množstvo liečiva pri pH = 7,4 v porovnaní s pH = 2 v dôsledku rozpustnosti liečiva. V prípade teploty bolo pozorované vyššie uvoľnené množstvo DIC pri vyššej teplote a pozorované výsledky potvrdili termosenzitivitu PEI modifikovaných materiálov.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Hu M., Ge X., Chen X., Mao W., Qian X. and Yuan W.E., "Micro/nanorobot: A promising targeted drug delivery system", *Pharmaceutics*, **12**(7), (2020), 665, doi: 10.3390/pharmaceutics12070665.
- [2] Zhao J., Lu C., He X., Zhang X., Zhang W. and Zhang X., "Polyethylenimine-grafted cellulose nanofibril aerogels as versatile vehicles for drug delivery", *ACS Applied Materials & Interfaces*, **7**(4), (2015), 2607–2615, doi: 10.1021/am507601m.
- [3] Sun X., Cai C., Wang Q., Cai D., Qian J., Chi Y., Zheng K., Zhang X., Zhang G., Zhong K. and Wu Z., "A polyethylenimine functionalized porous/hollow nanoworm as a drug delivery system and a bioimaging agent", *Physical Chemistry Chemical Physics*, **18**(11), (2016), 7820–7828, doi: 10.1039/c5cp07933k.
- [4] Zou Y., Li D., Shen M. and Shi X., "Polyethylenimine-based nanogels for biomedical applications", *Macromolecular Bioscience*, **19**(11), (2019), 1900272, doi: 10.1002/mabi.201900272.

## Príprava a charakterizácia magnetických nanočastíc modifikovaných poly-L-lyzínom

I. Antal<sup>1</sup>, M. Kubovčíková<sup>1</sup>, V. Zavišová<sup>1</sup>, A. Juríková<sup>1</sup>, I. Khmara<sup>1</sup>, M. Koneracká<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.u.i., Watsonova 47, 040 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: iryna.antal@saske.sk

---

**ABSTRAKT** Koloidné roztoky magnetických nanočastíc (MNPs) stabilizované oleátom sodným (OL) a následne modifikované biokompatibilným, kladne nabitým poly-L-lyzínom (PLL) boli pripravené a charakterizované z hľadiska morfológie, rozmerovej distribúcie a magnetických vlastností. Polyaminokyselina PLL bola vybratá kvôli tomu, že má dobrú kompatibilitu, jej molekula má kladný náboj v širokom rozsahu pH a teda môže byť elektrostaticky naviazaná na záporne nabitú nanočasticu stabilizovanú oleátom sodným. Vplyv rôznych hmotnostných pomerov PLL/MNPs na hydrodynamický priemer, zeta potenciál a izoelektrický bod (IEP) vzoriek bol študovaný metódou dynamického rozptylu svetla s cieľom nájsť optimálny teoretický pomer PLL/MNPs. Vo vzorkách boli pozorované typické charakteristiky superparamagnetického správania. Okrem toho sme ukázali, že oba systémy OL@MNP a PLL-OL@MNP vykazujú dobrú stabilitu v podmienkach fyziologického pH a môžu byť použité pre ďalšie biomedicínske účely.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; poly-L-lyzín; bioaplikácie

---

## Úvod

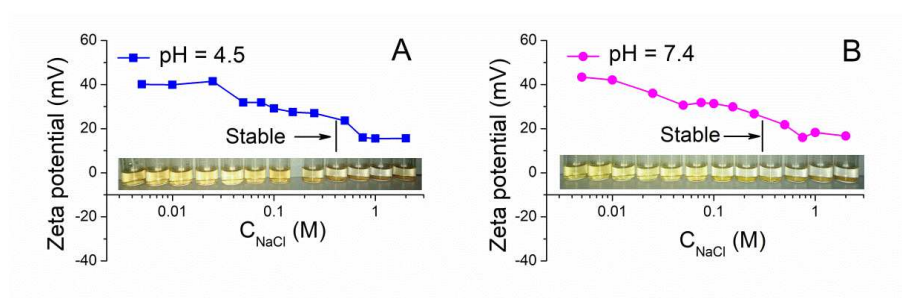
Magnetické nanočastice (MNPs) na báze oxidov železa (magnetitu  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a magnetitu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nachádzajú v medicíne mnohé spôsoby uplatnenia, ale zároveň musia spĺňať určité kritériá [1]. Jednou z dôležitých vlastností pre bioaplikáciu je ich biokompatibilita. Častice majú mať tiež obmedzenú toxicitu a dobrú stabilitu, t. j. nesmú za fyziologických podmienok sedimentovať. V priebehu posledných dvoch desaťročí bolo publikovaných mnoho prác týkajúcich sa obaľovania MNPs rôznymi druhmi zlúčenín so zámerom ich využitia v oblasti medicíny. Medzi vhodné zlúčeniny môžeme zaradiť aj makromolekulu poly-L-lyzín (PLL) [2, 3]. PLL je polymér zložený z lyzínových aminokyselín, ktorý vykazuje vynikajúcu biokompatibilitu a biologickú aktivitu. Cieľom nášho výskumu bolo pripraviť koloidné roztoky MNPs stabilizovaných oleátom sodným (OL) a modifikovať ich povrch polykatiónom PLL. Modifikácia povrchu nanočastíc poly-L-lyzínom umožní naviazať na seba širokú škálu ďalších biologicky aktívnych molekúl (liekov) s cieľom pripraviť potenciálny prenášač liečiv napr. pre cieleň transport liečiv do postihnutej časti organizmu.

## Experimentálne metódy a výsledky

Magnetické nanočastice magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) boli syntetizované metódou koprecipitácie železitých a železnatých solí v bázičkom prostredí [4, 5]. Vzniknutý čierny precipitát magnetitu bol po premytí destilovanou vodou stabilizovaný oleátom sodným, aby sa predišlo zhlukovaniu (aglomerácii) nanočastíc a následne bol dispergovaný vo vodnom prostredí [6]. Časť takto stabilizovaných nanočastíc (OL@MNPs) bola následne modifikovaná adsorpciou poly-L-lyzínu (PLL-OL@MNPs). Oba systémy, OL@MNPs i PLL-OL@MNPs, boli pripravené vo forme stabilného koloidného roztoku. Vlastnosti takto pripravených nanočastíc (PLL-OL@MNPs) boli porovnávané s vlastnosťami OL@MNPs bez dodatočnej modifikácie PLL. Na charakterizáciu nanočastíc boli použité viaceré fyzikálno-chemické metódy (FTIR, UV/VIS spektroskopia, SQUID, TGA, DLS a iné).

Adsorpcia PLL na magnetické nanočastice bola skúmaná v širokom koncentračnom rozsahu poly-L-lyzínu na sérii vzoriek, ktoré sa líšili hmotnostným pomerom PLL/MNPs od 0 do 2.5. Bola meraná veľkosť nanočastíc a ich zeta potenciál pomocou prístroja ZetaSizer Nano ZS. Veľkosť magnetických nanočastíc výrazne narastala počas postupného pridávania polyaminokyseliny k oleátom stabilizovaným nanočasticiam pri pomere PLL/MNPs od 0.05 do 0.5. S ďalším rastúcim pomerom PLL/MNPs (od 0.5 do 2.5) dochádzalo k nasýteniu, t.j. veľkosť obalených nanočastíc sa výrazne nemenila. Vysoké hodnoty zeta potenciálu (okolo 43 mV) v tomto rozsahu naznačujú vysoký povrchový náboj a dobrú koloidnú stabilitu vzoriek. Z týchto meraní bolo tiež zistené, že optimálny hmotnostný pomer pre adsorpciu poly-L-lyzínu PLL/MNPs je 0.5. Hydrodynamický rozmer nanočastíc pri tomto pomere bol okolo 124 nm, zeta potenciál 43 mV.

Taktiež sa uskutočnilo meranie zeta potenciálu ako funkcie pH, aby sa potvrdila prítomnosť polyaminokyseliny na povrchu magnetických nanočastíc. Pre čisté magnetické nanočastice je závislosť zeta potenciálu od pH dobre známa a ukazuje, že izoelektrický bod pre neobalené nanočastice je približne pri  $\text{pH}=7$  [7, 8].



**Obr. 1:** Zeta potenciál PLL<sub>0.5</sub>-OL@MNPs ako funkcia iónovej sily roztoku pri pH 4,5 (A) a 7,4 (B).

Izoelektrický bod pre OL@MNPs je asi 4 [9]. Posun izoelektrického bodu k nižším hodnotám indikuje obalenie nanočastíc oleátom sodným. Izoelektrický bod pre PLL-OL@MNPs je posunutý do vyššieho pH oproti OL@MNPs, čo je dôkazom naviazania PLL na magnetické nanočastice, keďže čisté PLL má IEP okolo 10.5.

Adsorpcia PLL na magnetické nanočastice bola študovaná aj pomocou UV/VIS spektroskopie. Kvantitatívne stanovenie polyaminokyseliny v supernatante (voľný poly-L-lyzín neadsorbovaný na magnetické nanočastice) sa uskutočnilo pri 580 nm s činidlom Trypan Blue [10]. Adsorpčná krivka prechádzala do saturačnej zóny pri pomere PLL/MNPs = 0.5 a ďalšie zvýšenie koncentrácie PLL v roztoku už nevedlo k zvýšeniu PLL adsorpcie na nanočastice. Tento výsledok optimálneho pomeru (PLL/MNPs = 0.5 w/w) je v dobrej zhode s výsledkami získanými z meraní hydrodynamického rozmeru, zeta potenciálu, izoelektrického bodu a z TGA. Pre stanovenie množstva PLL neadsorbovaného na magnetické nanočastice bola použitá aj metóda termogravimetrickej analýzy. Zistilo sa, že adsorpčná účinnosť má tiež saturačnú tendenciu a vzorka s optimálnym hmotnostným pomerom PLL/MNP = 0.5 obsahuje 0.332 mg PLL na 1 mg magnetických nanočastíc. Táto hodnota je v zhode s hodnotou 0.325 mg PLL/1 mg magnetických nanočastíc získanou UV/VIS metódou. Študoval sa vplyv pH a iónovej sily roztoku na hodnoty zeta potenciálu. PLL-OL@MNPs sú stabilné až do 0.4 a 0.3 M NaCl v roztokoch s pH 4.5 a 7.4 (obr. 1). Taktiež bola pozorovaná dobrá koloidná stabilita PLL-OL@MNPs v prostredí s neutrálnym pH aj po 6 mesiacoch po príprave vzoriek. Oba systémy nanočastíc, OL@MNPs aj PLL-OL@MNPs, vykazujú vysokú hodnotu zeta potenciálu, čo je kľúčovou charakteristikou stability roztokov magnetických nanočastíc. Vďaka kladne nabitým aminoskupinám v reťazci poly-L-lyzínu, modifikované PLL-OL@MNPs nanočastice nadobúdajú vo fyziologickom prostredí polykatiónový charakter, a teda majú schopnosť viazať na seba širokú škálu ďalších biologicky aktívnych molekúl.

## Záver

Magnetické nanočastice na báze oxidov železa pripravené koprecipitačnou metódou boli stabilizované oleátom sodným a následne modifikované poly-L-lyzínom. Pomocou fyzikálnochemickej charakterizácie bol stanovený optimálny teoretický PLL/MNPs hmotnostný pomer 0.5. Merania DLS ukázali, že počas procesu adsorpcie PLL na povrch OL@MNPs nedochádza k agregácii nanočastíc. Magnetizačné merania potvrdili superparamagnetické správanie pripravených vzoriek. PLL-OL@MNPs sú stabilné v podmienkach fyziologického pH a sú z hľadiska študovaných vlastností vhodné pre biomedicínske aplikácie.

---

POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.



**Literatúra**

- [1] Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L.V. and Muller R.N., “Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications”, *Chemical Reviews*, **108**(6), (2008), 2064–2110, doi: 10.1021/cr068445e.
- [2] Horák D., Babič M., Jendelová P., Herynek V., Trchová M., Likavčanová K., Kapcalová M., Hájek M. and Syková E., “Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **321**(10), (2009), 1539–1547, doi: 10.1016/j.jmmm.2009.02.082.
- [3] Li Z., Shuai C., Li X., Li X., Xiang J. and Li G., “Mechanism of poly-l-lysine-modified iron oxide nanoparticles uptake into cells”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **101**(10), (2013), 2846–2850, doi: 10.1002/jbm.a.34580.
- [4] Kubovcikova M., Koneracka M., Strbak O., Molcan M., Zavisova V., Antal I., Khmara I., Lucanska D., Tomco L., Barathova M., Zatovicova M., Dobrota D., Pastorekova S. and Kopcansky P., “Poly-l-lysine designed magnetic nanoparticles for combined hyperthermia, magnetic resonance imaging and cancer cell detection”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **475**, (2019), 316–326, doi: 10.1016/j.jmmm.2018.11.027.
- [5] Khmara I., Kubovcikova M., Koneracka M., Kalska-Szostko B., Zavisova V., Antal I., Rajnak M., Dankova Z., Kavecansky V., Omastova M. and Kopcansky P., “Preparation and characterization of magnetic nanoparticles”, *Acta Physica Polonica A*, **133**(3), (2018), 704–706, doi: 10.12693/APhysPolA.133.704.
- [6] Kubovčíková M., Antal I., Kováč J., Závishová V., Koneracká M. and Kopčanský P., “Preparation and complex characterization of magnetic nanoparticles in magnetic fluid”, *Acta Physica Polonica A*, **126**(1), (2014), 268–269, doi: 10.12693/APhysPolA.126.268.
- [7] Antal I., Koneracka M., Kubovcikova M., Zavisova V., Khmara I., Lucanska D., Jelenka L., Vidlickova I., Zatovicova M., Pastorekova S., Bugarova N., Micusik M., Omastova M. and Kopcansky P., “d,l-lysine functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for detection of cancer cells”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **163**, (2018), 236–245, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.022.
- [8] Sun Z.X., Su F.W., Forsling W. and Samskog P.O., “Surface characteristics of magnetite in aqueous suspension”, *Journal of Colloid and Interface Science*, **197**(1), (1998), 151–159, doi: 10.1006/jcis.1997.5239.
- [9] Carlson J.J. and Kawatra S.K., “Factors affecting zeta potential of iron oxides”, *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, **34**(5), (2013), 269–303, doi: 10.1080/08827508.2011.604697.
- [10] Shen W.C., Yang D. and Ryser H.J.P., “Colorimetric determination of microgram quantities of polylysine by trypan blue precipitation”, *Analytical Biochemistry*, **142**(2), (1984), 521–524, doi: 10.1016/0003-2697(84)90500-1.

## Atómová silová mikroskopia – charakterizácia morfológických vlastností Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanočastíc

Z. Bednáriková<sup>1</sup>, A. Antošová<sup>1</sup>, M. Gančár<sup>1</sup>, D. Fedunová<sup>1</sup>, Z. Gažová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.v.i., Watsonova 47, 040 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: bednarikova@saske.sk

---

**ABSTRAKT** Atómová silová mikroskopia (AFM) je ideálnym nástrojom pre 3D vizualizáciu nanočastíc a charakterizáciu mnohých ich fyzikálnych vlastností, vrátane veľkosti, morfológie, povrchovej štruktúry a drsnosti. Analýzou AFM obrázkov je možné určiť aj štatistické informácie týkajúce sa nanočastíc, vrátane distribúcie veľkostí, plochy povrchu a objemu. Táto metodická práca má za cieľ načrtnúť postupy na prípravu vzoriek pre AFM a stanovenie vlastností nanočastíc pomocou tejto metódy.

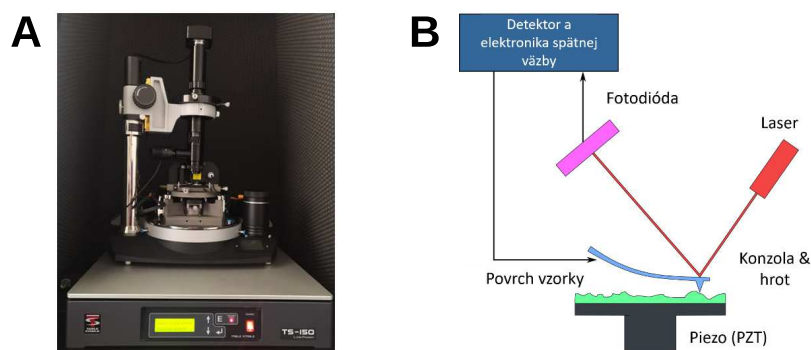
**KLÚČOVÉ SLOVÁ** AFM; mikroskopia; magnetické nanočastice; morfológia

---

### Úvod

Magnetické nanočastice sú dnes už široko využívané v biomedicínskych aplikáciách, kde sa uplatňujú ich unikátne a škálovateľné vlastnosti, akými sú vysoký pomer povrchu k objemu, vysoká mobilita vo voľnom stave a modifikovateľnosť. Použitie magnetických nanočastíc v biomedicíne môžeme rozdeliť na analytické a terapeutické. Jedným z analytických prístupov je aplikácia vhodne povrchovo modifikovaných magnetických nanočastíc na efektívnu separáciu a purifikáciu vzoriek DNA a RNA. Magnetické nanočastice v biomedicíne musia spĺňať prísne požiadavky, preto je produkcia nanomagnetov so správnymi vlastnosťami neustálou výzvou. Z tohto dôvodu je dôležité poznať veľkosť a fyzikálno-chemické povrchové vlastnosti študovaných nanočastíc [1-3].

Atómová silová mikroskopia predstavuje jednu z mikroskopických techník využívajúcich skenovanie sondou a používa sa na charakterizáciu povrchu rôznych materiálov. Bola vyvinutá v roku 1986 Dr. Binnigom, Dr. Quateom a Dr. Gerberom a odvtedy sa vyvinula na veľmi užitočný nástroj na získanie topografických obrázkov s vysokým rozlíšením [4]. V súčasnej dobe AFM umožňuje poskytnúť ďalšie informácie o fyzikálnych vlastnostiach nanočastíc, vrátane ich veľkosti, morfológie, povrchovej štruktúry a drsnosti, ako aj o ich magnetických vlastnostiach. Mikroskop NTegra Prima od firmy NT-MDT (Holandsko) je prístroj, ktorý je vhodný na morfológickú charakterizáciu nanočastíc. NTegra Prima (obrázok 1 A) je multifunkčné zariadenie umožňujúce analýzu morfológických, chemických, fyzikálnych a magnetických vlastností nanočastíc, a ich povrchu pomocou viac ako 40 meracích metód s vysokou presnosťou a rozlíšením. Experimenty je možné vykonávať na vzduchu, ako aj v kvapalinách alebo kontrolovanom prostredí [5].

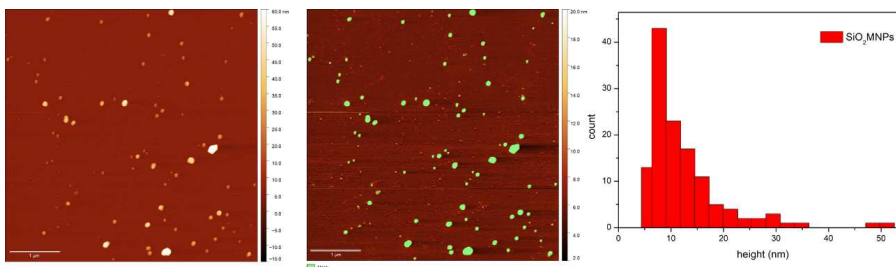


**Obr. 1:** A) NTegra Prima atómový silový mikroskop, B) princíp skenovania AFM (obrázok prevzatý z Wikipedia).

## Experimentálne metódy a výsledky

AFM používa sondu s ostrým hrotom (zvyčajne vyrobenú z kremíka alebo nitridu kremíka), ktorá sa pohybuje po povrchu vzorky v rastrovom skene. Hrot sa nachádza na konci konzoly, ktorá sa ohýba v reakcii na zmenu sily medzi hrotom a vzorkou. Väčšina AFM používa techniku optickej páky na detekciu ohybu konzoly. Laser je zaostrý na zadnú stranu konzoly a odráža sa na štvorkvadrantový fotodetektor. To umožňuje merať topografiu pohybom konzoly nahor a nadol, zatiaľ čo trenie alebo bočné sily možno merať podľa otáčania konzoly (obrázok 1 B). Existuje mnoho rôznych režimov skenovania pomocou AFM. Na charakterizáciu morfológie nanočastíc sa najčastejšie používajú topografické režimy využívajúce silovú interakciu medzi hrotom a vzorkou. Topografické režimy môžu byť vo všeobecnosti rozdelené na kontaktné alebo bezkontaktné. V kontaktnom režime hrot pracuje v odpudivej oblasti veľmi blízko povrchu, keď je konzola odtláčaná od povrchu. V rôznych bezkontaktných režimoch (tapping, semi-kontaktný alebo hybridný režim) sa konzola rozkmitá na svojej rezonančnej frekvencii a priblíži sa k povrchu. Na meranie silových interakcií možno monitorovať amplitúdu alebo posun frekvencie [6].

Správna príprava vzoriek pre AFM je veľmi dôležitá. Zvyčajne sú pripravované vo vode alebo vhodnom tlmivom roztoku s výslednou koncentráciou magnetitu 5-50  $\mu\text{g/ml}$ . Potom sú sonikované 5-10 minút a následne je 20  $\mu\text{l}$  vzorky nanosených na očistený povrch substrátu. Najčastejšie používané substráty sú sl'uda, oxid kremičitý, zlato, striebro, pyrolytický grafit (HOPG), sklo, oxid zinočnatý, sulfid zinočnatý alebo oxid vápenatý. Pred nanosením vzorky nanočastíc je potrebné vziať do úvahy vlastnosti povrchu substrátu. Sl'uda je negatívne nabitá a hydrofilná, preto má byť povrchový náboj nanočastíc v danom rozpúšťadle pozitívny, aby sa zachovala dobrá adsorpcia častíc na povrch sl'udy. Vzorky sa inkubujú zvyčajne 5-20 minút v závislosti od požadovanej hustoty častíc, a ich povrchových vlastností.



**Obr. 2:** AFM obrázok analyzovaný pomocou softvéru Gwyddion (A) AFM obrázok  $\text{SiO}_2$  MNPs, (B) AFM obrázok s grainovou analýzou, (C) histogram výšok  $\text{SiO}_2$  MNPs.

Zvyšný roztok sa odmyje ultra čistou vodou a prefúkne prúdom dusíka. Tento postup možno aplikovať pre prípravu vzoriek rôznych typov nanočastíc. AFM ponúka mnoho výhod, no má aj svoje nevýhody. Ako už bolo spomenuté, AFM ponúka vizualizáciu v troch rozmeroch, a to X-Y-Z. Avšak, pri skenovaní povrchu vzorky treba mať na pamäti, že rozlíšenie prístroja je ovplyvnené vibračným prostredím prístroja, ktoré obmedzuje rozlíšenie vo vertikálnej Z osi. Okrem toho je rozlíšenie v horizontálnych osiach X-Y obmedzené priemerom hrotu použitého na skenovanie. Typicky majú prístroje AFM vertikálne rozlíšenie menšie ako 0,1 nm a X-Y rozlíšenie približne 0,5-1 nm. Rozlíšenie a vysoká presnosť merania závisia najmä od selekcie vhodnej konzoly s hrotom (materiálu z čoho je pripravený a veľkosti) a skenovacieho prostredia. Získané obrázky z AFM môžu slúžiť na priamu vizualizáciu vzoriek, ktoré dovoľujú určiť tvar a veľkosť, alebo ich môžeme spracovať pomocou rôznych softvérov, ktoré poskytujú informácie o jednotlivých nanočasticiach alebo ich komplexoch. Pomocou týchto programov je možné získať informácie o veľkosti (dĺžka, šírka a výška) a ďalšie fyzikálne vlastnosti (morfológia a textúra povrchu). Jedným z najvhodnejších softvérov na analýzu AFM obrázkov je Gwyddion [7]. Pomocou nástroja na analýzu zŕn môžeme získať štatistické distribúcie vlastností vzorky, vrátane počtu častíc, distribúcie veľkosti častíc, distribúcie plochy povrchu a distribúcie objemu. Spracovanie AFM obrázku je znázornené na obrázku 2. V prípade, že sa údaje z jednočasticových techník spracúvajú s cieľom poskytnúť štatistické informácie, existuje obava týkajúca sa štatistickej významnosti. Na získanie informácií o väčšej populácii je preto potrebné kombinovať údaje z viacerých skenov, v mnohých prípadoch dokonca až vzoriek.

## Záver

Často sa hovorí, že: „... obrázok vydá za tisíc slov ...“, čo obzvlášť platí pre obrázky získané pomocou AFM. AFM je vhodná metóda na vizualizáciu nano- aj mikročastíc. Jednotlivé častice, zhluky a vrstvy spolu s ich povrchovou štruktúrou môžu byť zobrazené priamo a bez poškodenia vzorky. Analýzou obrázkov je možné získať in-

formácie o veľkosti, tvare a distribúcii častíc. Tieto informácie môžu pomôcť pri ďalšej optimalizácii a modulácii postupov pri ich produkcii.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Shinkai M., "Functional magnetic particles for medical application", *Journal of Bio-science and Bioengineering*, **94**(6), (2002), 606–613, doi: 10.1016/S1389-1723(02)80202-X.
- [2] Olsvik O., Popovic T., Skjerve E., Cudjoe K.S., Hornes E., Ugelstad J. and Uhlén M., "Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology", *Clinical Microbiology Reviews*, **7**(1), (1994), 43–54, doi: 10.1128/cmr.7.1.43.
- [3] Tartaj P., Morales M., Gonzalez-Carreño T., Veintemillas-Verdaguer S., Bomati-Miguel O., Roca A., Costo R. and Serna C., "Biomedical applications of magnetic nanoparticles", doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.02251-7.
- [4] Hersam M.C. and Chung Y.W., "Detecting elusive surface atoms with atomic force microscopy", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(22), (2003), 12 531–12 532, doi: 10.1073/pnas.2335865100.
- [5] <https://ntmdt.nl/home/products/ntegra-prima/>
- [6] Fotiadis D., "Imaging and manipulation of biological structures with the AFM", *Micron*, **33**(4), (2002), 385–397, doi: 10.1016/S0968-4328(01)00026-9.
- [7] Nečas D. and Klapetek P., "Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis", *Open Physics*, **10**(1), doi: 10.2478/s11534-011-0096-2.

## Štúdium textúrnych vlastností nanočastíc $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ obalených pórovitou vrstvou oxidu kremičitého

N. Király<sup>1</sup>, E. Beňová<sup>1</sup>, M. Almáši<sup>1</sup>, D. Princík<sup>1</sup>, A. Zeleňáková<sup>2</sup>, V. Zeleňák<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>2</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

\* email korešpondujúceho autora: nikolas.kiraly@upjs.sk

**ABSTRAKT** Pripravili a charakterizovali sme vzorky magnetických nanočastíc typu jadro-obal pozostávajúce z jadra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obaleného nepórovitou vrstvou  $\text{SiO}_2$  a následne pórovitou vrstvou  $\text{SiO}_2$  za vzniku polyvrstvových nanočastíc  $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$ . Prídavkom je príprava hydrofóbných nanočastíc magnetitu obalených kyselinou olejovou  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ , z ktorých boli pripravené core-shell materiály s vrstvou pórovitej formy oxidu kremičitého  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA@m\text{SiO}_2$ . Cieľom predkladanej štúdie je textúrna charakterizácia týchto vzoriek, ktoré v budúcnosti budú študované ako nociče antivirových liekov.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; jadro-obal; adsorpčné merania; biomedicínske aplikácie

### Úvod

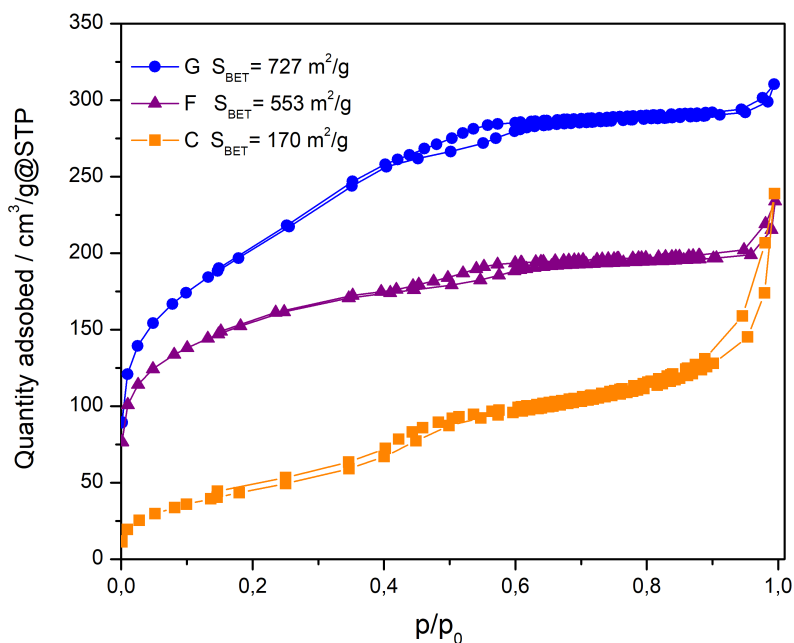
Globálny vplyv vírusových infekcií, vývoj rezistencie na súčasné lieky a objavenie sa nových vírusov, to všetko sa premieta do neustálej vedeckej výzvy objavovania liekov a vývoja nosičov liečiv. Okrem toho, sa mnohí výskumníci obracajú na nanotechnológie ako metódu liečby nielen pandémie COVID-19, ale aj v rámci prípravy na pandémiu budúcnosti [1]. Nanočastice sú veľmi dobre známe pre svoje použitie v systémoch na dodávanie liečiv, pretože môžu zlepšiť fyzikálno-chemické vlastnosti molekúl liečiv úpravou ich farmakokinetického profilu, rozpustnosti a biodistribúcie a tým maximalizovať terapeutickú účinnosť a minimalizovať vedľajšie účinky liečiv [2]. Nanočastice na báze uhlíka, anorganických kovov, lipidov a polymérov sa už úspešne použili na dodávanie antivírusových liekov v minulosti [3]. Ich veľkosť a povrchové vlastnosti z nich robia vhodných a preferovaných kandidátov na naplnenie rôznymi antivírusovými látkami [4]. Nový koronavírus 2 so závažným akútnym respiračným syndrómom (SARS-CoV-2) je podobný veľkosti týchto nanočastíc, ktoré majú veľkosť 60-140 nm. Naplnenie týchto nanočastíc antivírusovými liekmi môže teda poskytnúť účinné terapeutické výsledky [5]. V tejto práci sme syntetizovali magnetické mezoporézne nanočastice oxidu kremičitého zložené z magnetického jadra a nepórovitého/porézneho obalu oxidu kremičitého pomocou rôznych syntetických ciest. Tieto nanočastice boli nadsorbované antivírusovými liečivami (Ivermektín, Lopinavir). Nanočastice boli charakterizované meraniami adsorpcie/desorpcie didusíka, termickou analýzou, transmisnou elektrónovou mikroskopiou a infračervenou spektroskopiou.

## Experimentálne metódy a výsledky

Magnetitové nanočastice obalené oxidom kremičitým ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) boli syntetizované podľa protokolu BOMB [6]. 2,5 g magnetitových nanočastíc potiahnutých oxidom kremičitým sa dispergovalo v zmiešanom roztoku 7,5 g BrijS10, 2l deionizovanej vody, 25 g vodného roztoku amoniaku (28 hm.%) a 1,2l etanolu. Roztok sa homogenizoval 30 minút, aby sa vytvorila homogénna disperzia. K disperzii sa za stáleho miešania po kvapkách pridalo 10 g TEOS a reakcia pokračovala cez noc. Produkt sa extrahoval silným neodýmovým magnetom, boli opakované premytia etanolom  $5 \times 50$  ml a vodou, aby sa odstránili nemagnetické vedľajšie produkty. Nakoniec sa prekursor vytvárajúci póry (BrijS10) odstránil etanolovým roztokom dusičnanu amónneho ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 6 g/l, 60 ml: 3,6 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  v 600 ml etanolu) za podmienok refluxu pri bode varu tejto zmesi, počas 2 hodín. Po magnetickej separácii a premytí etanolom sa produkt sušil v sušiarňi pri  $110^\circ\text{C}$  počas 24 hodín za vzniku vzorky F. Príprava vzorky G prebiehala rovnakým spôsobom s tým rozdielom, že odstránenie surfaktantu BrijS10 prebiehalo extrakciou v muflovej peci pri  $550^\circ\text{C}$ .

Príprava vzoriek typu C: 4,8 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a 0,85 ml kyseliny olejovej sa pridali do 30 ml deionizovanej vody pod atmosférou dusíka za intenzívneho miešania. Roztok zmesi sa zahrial na  $90^\circ\text{C}$ . Potom sa k roztoku rýchlo pridalo 20 ml hydroxidu amónneho (14 hm.%, 11,2 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  + 8,8 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) za pozorovania prudkej zmeny sfarbenia na čiernu. Reakcia sa udržiavala pri teplote  $90^\circ\text{C}$  počas 2,5 hodín, nechala voľne ochladiť na laboratórnu teplotu. Čierna zrazenina sa oddelila magneticou dekantáciou a niekoľkokrát sa premyla metanolom (výťažok  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ : ~ 2,25 g). 2,25 g nanočastíc  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$  sa dispergovalo v 2l deionizovanej vody pod ultrazvukom v kúpeli počas 30 minút. Následne sa k disperzii pridali 4 g CTAB za intenzívneho miešania počas 1 hodiny. Následne sa 2,34 ml TEOS rozpustilo v 600 ml etanolu a pridalo do reakčného média po kvapkách v 5-hodinovom intervale - reakcia pokračovala cez noc. Výsledná suspenzia bola magneticou oddelená a premytá trikrát 20 % etanolom, aby sa oddelili nezreagované zvyšky tetraethylortosilikátu. Surfaktant CTAB bol odstránený etanolovým roztokom dusičnanu amónneho ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 6 g/l, 60 ml) za varu pod spätným chladičom pri teplote  $60^\circ\text{C}$  počas 2 hodín. Po magnetickej separácii a premytí sa produkt sušil v sušiarňi pri  $110^\circ\text{C}$  počas 24 hodín.

Adsorpčné/desorpčné merania didusíka pripravených vzoriek s cieľom určiť ich základné textúrne vlastnosti boli realizované meraním adsorpčných a desorpčných izoteriem didusíka pri  $-196^\circ\text{C}$ . Pre výpočet veľkosti špecifického povrchu z nameraných izoteriem bola použitá BET metóda, objem a veľkosť pórov bol určený prostredníctvom DFT metódy využitím NLDFT kernelu. Pred samotnými adsorpčnými meraniami boli vzorky aktivované pod vákuom pri rôznych teplotách a časových intervaloch s cieľom nájsť optimálne podmienky pre dosiahnutie čo najlepších textúrnych vlastností. Adsorpčné izotermy didusíka boli merané na prístrojoch Quantachrome QUADRASORB SI (N2). Analýza a vyhodnocovanie sorpčných



**Obr. 1:** Adsorpčné izotermy core-shell materiálov typu C, F a G.

izoteriem a vlastností bola vykonávaná softvéromi QuadraWin a ASiQwin firmy Quantachrome Instruments. Ako môžeme vidieť z obrázku 1 u všetkých troch typoch vzoriek bola potvrdená pórovitosť, pričom u všetkých vzoriek sa tvar ich izotermy charakterizuje ako deformovaná ioterma typu IV (IUPAC), s veľmi jemnou hystereziou v procese desorpcie u vzoriek F a G. Vzorka C dosahuje veľkosti špecifického povrchu  $S_{BET}$   $170 \text{ m}^2/\text{g}$  a priemerom pórov  $2,36 \text{ nm}$ . U izotermy vzorky F a G pozoruje v strednej oblasti relatívnych tlakov H4 hysterezie, ktorá je typická pre úzke štrbinové póry. Veľkosť špecifického povrchu pre vzorku F bola pozorovaná  $S_{BET}$   $553 \text{ m}^2/\text{g}$  a  $S_{BET}$   $772 \text{ m}^2/\text{g}$ , priemer pórov bol pre vzorky F  $6,63 \text{ nm}$  a pre vzorku G  $1,76 \text{ nm}$ . Z výsledkov adsorpcí môžeme usúdiť, že všetky tri typy vzoriek budú v budúcnosti vhodnými kandidátmi v oblasti nosičov antivirových aplikáciách.

## Záver

V tejto práci sme skúmali syntézu troch typov nanomateriálov typu core-shell, a to:  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA@m\text{SiO}_2$  (C),  $\text{Fe}_3\text{O}_4@n\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  (extrahovaná) (F) a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@n\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  (kalcinovaná) (G). U všetkých troch vzoriek boli študované ich textúrne a adsorpčné vlastnosti pomocou merní adsorpcie dusíka pri teplote  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pri-



čom vzorky môžeme zoradiť do nasledujúceho radu na základe veľkostí špecifického povrchu  $C < F < G$ . Ďalej z výsledkov adsorpčných meraní môžeme určiť, že všetky 3 typy vzoriek budú vhodné na štúdium v procesov adsorpcie a desorpcie antivirových v biomedicínskych aplikáciách.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Maus A., Strait L. and Zhu D., "Nanoparticles as delivery vehicles for antiviral therapeutic drugs", *Engineered Regeneration*, **2**, (2021), 31–46, doi: 10.1016/j.engreg.2021.03.001.
- [2] Lembo D. and Cavalli R., "Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs", *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, **21**(2), (2010), 53–70, doi: 10.3851/IMP1684.
- [3] Chakravarty M. and Vora A., "Nanotechnology-based antiviral therapeutics", *Drug Delivery and Translational Research*, **11**(3), (2020), 748–787, doi: 10.1007/s13346-020-00818-0.
- [4] Maduray K. and Parboosing R., "Metal nanoparticles: a promising treatment for viral and arboviral infections", *Biological Trace Element Research*, **199**(8), (2020), 3159–3176, doi: 10.1007/s12011-020-02414-2.
- [5] Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F and Tan W., "A novel coronavirus from patients with pneumonia in china, 2019", *New England Journal of Medicine*, **382**(8), (2020), 727–733, doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [6] Oberacker P., Stepper P., Bond D.M., Höhn S., Focken J., Meyer V., Schelle L., Sugrue V.J., Jeunen G.J., Moser T., Hore S.R., von Meyenn F., Hipp K., Hore T.A. and Jurkowski T.P., "Bio-on-magnetic-beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation", *PLOS Biology*, **17**(1), (2019), e3000107, doi: 10.1371/journal.pbio.3000107.

## Štúdium metalo–organických sietí obsahujúcich fluorované ligandy

D. Princík<sup>1</sup>, V. Zeleňák<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

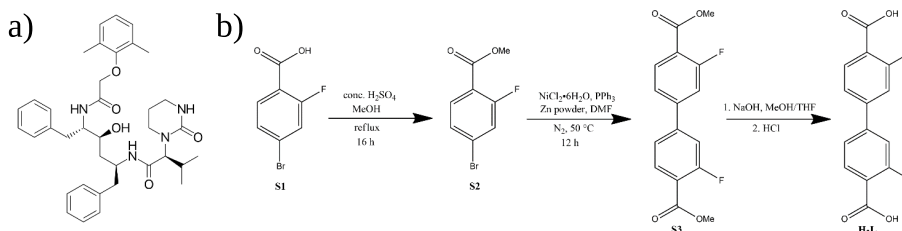
\* email korešpondujúceho autora: david.princik@student.upjs.sk

**ABSTRAKT** Uvedená práca sa venuje syntetickej modifikácii MOF komplexov pomocou hydrofóbných ligandov, u ktorých hydrofóbný účinok zabezpečuje aromatický skelet ligandu a atómy fluóru na ňom viazané. Takéto usporiadanie môže potenciálne viesť k navýšeniu sorpčných kapacít hydrofóbných liečiv, obzvlášť halogénovaných. Bol pripravený rad MOF komplexov s fluórovaným ligandom kyseliny 3,3'-difluorobifenyl-4,4'-dikarboxylovej s ktorou boli pripravené MOF komplexy za použitia Dy<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, Ho<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup> a Eu<sup>3+</sup> solí a všetky pripravené zlúčeniny boli podrobené IR, TG, UV-VIS, PXRD a SC-XRD meraniam potvrdzujúcim ich zloženie a špecifické vlastnosti.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** Metal-organic framework; MOFs; fluorované ligandy; biomedicínske aplikácie

### Úvod

Posledné dve dekády prinášajú obrovský rozmach materiálov známych pod všeobecným označením MOF (metal-organic frameworks), ktoré možno opísať aj ako polymérne pórovité kryštalické koordinačné zlúčeniny. Ich štruktúru tvoria uzly mriežky reprezentované kationom kovu, raritne atómami kovu, ale v drvivej väčšine klastami kovov vystupujúcich v úlohe sekundárnych stavebných jednotiek so skratkou SBU (secondary building units). Tieto uzly sú vzájomne premostené donorovými atómami ligandov, vytvárajúc takto polymérnu koordinačnú zlúčeninu. Metóda prípravy MOF materiálov pozostáva z prípravy reakčnej zmesi obsahujúcej rozpúšťadlo, ligand a soľ kovu s vhodným oxidačným číslom, poprípade je možné použiť aj vopred pripravený klaster. Pomocou rôznych techník, ako sú difúzia, voľná kryštalizácia alebo solvotermálna metóda nastáva zlúčenie jednotlivých zložiek za tvorby požadovaného pórovitého produktu. Postupný nárast kryštálov vhodných pre monokryštalovú štruktúrnu analýzu je možné podporiť prídavkom kyseliny alebo zásady ale aj pomalým kontrolovaným chladením reakčného systému. Tieto materiály sú charakteristické svojou veľkosťou špecifického povrchu a vnútorného objemu pórov, pričom v ich štruktúrach nachádzame rôzne topológie pórov a veľkosti priestupných okien, dôsledkom čoho nachádzajú široké možnosti uplatnenia v rôznych oblastiach, ako je sorpcia a separácia plynov alebo kvapalín [1], heterogénna katalýza [2], ale aj v biologických a medicínskych aplikáciách ako systémy na uskladnenie, distribúciu a uvoľňovanie liečiv v organizme [3]. Predkladaná práca sa venuje príprave úplne nových fluorovaných MOF materiálov za použitia fluorovaného ligandu kyseliny 3,3'-difluorobifenyl-4,4'-dikarboxylovej použitej k príprave



**Obr. 1:** a) Štruktúra molekuly antivirotika Lopinavir. b) Syntézná schéma prípravy ligandu  $H_2L$ .

komplexov 1-5. Prítomnosť atómov flóru v štruktúre MOF prepožičiava unikátne vlastnosti, ktoré u iných MOF materiáloch absentujú, ako sú zvýšenie hydrolytickej odolnosti, zvýšenie povrchovej a celkovej hydrofóbnosti materiálu MOF, ktoré môžu lepšie uzatvárať hydrofóbné/malo rozpustné liečivá, ako napr. antivirotikum lopinavir (Obr.1a)) [4]. Navyše špecifická interakcia atómov fluóru s molekulami liečiv môže navyšovať sorpčné kapacity adsorbovaných medikamentov, ako napríklad protirakovinového liečiva 5-FU (5-fluorouracilu) [5].

### Experimentálne metódy a výsledky

Syntéza kyseliny 3,3'-difluorobifenyl-4,4'-dikarboxylovej ( $H_2L$ ) použitej k príprave komplexov 1-5 bola uskutočnená prostredníctvom trojkrokovej organickej syntézy znázornenej na obrázku 1 b). Prvý krok syntézy predstavuje chránenie karboxylovej kyseliny pomocou esterifikácie východiskovej látky kyseliny 4-bromo-2-fluorobenzoovej nasledované priamou kondenzačnou reakciou aromatických kruhov za tvorby bifenyly, ukončené deesterifikáciou produktu.

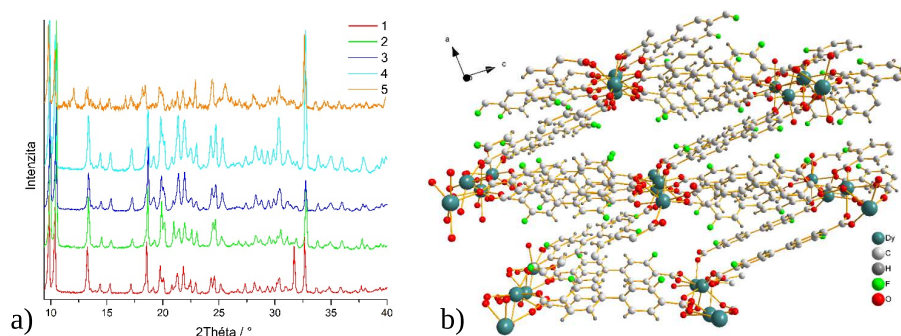
MOF materiál (1) bol pripravený rozpustením hexahexahydrátu chloridu dysprózitého (81,4 mg; 0,216 mmol) a  $H_2L$  (30 mg; 0,108 mmol) v zmesi rozpúšťadiel pozostávajúcej z 2 ml DMF a 8 ml  $CH_3CN$ . Vytvorený žltý roztok bol následne preliaty do nerezového, teflónom potiahnutého autoklávu Parr® a umiestnený do pece s termoregulátorom. Autokláv bol zahriaty na 170 °C s rýchlosťou ohrevu 0,5 °C/min a udržiaval sa pri tejto teplote po dobu 108 hodín. Po tomto čase bol autokláv ochladený na laboratórnu teplotu rýchlosťou chladenia 0,1 °C/min. Získané oranžové ihličky boli odfiltrované a čistené vložím do 5 ml Eppendorfovej skúmavky a päťnásobným premytím 3 ml rovnakej zmesi rozpúšťadiel, aká bola použitá pri syntéze, premiešané vortexom počas 30 sekúnd a dekantované. Po odfiltrovaní a vysušení bol výtážok produktu 51,3 mg (11,2 % na základe  $H_2L$ ). Chemický vzorec bez solvátov bol stanovený ako  $C_{24}H_{16}NO_7F_3Dy$ ,  $M_r = 649,91$  g/mol; FT-IR (KBr peleta,  $cm^{-1}$ ):  $\nu(OH)$  3423 (m, br);  $\nu(CH)_{ar}$  3077 (w), 3044 (w);  $\nu(CH)_{aliph}$  2929 (s), 2854 (m);  $\nu(C=O)$  1651 (m);  $\nu(C=C)_{ar}$  1544 (m);  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$  1621 (s), 1592 (s);  $\nu_s(\text{COO}^-)$  1404 (s);  $\delta(CCH)_{aliph}$  1383 (s);  $\nu(C-N)$  1252 (w);  $\delta(CCH)_{ar}$  1217 (m),

**Tabuľka 1:** Parametre zlúčenín 1-5.

#	Vzorec so solvátmi	Výt'ážnosť [%]	f-f prechod [nm]
1	$\{[\text{Dy}_2(\text{L})_3(\text{DMF})_2] \cdot 0,7 \text{ DMF} \cdot 3,5 \text{ H}_2\text{O}\}_n$	11,2	490 ( $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^6\text{H}_{15/2}$ )
2	$\{[\text{Tb}_2(\text{L})_3(\text{DMF})_2] \cdot 0,2 \text{ DMF} \cdot 1,25 \text{ H}_2\text{O}\}_n$	11,1	376 ( $^7\text{F}_6 \rightarrow ^5\text{D}_3$ )
3	$\{[\text{Ho}_2(\text{L})_3(\text{DMF})_2] \cdot 0,9 \text{ DMF} \cdot 2,8 \text{ H}_2\text{O}\}_n$	9,5	380 ( $^5\text{I}_8 \rightarrow ^5\text{G}_5$ )
4	$\{[\text{Er}_2(\text{L})_3(\text{DMF})_2] \cdot 0,3 \text{ DMF} \cdot 1,7 \text{ H}_2\text{O}\}_n$	9,8	378 ( $^4\text{I}_{15/2} \rightarrow ^2\text{G}_{9/2}$ )
5	$\{[\text{Eu}_2(\text{L})_3(\text{DMF})_2] \cdot 0,3 \text{ DMF} \cdot 0,9 \text{ H}_2\text{O}\}_n$	9,6	382 ( $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{L}_6$ )

1166 (w), 1115 (m);  $\nu(\text{CF})$  864 (m). Podobným postupom, za použitia chloridových solí hexahydrátu terbitého (2), holmitého (3) a erbitého (4), v rovnakom mólovom pomere ako soľ chloridu dysprózitého, boli úspešne pripravené rôzne izoštruktúrne MOF, potvrdené výsledkami PXRD meraní (Obr.2 a)). Použitím hexahexahydrátu chloridu europitého bola pripravená podobná, nie však izoštruktúrna zlúčenina 5, ako potvrdzuje PXRD záznam. Prostredníctvom termickej gravimetrickej analýzy bolo zistené množstvo solvátov v jednotlivých MOF zlúčeninách a z výsledkov UV-VIS spektrofotometrie boli určené hodnoty f-f prechodov jednotlivých MOF komplexov (Tab. 1).

Monokryštalová röntgenová difrakčná analýza komplexu 1 poukázala na monoklinický kryštalografický systém v zlúčenine 1 s priestorovou grupou  $P2_1/n$ . Hodnoty mriežkových parametrov sú  $a = 9,1927(8) \text{ \AA}$ ,  $b = 9,5137(8) \text{ \AA}$ ,  $c = 26,717(2) \text{ \AA}$  a  $\beta = 95,296(3)^\circ$ , so štyrmi vzorcovými jednotkami v základnej bunke. Každý centrálny atóm Dy(III) je heptakoordinovaný šiestimi atómami kyslíka zo šiestich rôznych (L)2- ligandov a posledný atóm kyslíka patrí terminálne viazanej molekule DMF. Tvar koordinačného polyédra možno opísať ako deformovanú trigonálnu prizmu s jednou pyramídálnou stenou. Dva susedné Dy(III) ióny sú premostené tromi syn-



**Obr. 2:** a) PXRD difrakčné záznamy zlúčenín 1-5. b) Štruktúrny model 1D kanálu v komplexe 1 (molekuly DMF boli vynechané kvôli prehľadnosti).

syn bidentátnymi karboxyláto skupinami, z troch rôznych  $(L)^{2-}$  ligandov tvoriacich tak 1D cik-cak reťazec pozdĺž kryštalografickej osi *b*. Molekuly DMF striedavo vyčnievajú do dutiny nad a pod cik-cak reťazcom. Dva Dy(III) ióny z 1D reťazca sú premostené  $(L)^{2-}$  ligandom s dvomi ďalšími Dy(III) iónmi z iného 1D reťazca, čím sa tento motív šíri vytvorením 2D vrstiev. Takéto 2D vrstvy sú navzájom prepojené  $(L)^{2-}$  ligandmi tvoriacimi finálnu 3D supramolekulárnu štruktúru. V štruktúre sa pozdĺž kryštalografickej osi *b* šírila 1D kanály s rozmermi  $6,2 \times 5,9 \text{ \AA}^2$ , obsadené molekulami vody, DMF a vyčnievajúcimi atómami fluóru pochádzajúcimi z ligandov  $(L)^{2-}$  (obr.2 b).

## Záver

V tejto práci sme sa venovali príprave MOF materiálov pomocou syntetickej metódy, ktorá zahŕňa úplne novú syntézu MOF komplexov za použitia nových, hydrofóbných fluorovaných ligandov. Ich hydrofóbný účinok zabezpečuje aromatický skelet ligandu a atómy fluóru na ňom viazané. Bola pripravená séria MOF komplexov s fluorovaným derivátom kyseliny 3,3'-difluorobifenyl-4,4'-dikarboxylovej, s ktorou bolo solvotermálnou metódou pri teplote  $170 \text{ }^\circ\text{C}$  pripravených päť nových MOF komplexov za použitia prvkov z f-bloku. Pripravené komplexy boli charakterizované pomocou infračervenej spektroskopie (FT-IR), termogravimetrickej analýzy (TGA), UV-VIS spektrofotometrie, práškovej a monokryštálovej röntgenovej difrakčnej analýzy (PXRD, SC-XRD). Výsledné údaje potvrdzujú zloženie komplexov, množstvo molekúl rozpúšťadiel v ich dutinách a termická gravimetrická analýza určuje teplotnú stabilitu komplexov v intervale  $300 \text{ až } 350 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pripravené komplexy budú následne použité na štúdium uzatvárania hydrofóbných liečiv.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Qiu Q.F., Chen C.X., Zeng Z., Wei Z.W., Zhu N.X., Cao C.C., Wang W., Wang D., Wang H.P. and Jiang J.J., "A flexible-robust copper(II) metal-organic framework constructed from a fluorinated ligand for CO<sub>2</sub>/r<sub>22</sub> capture", *Inorganic Chemistry*, **59**(20), (2020), 14 856–14 860, doi: 10.1021/acs.inorgchem.0c02123.
- [2] Li S., Zhang Y., Hu Y., Wang B., Sun S., Yang X. and He H., "Predicting metal-organic frameworks as catalysts to fix carbon dioxide to cyclic carbonate by machine learning", *Journal of Materiomics*, **7**(5), (2021), 1029–1038, doi: 10.1016/j.jmat.2021.02.005.

- [3] Lázaro I.A., Wells C.J.R. and Forgan R.S., “Multivariate modulation of the zr MOF UiO-66 for defect-controlled combination anticancer drug delivery”, *Angewandte Chemie*, **132**(13), (2020), 5249–5255, doi: 10.1002/ange.201915848.
- [4] Ma D.Y., Li Z., Xiao J.X., Deng R., Lin P.F., Chen R.Q., Liang Y.Q., Guo H.F., Liu B. and Liu J.Q., “Hydrostable and nitril/methyl-functionalized metal–organic framework for drug delivery and highly selective CO<sub>2</sub> adsorption”, *Inorganic Chemistry*, **54**(14), (2015), 6719–6726, doi: 10.1021/acs.inorgchem.5b00335.
- [5] Erucar I. and Keskin S., “Computational investigation of metal organic frameworks for storage and delivery of anticancer drugs”, *Journal of Materials Chemistry B*, **5**(35), (2017), 7342–7351, doi: 10.1039/C7TB01764B.

## Adsorpcia a riadené uvoľňovanie liečiva zo systému Naproxén-SBA-15: vplyv povrchovej polarity, formy liečiva (kyseliny/sodnej soli) a pH prostredia

E. Zauška<sup>1</sup>, E. Beňová<sup>1</sup>, V. Zeleňák<sup>1</sup>, V. Hornebecq<sup>2</sup>, M. Almáši<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>2</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, MADIREL, UMR 7246, 13397 Marseille, France

\* email korešpondujúceho autora: lubo.s.zauska@student.upjs.sk

**ABSTRAKT** Mezopórovitá silika SBA-15 bola pripravená pomocou sol-gel syntézy a modifikovaná rôznymi typmi organosilánov obsahujúcimi rôzne organické funkčné skupiny: (3-aminopropyl)triethoxysilán (SBA-15-NH<sub>2</sub>), (3-merkaptopropyl)triethoxysilán (SBA-15-SH), triethoxymetylsilán (SBA-15-CH<sub>3</sub>), triethoxyfenylsilán (SBA-15-Ph) a (3-izokyanopropyl)triethoxysilán (SBA-15-NCO). Pripravené materiály boli študované ako nosiče liečiv. Ako modelové liečivo sa použil naproxén, konkrétne jeho kyselina (HNAP) a sodná soľ (NaNAP). Uskladnené liečivá HNAP/NaNAP a vlastnosti uvoľňovania liečiv a kinetické modely boli vykonané pri  $T = 37^\circ\text{C}$  (teplota normálneho ľudského tela) v rôznych médiách s pH = 2 ako simulovaná ľudská žalúdočná tekutina a pH = 7,4, ktorá simulovala fyziologické prostredie. Stanovenie množstva uvoľneného naproxénu bolo vykonané pomocou UV-VIS spektroskopie. Na analýzu získaných údajov o uvoľňovaní liečiva boli použité rôzne kinetické modely ako model nultého rádu, model prvého rádu, Higuchiho model a Hixson-Crowellov model. Na základe získaných experimentálnych výsledkov boli určené rýchlosti a mechanizmy uvoľňovania kyseliny naproxénovej a jej sodnej soli.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** SBA-15; naproxén; cieleňý transport liečiv; povrchová modifikácia; polárne a nepolárne funkčné skupiny; pH

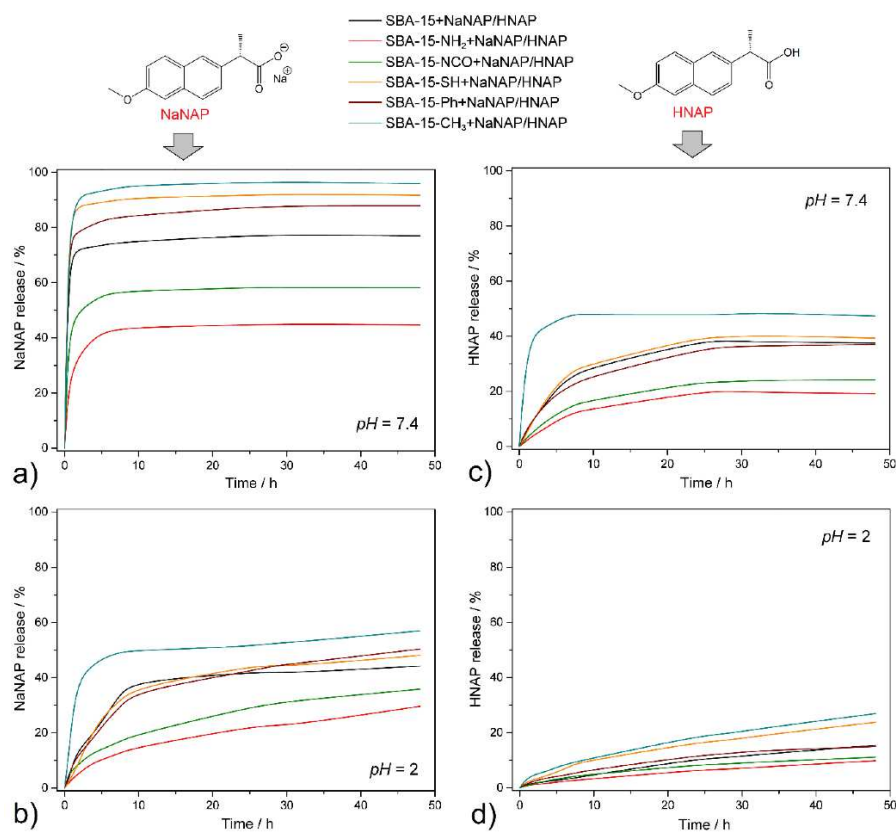
## Úvod

Infekčné choroby sprevádzajú ľudský organizmus počas celého fylogenetického a ontogenetického vývoja jedinca. V histórii ľudstva sa vyskytli ochorenia s vysokou úmrtnosťou, ako napríklad mor, španielska chrípka a pravé kiahne a nedávna pandémie spôsobená koronavírusom SARS-CoV-2 [1]. Výskyt infekčných chorôb pri naša obrovské zdravotné, sociálne a ekonomické problémy [2]. Infekčné choroby spôsobené vírusmi a sekundárnou bakteriálnou infekciou, zvyčajne vedú k zápalu v ľudskom tele, konkrétne v mäkkých tkanivách, kostných tkanív, krvi a podobne. Zápal je prirodzenou imunitnou reakciou na infekciu, ale existuje vysoké riziko, kde zápal môže spustiť srdcovo-cievne ochorenia [3] a ischemickú mozgovú príhodu [4], čo bolo možné pozorovať pri infekcii COVID-19. Existujú možnosti liečby zápalu pomocou nesteroidných protizápalových liečiv (NSAID), ktoré sú uskladnené do systémov pre transport liečiv (DDS), ako sú metalo-organické siete [5] a mezopórovitá silika [6]. Výhoda týchto nosičov spočíva v ich post-syntetickej modifikácii

povrchu, chemická stabilita v fyziologickom prostredí a biokompatibilita. Mezopórovitá silika patrí medzi anorganické materiály, ktorá je študovaná ako DDS pre jej univerzálnosť a jednoduchú modifikáciu povrchu. Tieto vlastnosti robia siliku vynikajúcim kandidátom ako DDS pre protinádorovú terapiu, hojenie rán, transport vitamínov a liečbu zápalov.

## Experimentálne metódy a výsledky

Realizované *in vitro* experimenty uvoľňovania naproxénu (vo forme kyseliny a sodnej soli) prebiehali za rôznych podmienok pH. Vo všetkých experimentoch boli použité fyziologické roztoky s rôznymi hodnotami pH: pH = 2 bolo zvolené ako simulované prostredie žalúdočnej tekutiny. pH = 7,4 bolo použité ako simulované



**Obr. 1:** Kinetické krivky uvoľňovania liečiva pri teplote  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  pre a) NaNAP, pH = 7,4 b) NaNAP, pH = 2 c) HNAP, pH = 7,4 a d) HNAP, pH = 2.



prostredie intravenózne tekutiny respektíve prostredie tenkého čreva. Teplota bola nastavená na 37 °C, čo je fyziologická teplota ľudského tela. Celkové množstvo uvoľneného naproxénu bolo stanovované v zvolených časových intervaloch - 0,5; 1,5; 3,5; 5,5; 7,5; 9,5; 24; 28; 32 a 48 hodín. Kvantitatívna analýza bola realizovaná pomocou UV spektroskopie. Percentuálny prepočet uvoľneného množstva naproxénu bol realizovaný z vypočítaných údajov z termogravimetrickej analýzy. Diskutované výsledky sú rozdelené do štyroch častí v závislosti od formy liečiva a pH prostredia, ako to je znázornené na obrázku 1.

**NaNAP, pH = 7.4** Obrázok 1a zobrazuje krivku uvoľňovania liečiva NaNAP pri pH = 7,4 a  $T = 37$  °C. Z obrázku 1a je zrejmé, že uvoľňovanie liečiva prebieha rýchlo a prudko počas prvých hodín uvoľňovania a celkové uvoľnenie liečiva nastáva po 10 hodinách experimentu. Rýchle uvoľňovanie sa pozorovalo pri materiáloch SBA-15-CH<sub>3</sub> + NaNAP, SBA-15-SH + NaNAP a SBA-15 + NaNAP, čo je zrejme z priebehu a tvaru krivky. Naopak, pri SBA-15-NH<sub>2</sub> + NaNAP, SBA-15-NCO + NaNAP a SBA-15-Ph + NaNAP bolo uvoľňovanie mierne inhibované v dôsledku medzimolekulových interakcií medzi liečivom a povrchovými funkčnými skupinami na materiáli SBA-15. Získané hodnoty jednotlivých celkových množstiev uvoľneného liečiva po 48 hodinách, môžu byť usporiadané nasledovne: SBA-15-CH<sub>3</sub> + NaNAP (95,8 %) > SBA-15-SH + NaNAP (91,7 %) > SBA-15-Ph + NaNAP (87,8 %) > SBA-15 + NaNAP (76,9 %) > SBA-15-NCO + NaNAP (58,2 %) > SBA-15-NH<sub>2</sub> + NaNAP (44,7 %).

**NaNAP, pH = 2** Na Obrázku 1b možno pozorovať, že pri pH = 2 a  $T = 37$  °C sa uvoľnila približne polovica NaNAP v porovnaní s pH = 7,4. Okrem menšieho množstva uvoľneného liečiva je možné pozorovať aj zmeny tvaru jednotlivých uvoľňovacích kriviek. Materiál SBA-15-CH<sub>3</sub> + NaNAP vykazuje výrazné uvoľnenie NaNAP v prvých 8 hodinách experimentu, zatiaľ čo tvar kinetických kriviek pre ostatné materiály ukazuje postupné uvoľňovanie do 28 hodín. Ďalšie uvoľňovanie liečiva nebolo pozorované v nasledovných časových intervaloch a nastala saturácia roztoku. Na základe získaných výsledkov môže byť množstvo uvoľneného NaNAP klasifikované nasledovne v závislosti od materiálov: SBA-15-CH<sub>3</sub> + NaNAP (57,1 %) > SBA-15-Ph + NaNAP (50,4 %) > SBA-15-SH + NaNAP (48,1 %) > SBA-15 + NaNAP (44,2 %) > SBA-15-NCO + NaNAP (35,9 %) > SBA-15-NH<sub>2</sub> + NaNAP (29,7 %). Ako je vidieť z tejto postupnosti, podobný trend bol pozorovaný pri pH = 2 v porovnaní s pH = 7,4 (pozri Obrázok 1a, b). Funkčné skupiny interagovali s liečivom, čo sa prejavilo postupným uvoľňovaním liečiva (tvar krivky) a množstvom uvoľneného NaNAP. pH prostredia malo významný vplyv na celkové množstvo uvoľneného liečiva. Pri pH = 2 sa pozorovala protonácia naproxénovej sodnej soli a jej transformácia na kyselinu naproxénovú, čo spôsobilo zníženie rozpustnosti spojenú s menším uvoľňovaním liečiva. Tento fakt je dôkazom protónovej konštanty  $pK_a = 4,19$  pre molekuly naproxénu. Rozpustnosť naproxénu sodného je 14 mg NaNAP/1 cm<sup>3</sup> pri  $T = 37$  °C a pH = 1,3 vo vode.

**HNAP, pH = 7,4** Je všeobecne známe, že NSAID liečivá, respektíve ich kyseliny, majú zlú rozpustnosť vo vode v porovnaní so svojimi soľami, čo sme tiež pozorovali v našom experimente. Okrem vplyvu typu funkčnej skupiny boli dosiahnuté výsledky tiež ovplyvnené rozpustnosťou liečiva. Ako možno vidieť na Obrázku 1c, priebeh kriviek a celkové množstvo uvoľneného liečiva sú podobné ako u NaNAP pri pH = 2 experimentoch do 28 hodín. Maximálne množstvá uvoľneného HNAP po 48 hodinách možno zoradiť nasledovne: SBA-15-CH<sub>3</sub> + HNAP (47,3 %) > SBA-15-SH + HNAP (39,3 %) > SBA-15 + HNAP (37,5 %) > SBA-15-Ph + HNAP (37,1 %) > SBA-15-NCO + HNAP (24,2 %) > SBA-15-NH<sub>2</sub> + HNAP (19,2 %). Opäť možno pozorovať rovnaký trend maximálneho uvoľňovania liečiva v závislosti od typu funkčných skupín. Rozpustnosť HNAP je nižšia v porovnaní s NaNAP, konkrétne 3,4 mg HNAP/1 cm<sup>3</sup> pri pH = 7,4 a T = 35 °C vo vode; to sa prejavilo v menších množstvách uvoľneného liečiva.

**HNAP, pH = 2** Najmenšie množstvá uvoľneného liečiva boli experimentálne zistené pre HNAP pri pH = 2, T = 37 °C (pozri Obrázok 1d). Z kriviek uvoľňovania liečiva pripravených materiálov možno pozorovať, že po 48 hodinách nedošlo k saturácii roztoku, a teda k úplnému uvoľneniu HNAP z pripravených matric a všetky kinetické krivky uvoľňovania liečiva mali stúpajúci trend (pozri Obrázok 1d). Maximálne množstvo uvoľneného liečiva bolo z materiálu SBA-15-CH<sub>3</sub> + HNAP, ktoré postupne klesalo ku SBA-15-NH<sub>2</sub> + HNAP a hodnoty možno zoradiť nasledovne: SBA-15-CH<sub>3</sub> + HNAP (26,9 %) > SBA-15-SH + HNAP (23,8 %) > SBA-15 + HNAP (15,4 %) > SBA-15-Ph + HNAP (14,9 %) > SBA-15-NCO + HNAP (11,1 %) > SBA-15-NH<sub>2</sub> + HNAP (9,8 %). Bol pozorovaný aj vplyv intermolekulových interakcií za daných experimentálnych podmienok (pH = 2, T = 37 °C): tvorba vodíkových väzieb (SBA-15-NH<sub>2</sub> + HNAP a SBA-15-NCO + HNAP) a  $\pi - \pi$  interakcie (SBA-15-Ph + HNAP), ale aj rozpustnosť samotného liečiva mala významný vplyv. Rozpustnosť kyseliny naproxénovej je 0,03 mg HNAP/1 cm<sup>3</sup> pri pH = 2 a T = 35 °C vo vode [7].



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Almáši M., "A review on state of art and perspectives of metal-organic frameworks (MOFs) in the fight against coronavirus SARS-CoV-2", *Journal of Coordination Chemistry*, **74**(13), (2021), 2111–2127, doi: 10.1080/00958972.2021.1965130.
- [2] Bergman M.M., "The world after COVID", *World*, **1**(1), (2020), 45–48, doi: 10.3390/world1010005.

- [3] Arnold N., Lechner K., Waldeyer C., Shapiro M.D. and Koenig W., “Inflammation and cardiovascular disease: The future”, *European Cardiology Review*, **16**, doi: 10.15420/ecr.2020.50.
- [4] Zhu H., Zhang Y., Zhong Y., Ye Y., Hu X., Gu L. and Xiong X., “Inflammation-mediated angiogenesis in ischemic stroke”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **15**, doi: 10.3389/fncel.2021.652647.
- [5] Almáši M., Zeleňák V., Palotai P., Beňová E. and Zeleňáková A., “Metal-organic framework MIL-101(fe)-NH<sub>2</sub> functionalized with different long-chain polyamines as drug delivery system”, *Inorganic Chemistry Communications*, **93**, (2018), 115–120, doi: 10.1016/j.inoche.2018.05.007.
- [6] Zauška L., Beňová E., Urbanová M., Brus J., Zeleňák V., Hornebecq V. and Almáši M., “Adsorption and release properties of drug delivery system naproxen-SBA-15: Effect of surface polarity, sodium/acid drug form and pH”, *Journal of Functional Biomaterials*, **13**(4), (2022), 275, doi: 10.3390/jfb13040275.

## Histidínom povrchovo modifikovaný materiál UiO-66 ako nosič liečiva

A. Migasová<sup>1</sup>, E. Zauška<sup>1</sup>, V. Pevná<sup>1</sup>, V. Huntošová<sup>2</sup>, M. Almáši<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>2</sup> Katedra biofyziky, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Jesenná 5, 040 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: alexandra.migasova@student.upjs.sk

**ABSTRAKT** V rámci našej práce sme syntetizovali mikropórovitý materiál na báze metalo-organických sietí, konkrétne UiO-66-NH<sub>2</sub>, ktorý sme povrchovo modifikovali histidínom a do pórovitej štruktúry sme uzavreli 5-fluorouracil ako proti nádorové liečivo. Pripravené vzorky sme charakterizovali dostupnými fyzikálno-chemickými metódami (infračervená spektroskopia, prášková röntgenová difrakčná analýza, termogravimetrická analýza a adsorpcia/desorpcia argónu). Taktiež boli študované aj ich vlastnosti so zameraním na uvoľňovanie liečiva v prostrediach s rôznou hodnotou pH (simulácia prostredia žalúdočnej šťavy, nádorových buniek a intravenózneho prostredia) a biologickú aktivitu.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** metalo-organické siete; 5-fluorouracil; post-syntetická modifikácia; histidín; aktívny transport liečiv

## Úvod

Pokrok v oblasti nových systémov transportu liečiv pritiahol v posledných rokoch veľkú pozornosť, pretože tieto systémy zvyšujú terapeutickú účinnosť liekov pomocou cieleného, riadeného a neprerušovaného podávania, pričom uspokojujú skutočný a primeraný dopyt po liečive [1]. Významný pokrok v tejto oblasti je možné dosiahnuť použitím nanočastíc ako nosičov liečiv, pretože prinášajú príležitosť na riadené uvoľňovanie liečiva, ktoré umožňuje liečivám dostatočný čas, aby pôsobili so zvýšeným terapeutickým účinkom. Aplikácia nanotechnológií môže zlepšiť rozpustnosť liečiva, zmeniť jeho distribúciu v rôznych tkanivách a orgánoch, upraviť kinetiku uvoľňovania, aby sa dosiahlo kontrolované a neprerušované uvoľňovanie liečiva s podporou jeho agregácie v cieľenej oblasti. Ako nosiče liečiv boli navrhnuté rôzne materiály, avšak veľká pozornosť v oblasti cieleného transportu liečiv bola venovaná mikropórovitým metalo-organickým sieťam, ktoré sa vyznačujú veľkou kapacitou pre uzatvorenie liečiva, kinetickou a termodynamickou stabilitou, dobrou biokompatibilitou, nízkou cytotoxicitou a možnosťami povrchovej funkcionálizácie so získaním požadovaných fyzikálno-chemických vlastností [2,3,4].

## Experimentálne metódy a výsledky

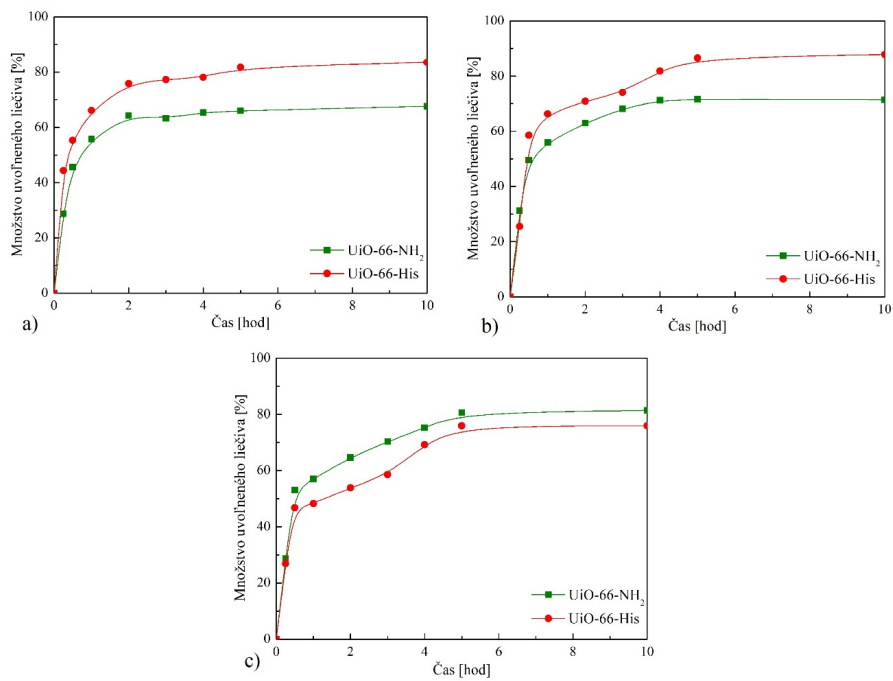
Syntéza materiálu UiO-66-NH<sub>2</sub> bola uskutočnená solvotermálnou metódou opísanou autorom Katz a kol. [5]. Následne bola uskutočnená povrchová modifikácia

voľných amínových skupín materiálu molekulami histidínu prostredníctvom amidovej väzby. Nakoniec pomocou metódy impregnácie bolo do pórovitej štruktúry pripravených vzoriek uzavreté liečivo 5-fluorouracil, pričom 10 ml vodného roztoku obsahovalo 100 mg liečiva. Z výsledkov termogravimetrickej analýzy sme zistili, že v prípade materiálu UiO-66-NH<sub>2</sub> sa uzavrelo 137,1 mg 5 fluorouracilu na 1 gram materiálu a do modifikovaného materiálu sa uzavrelo 45,0 mg liečiva na 1 gram materiálu. Experimenty na štúdium uvoľňovania liečiva boli realizované v troch prostrediach s rôznymi hodnotami pH, ktoré simulovali prostredie žalúdočnej šťavy (pH = 2), fyziologické prostredie nádorových buniek (pH = 5,5) a intravenózne prostredie (pH = 7,4). Maximálne uvoľnené množstvá 5-fluorouracilu sú zhrnuté v tabuľke 1 a uvoľňovacie krivky sú zobrazené na obrázku 1. Z výsledkov je možné pozorovať, že modifikáciou materiálu histidínom je možné kontrolovať uvoľňovanie liečiva vplyvom pH, pretože v kyslom prostredí sa liečivo uvoľňovalo rýchlejšie a vo väčšom množstve z modifikovaného materiálu. V prostredí s hodnotou pH = 7,4 sa vyskytuje opačný trend.

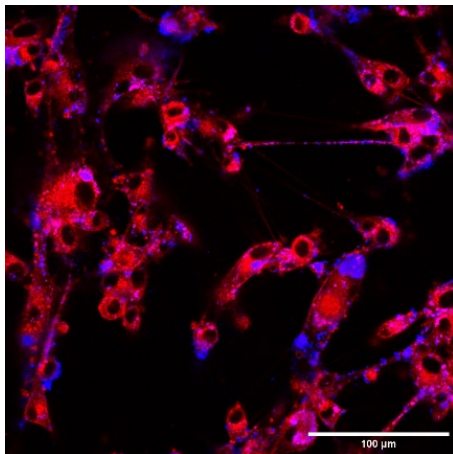
Biologická aktivita pripravených materiálov bola študovaná na gliomových bunkových líniiach U87 MG so zameraním sa na pozorovanie prestupu častíc do intrabunkového priestoru vplyvom modifikácie. Na obrázku 2 je možné pozorovať červené nádorové bunky, ktoré sú zafarbené hypericínom. Modrá farba znázorňuje nanočastice modifikovaného materiálu UiO-66-His vyskytujúce sa v medzibunkovom priestore a ružovou farbou sú zvýraznené nanočastice, ktoré interagujú s hypericínom v intrabunkovom priestore. Súčasne bolo pozorované, že modifikácia povrchu nanočastíc zabezpečila lepší prechod bunkovou membránou a bol pozorovaný transport častíc medzi bunkami cez bunkové spojenia. Zároveň bola sledovaná proliferácia buniek na základe podávaných cytostatík 5-fluorouracilu. Bolo zistené, že na základe riadeného uvoľňovania liečiva boli bunky usmrčovanejšie modifikovanými vzorkami s menším množstvom liečiva ako nemoifikovanými vzorkami s väčším obsahom liečiva a dokázali sa vyrovnat' čistému liečivu podávaného k bunkovej línii.

**Tabuľka 1:** Maximálne uvoľnené množstvá 5-fluorouracilu.

pH	Vzorka	Uvoľnené množstvo liečiva po 10 h		
		[%]	[mg/g]	[mmol/g]
2,0	UiO-66-NH <sub>2</sub> +5FU	67,67	33,79	0,26
	UiO-66-His+5FU	83,54	24,21	0,19
5,5	UiO-66-NH <sub>2</sub> +5FU	71,40	35,66	0,28
	UiO-66-His+5FU	87,79	25,44	0,20
7,4	UiO-66-NH <sub>2</sub> +5FU	81,42	40,66	0,31
	UiO-66-His+5FU	75,94	22,01	0,17



**Obr. 1:** Uvoľňovacie krivky 5-fluorouracilu z materiálov UiO-66-NH<sub>2</sub>+5FU a UiO-66-His+5FU v roztokoch s rôznym pH a) pH = 2 b), pH = 5,5 a c) pH = 7,4.



**Obr. 2:** Snímka gliómových bunkových línii a nanočastíc UiO-66-His.

## Záver

V práci sme sa venovali príprave a charakterizácii mikropórovitého materiálu na báze metalo organických sietí, konkrétne UiO-66-NH<sub>2</sub>, s následnou povrchovou modifikáciou voľných amínových skupín molekulami histidínu a uzavretím 5-fluorouracilu ako proti nádorového liečiva do pórovitej štruktúry pripravených vzoriek. Z hľadiska skúmania vlastností sme sa zamerali na štúdium uvoľňovania liečiva, počas ktorého bol pozorovaný významný vplyv modifikácie, keďže v kyslom prostredí sa liečivo uvoľňovalo rýchlejšie a vo väčšom množstve z modifikovaného materiálu. Výsledky testov na biologickú aktivitu poukázali na penetráciu buniek našimi časticami s efektívnejším usmrcovaním nádorových buniek vplyvom modifikácie.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Tewabe A., Abate A., Tamrie M., Seyfu A. and Siraj E.A., "Targeted drug delivery — from magic bullet to nanomedicine: Principles, challenges, and future perspectives", *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, **14**, (2021), 1711–1724, doi: 10.2147/JMDH.S313968.
- [2] Kumari P., Ghosh B. and Biswas S., "Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery", *Journal of Drug Targeting*, **24**(3), (2015), 179–191, doi: 10.3109/1061186X.2015.1051049.
- [3] Bunzen H., "Chemical stability of metal-organic frameworks for applications in drug delivery", *ChemNanoMat*, **7**(9), (2021), 998–1007, doi: 10.1002/cnma.202100226.
- [4] Pettinari C., Marchetti F., Mosca N., Tosi G. and Drozdov A., "Application of metal - organic frameworks", *Polymer International*, **66**(6), (2017), 731–744, doi: 10.1002/pi.5315.
- [5] Katz M.J., Brown Z.J., Colón Y.J., Siu P.W., Scheidt K.A., Snurr R.Q., Hupp J.T. and Farha O.K., "A facile synthesis of UiO-66, UiO-67 and their derivatives", *Chemical Communications*, **49**(82), (2013), 9449, doi: 10.1039/c3cc46105j.

## Magnetické nanočastice obalené chitosanom pre účinnú magnetickú hypertermiu

I. Khmara<sup>1</sup>, M. Molčan<sup>1</sup>, I. Antal<sup>1</sup>, A. Juríková<sup>1</sup>, M. Kubovčíková<sup>1</sup>, V. Zavišová<sup>1</sup>, M. Konecká<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.v.i., Watsonova 47, 040 01 Košice

\* email korešpondujúceho autora: khmara@saske.sk

**ABSTRAKT** Magnetické nanočastice (MNČ) majú veľký potenciál v biomedicínskych a klinických aplikáciách vďaka svojim jedinečným fyzikálno-chemickým vlastnostiam. MNČ boli syntetizované metódou koprecipitácie s následnou stabilizáciou biodegradovateľným, biokompatibilným a bioaktívnym polysacharidom chitosanom. Komplexná fyzikálno-chemická charakterizácia MNČ obalených chitosanom (Chit-MNČ) dispergovaných vo vode sa uskutočnila pomocou rôznych metód na určenie ich štruktúry, morfológie, magnetických a bioaktívnych vlastností. Experimentálne vyhodnotenie špecifickej rýchlosti absorpcie (SAR) tak neobalených MNČ, ako aj modifikovaných Chit-MNČ sa uskutočnilo pomocou kalorimetrických meraní.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; chitosan; magnetická hypertermia; magnetická rezonancia

### Úvod

Nanomateriály a nanotechnológie sú v modernej vede čoraz dôležitejšie. Vývoj nových nanomateriálov s novými funkcionálnymi vlastnosťami ma široké využitie nielen v technike, ale aj v medicíne. V dôsledku toho nanomateriály, najmä magnetické nanočastice (MNČ), ponúkajú významné výhody vďaka svojim vynikajúcim fyzikálno-chemickým vlastnostiam a veľkosti, vďaka čomu sú nevyhnutné v mnohých medicínskych aplikáciách, ako je klinická diagnostika a terapeutické techniky [1,2] Jednou z prekážok použitia MNČ v biomedicíne je agregácia neobalených nanočastíc v dôsledku dipól-dipólovej interakcie medzi nimi. Preto sa na zamedzenie agregácie a na prípravu koloidne stabilných nanočastíc používa povrchová modifikácia rôznymi biokompatibilnými latkami, ako sú polysacharidy [3], polypeptidy [4], polyméry [5], aminokyseliny [6] alebo malé organické molekuly [7]. Modifikované MNČ sa zvyčajne skladajú z troch hlavných funkčných častí: magnetického jadra, povrchového povlaku a/alebo funkcionalizovaného vonkajšieho povlaku [8]. Magnetické jadro je často superparamagnetické, čo umožňuje manipuláciu s takými časticami v prítomnosti vonkajšieho magnetického poľa. Takéto povrchovo modifikované nanočastice môžu adsorbovať a viazať hydrofilné a hydrofóbne farmakologické liečivá a po následnej injekcii do tela môžu slúžiť ako systém na dodávanie liečiv. Rovnaké MNČ je možné aplikovať aj v magnetickej hypertermii. Najnovšie štúdie v oblasti kalorimetrie ukázali, že hypertermia môže výrazne zlepšiť klinický výsledok rádioterapie a chemoterapie pri liečbe špecifických typov nádorov v onkológii [9], pretože dokáže selektívne ohrievať cieľové tkanivá zvnútra.



Hlavný mechanizmus klinickej hypertermie súvisí s vplyvom tepelného stresu na bunku na molekulárnej úrovni [10]. Totiž, cytotoxické procesy začínajú prebiehať nad teplotami  $\sim 43$  °C v dôsledku denaturácie bielkovín [11]. Okrem toho sú neoplastické bunky citlivejšie na tento účinok ako normálne bunky. Táto technika bola nedávno použitá na terapiu glioblastómy a rakoviny prostaty [12].

## Experimentálne metódy a výsledky

Chitosanom obalene MNČ boli pripravené v dvoch krokoch podľa postupu opísaného v [13]. V prvej fáze boli MNČ syntetizované metódou koprecipitácie železitých a železnatých solí v alkalickom vodnom prostredí [14]. Vytvorené MNČ sa niekoľkokrát premyli deionizovanou vodou, aby sa odstránili zvyšky solí. Ďalej bol povrch nanočastíc oxidu železa obalený chitosanom (Chit), aby sa získal chitosanom obalený magnetické nanočastice (Chit-MNČ). Vzorky MNČ aj Chit-MNČ boli charakterizované pomocou rôznych metód na určenie ich vlastností. Časť vzoriek bola lyofilizovaná na analýzu TGA a magnetickú analýzu. Morfológia a mikroštruktúra Chit-MNČ boli študované pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM). Na analýzu TEM boli Chit-MNČ (1000-krát zriedené vo vode) nakvapkané na medenú mriežku potiahnutú formvarom a vysušenú na vzduchu pri teplote miestnosti pred naprašovaním uhlíkom a následným pozorovaním pod mikroskopom JEOL-TEM 2100F prevádzkovaným pri 200 kV. Magnetické vlastnosti pripravených vzoriek boli skúmané pomocou vibračného vzorkového magnetometra (VSM) inštalovaného na supravodivom magnetu od Cryogenic Limited. Merania sa uskutočňovali v režimoch chladenia s nulovým poľom (ZFC) a chladenia poľom (FC) v dostupnom teplotnom rozsahu od 2 do 300 K. Pre merania magnetizácie závislej od poľa sa používa magnetické pole v rozmedzí  $\pm 5$  T. Termogravimetrická analýza (TGA) sa použila na preukázanie tepelného rozkladu a na odhadnutie obsahu chitosanu v pripravených Chit-MNČ. Merania TG boli uskutočnené pre premyté a vysušené vzorky pod atmosférou vzduchu rýchlosťou 10 °C/min od izbovej teploty do 700 °C pomocou analyzátora TGD/TA Setaram SETSYS 16. Ďalším aplikovateľným prístupom na stanovenie adsorpcie chitosanu na magnetitových nanočasticách bola kolorimetrická metóda využívajúca UV/VIS spektroskopiu (Specord 40, Analytic Jena).

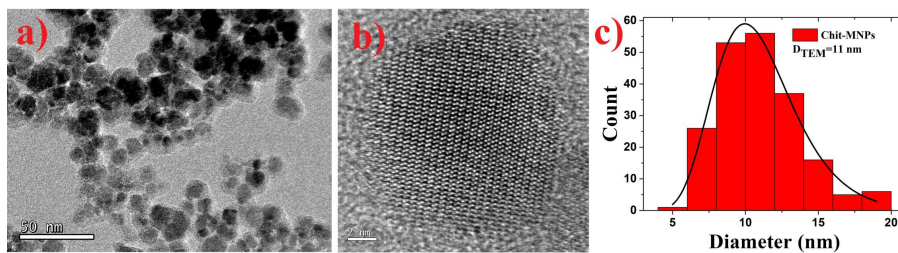
Merania magnetickej hypertermie sa uskutočňovali s použitím home-made prístroja, ktoré bolo opísané vyššie [15]. Tento prístroj umožňuje meranie pri rôznych intenzitách magnetického poľa až do 8 kA/m pri rôznych frekvenciách až do 440 kHz. Na preskúmanie zahrievacej schopnosti 1 mL vzoriek pripravených MNČ a Chit-MNČ boli roztoky umiestnené do stredu dutiny cievky, čím sa generovalo striedavé magnetické pole (AMF). Na záznam teploty sa použil modul FPI-HR vybavený snímačom teploty z optických vlákien (ponoreným v sklenenej fl'aštičke), model FOT-L-SD-C1-F2-M2-R5-SCAI (FISO Technologies; Québec, Kanada). v čase pri danej frekvencii a danom aplikovanom magnetickom poli. Presnosť merania

teploty bola  $\pm 0,1$  K. MNČ vložené do AMF absorbujú energiu z poľa, ktorá sa následne premení na teplo. Špecifická rýchlosť absorpcie (SAR) bola vypočítaná z časovej derivácie teploty pre  $t = 0$  podľa nasledujúceho vzťahu

$$SAR = \frac{C_p \rho_S}{m} \left( \frac{dT}{dt} \right)_{t=0}, \quad (5)$$

kde  $C_p$  a  $\rho_S$  sú špecifické teplo a hustota vzorky,  $m$  je hmotnosť magnetitu pripadajúca na jednotku objemu magnetickej tekutiny,  $dT/dt$  je smernica zmeny teploty na začiatku procesu ohrevu. Morfológia a veľkosť Chit-MNČ boli stanovené pomocou TEM. Získané TEM snímky Chit-MNČ, ako aj histogram priemeru pre Chit-MNČ, sú uvedené na obr. 1a–c. Obr. 1a ukazuje typický nízkozväčšený obraz MNČ. Chit-MNČ má jasne viditeľné okraje magnetického jadra (obr. 1a), ale presný okraj vrstvy chitosanu nie je dobre viditeľný, takže nie je možné presne určiť jej šírku. Je však možné získať priemer Chit-MNČ z TEM snímok, ktorý sa rovnal 11 nm (obr. 1c). Obr. 1b zobrazuje elektrónovú mikroskopiu s vysokým rozlíšením (HR-TEM) jednej nanočastice s jasne viditeľnými atómovými stĺpcami.

V Tab. 1 je zosumarizovaná fyzikálno-chemická charakterizácia MNČ a Chit-MNČ vzoriek. Pomocou magnetizačných meraní sme zistili magnetické vlastnosti MNČ a Chit-MNČ. Porovnanie hodnôt magnetizácie nasýtenia ( $M_s$ ) a blokovacích teplôt (TB) pre pripravené vzorky sú zhrnuté v Tab. 1, je vidieť, že hodnota  $M_s$  MNČ bola o niečo vyššia v porovnaní s Chit-MNČ, čo je spôsobené znížením hmotnostného pomeru magnetitu vo vzorkách po nanosení povlaku. Ďalej boli namerané magnetizačné krivky našich vzoriek prispôbené Langevinovej funkcii [16] a vypočítali sa priemery magnetického jadra (Tab. 1). Získané výsledky sú v súlade s hodnotou získanou z TEM. Následne sa vypočítalo množstvo Chit adsorbovaného na povrchu MNČ pomocou TGA a UV/VIS. Hodnota, ktorú sme dostali pri UV/VIS analýze je o niečo nižšia ako zodpovedajúce výsledky analýzy TGA (pozri Tab. 1). Hodnoty SAR boli odhadnuté zo závislostí  $dT/dt$  a vypočítané v jednotkách W/g podľa rovnice (1). Hodnoty SAR vzoriek MNČ a Chit-MNČ pri  $H_{max}$  ( $\sim 7,9$  kA/m) a  $f = 190$  kHz sú 5,1 W/g a 6,5 W/g. Hodnoty SAR pre tieto veľkosti  $H$  a  $f$  sú relatívne nízke, ale typické pre nanočastice so superparamagnetickým správaním [17].



**Obr. 1:** Všeobecný pohľad na chitosan modifikované MNČ pomocou TEM, b) HR-TEM obrázok častice zobrazujúcej mriežku. c) Histogram distribúcie veľkosti častíc.

**Tabuľka 1:** Fyzikálno-chemická charakterizácia pripravených vzoriek.

Vzorka	$M_S$ [emu/g]	$T_B$ [K]	$D_{mag}$ [nm]	Absorpčná analýza*		SAR <sup>†</sup> [W/g]
				TGA	UV/VIS	
MNČ	75	230	9,9	-	-	5,1
Chit-MNČ	70	209	10,3	0,038	0,025	6,5

\* mg<sub>Chit</sub>/mg<sub>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></sub>, <sup>†</sup> merané pri  $f = 190$  kHz,  $H = 7.9$  kA/m

## Záver

V tejto práci boli magnetické nanočastice pripravené metódou koprecipitácie a stabilizované chitosanom. Pripravené vzorky boli fyzikálno-chemické charakterizované rôznymi technikami. Pri magnetických meraniach pozoroval sa vplyv pot'ahovej vrstvy na saturačnú magnetizáciu Chit-MNČ. Okrem toho posun  $T_B$  smerom k nižším teplotám naznačuje zníženie interakcie magnetického dipólu a dipólu medzi magnetickými nanočasticami v dôsledku prítomnosti chitosanového povlaku. Okrem toho získaná hodnota  $T_B$  pre Chit-MNČ ( $T_B = 209$  K) splnila požiadavku súvisiacu s tvrdením, že  $T_B$  musí byť pod izbovou teplotou. Ďalej sa testovala schopnosť zahrievania MNČ a Chit-MNČ. Zistilo sa, že Chit-MNČ majú lepšiu účinnosť ohreву v porovnaní s nepotiahnutými MNČ, čo opäť dokazuje dôležitosť stabilizačnej vrstvy.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Corot C., Robert P., Idee J. and Port M., "Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging", *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**(14), (2006), 1471–1504, doi: 10.1016/j.addr.2006.09.013.
- [2] Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K. and Dobson J., "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine", *Journal of Physics D: Applied Physics*, **36**(13), (2003), R167–R181, doi: 10.1088/0022-3727/36/13/201.
- [3] Jiang Z., Dong X. and Sun Y., "Charge effects of self-assembled chitosan-hyaluronic acid nanoparticles on inhibiting amyloid  $\beta$ -protein aggregation", *Carbohydrate Research*, **461**, (2018), 11–18, doi: 10.1016/j.carres.2018.03.001.
- [4] Kogan M.J., *et al.*, "Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation", *Nano Letters*, **6**(1), (2005), 110–115, doi: 10.1021/nl0516862.

- [5] Moore K.A., *et al.*, “Influence of gold nanoparticle surface chemistry and diameter upon alzheimer’s disease amyloid- $\beta$  protein aggregation”, *Journal of Biological Engineering*, **11**(1), doi: 10.1186/s13036-017-0047-6.
- [6] Antosova A., Bednarikova Z., Koneracka M., Antal I., Marek J., Kubovcikova M., Zavisova V., Jurikova A. and Gazova Z., “Amino acid functionalized superparamagnetic nanoparticles inhibit lysozyme amyloid fibrillization”, *Chemistry – A European Journal*, **25**(31), (2019), 7501–7514, doi: 10.1002/chem.201806262.
- [7] Palmal S., Maity A.R., Singh B.K., Basu S., Jana N.R. and Jana N.R., “Inhibition of amyloid fibril growth and dissolution of amyloid fibrils by curcumin-gold nanoparticles”, *Chemistry - A European Journal*, **20**(20), (2014), 6184–6191, doi: 10.1002/chem.201400079.
- [8] Vatta L.L., Sanderson R.D. and Koch K.R., “Magnetic nanoparticles: Properties and potential applications”, *Pure and Applied Chemistry*, **78**(9), (2006), 1793–1801, doi: 10.1351/pac200678091793.
- [9] Issels R.D., “Hyperthermia adds to chemotherapy”, *European Journal of Cancer*, **44**(17), (2008), 2546–2554, doi: 10.1016/j.ejca.2008.07.038.
- [10] Datta N., Ordóñez S.G., Gaipal U., Paulides M., Crezee H., Gellermann J., Marder D., Puric E. and Bodis S., “Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future”, *Cancer Treatment Reviews*, **41**(9), (2015), 742–753, doi: 10.1016/j.ctrv.2015.05.009.
- [11] Henle K.J. and Dethlefsen L.A., “Heat fractionation and thermotolerance: A review”, *Cancer research*, **38**(7), (1978), 1843–1851.
- [12] Maier-Hauff K., Ulrich F., Nestler D., Niehoff H., Wust P., Thiesen B., Orawa H., Budach V. and Jordan A., “Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme”, *Journal of Neuro-Oncology*, **103**(2), (2010), 317–324, doi: 10.1007/s11060-010-0389-0.
- [13] Khmara I., Strbak O., Zavisova V., Koneracka M., Kubovcikova M., Antal I., Kavecansky V., Lucanska D., Dobrota D. and Kopcansky P., “Chitosan-stabilized iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **474**, (2019), 319–325, doi: 10.1016/j.jmmm.2018.11.026.
- [14] Khmara I., Kubovcikova M., Koneracka M., Kalska-Szostko B., Zavisova V., Antal I., Rajnak M., Dankova Z., Kavecansky V., Omastova M. and Kopcansky P., “Preparation and characterization of magnetic nanoparticles”, *Acta Physica Polonica A*, **133**(3), (2018), 704–706, doi: 10.12693/APhysPolA.133.704.
- [15] Skumiel A., Leszczyński B., Molcan M. and Timko M., “The comparison of magnetic circuits used in magnetic hyperthermia”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **420**, (2016), 177–184, doi: 10.1016/j.jmmm.2016.07.018.
- [16] Skumiel A., Hornowski T. and Józefczak A., “Heating characteristics of transformer oil-based magnetic fluids of different magnetic particle concentrations”, *International Journal of Thermophysics*, **32**(4), (2010), 876–885, doi: 10.1007/s10765-010-0799-4.
- [17] Skumiel A., Kaczmarek-Klinowska M., Timko M., Molcan M. and Rajnak M., “Evaluation of power heat losses in multidomain iron particles under the influence of AC magnetic field in RF range”, *International Journal of Thermophysics*, **34**(4), (2013), 655–666, doi: 10.1007/s10765-012-1380-0.

## Testovanie modifikovaných magnetických nanopartikul na izoláciu RNA

A. Pavlová<sup>1</sup>, B. Kočíková<sup>1</sup>, M.U. Dolinská<sup>1</sup>, E. Beňová<sup>2</sup>, J. Košuth<sup>3</sup>, V. Zeleňák<sup>2</sup>, A. Zeleňáková<sup>4</sup>, A. Jacková<sup>1</sup>, Š. Vilček<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

<sup>2</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>3</sup> Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 040 01 Košice

<sup>4</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

\* email korešpondujúceho autora: a.l.i.c.a.p.a.v.l.o.v.a@u.v.f . s.k

---

**ABSTRAKT** Experimentálne magnetické nanopartikuly boli testované pri izolácii RNA z homogenátu pečene diviaka, infikovanej vírusom hepatitídy E, komerčným kitom MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit. Testovaných bolo 12 nanopartikul s rôznymi povrchovými modifikáciami, po izolácii bola v každej vzorke meraná koncentrácia, ako aj prahový cyklus (Ct) použitím metódy RT-qPCR. Najvyššiu koncentráciu dosiahli komerčné magnetické nanopartikuly z kitu (137,3 ng/μl). Najvyššiu koncentráciu z experimentálnych nanopartikul dosiahla vzorka S21 (83 ng/μl) a vzorka S1 (78,3 ng/μl), najnižšiu koncentráciu vzorka S4 (9,3 ng/μl). Najnižšia hodnota Ct bola pozorovaná u komerčných magnetických nanopartikul (Ct = 21,16). Z testovaných nanopartikul najnižšiu hodnotu Ct dosiahli nanopartikuly S1 (Ct = 22,78) a S21 (Ct = 22,88). Najvyššiu hodnotu Ct dosiahli nanopartikuly S2 (Ct = 36,93).

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanopartikuly; izolácia; nukleové kyseliny; vírus hepatitídy E; RT-qPCR

---

## Úvod

Magnetické nanopartikuly sa vďaka svojim pozitívnym vlastnostiam využívajú už niekoľko rokov v biologických, medicínskych a diagnostických oblastiach [1]. Značný potenciál vykazujú najmä v efektívnej interakcii s biomolekulami, čo je možné uplatniť pri izolácii nukleových kyselín. Izolácia nukleových kyselín vhodne upravenými magnetickými nanopartikulami je relatívne rýchla a efektívna metóda, ktorá vykazuje vysokú citlivosť [2]. Všestranné využitie nanopartikul vyplýva z ich zloženia – kombinácie jadra z Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> obaleného vrstvou rôznych materiálov, najčastejšie vrstvou SiO<sub>2</sub>, ktorá ho ochraňuje pred oxidáciou. Povrchová modifikácia nanopartikul pomocou rôznych funkčných skupín zvyšuje stabilitu a mení ich vlastnosti [3]. Takéto partikuly sú schopné reverzibilne viazať molekuly DNA alebo RNA prítomné vo vzorkách. V prítomnosti magnetického poľa sú nukleové kyseliny očistené od väčšiny nečistôt a z povrchu nanopartikul sa uvoľňujú elučným pufrom s

rôznou iónovou silou [4]. Takýmto spôsobom je možné získať kvalitnú, čistú nukleovú kyselinu, ktorá je vhodná na ďalšie analýzy. Cieľom tejto práce bolo zistiť schopnosť experimentálne pripravených magnetických nanopartikul izolovať nukleovú kyselinu z tekutých druhov klinických vzoriek.

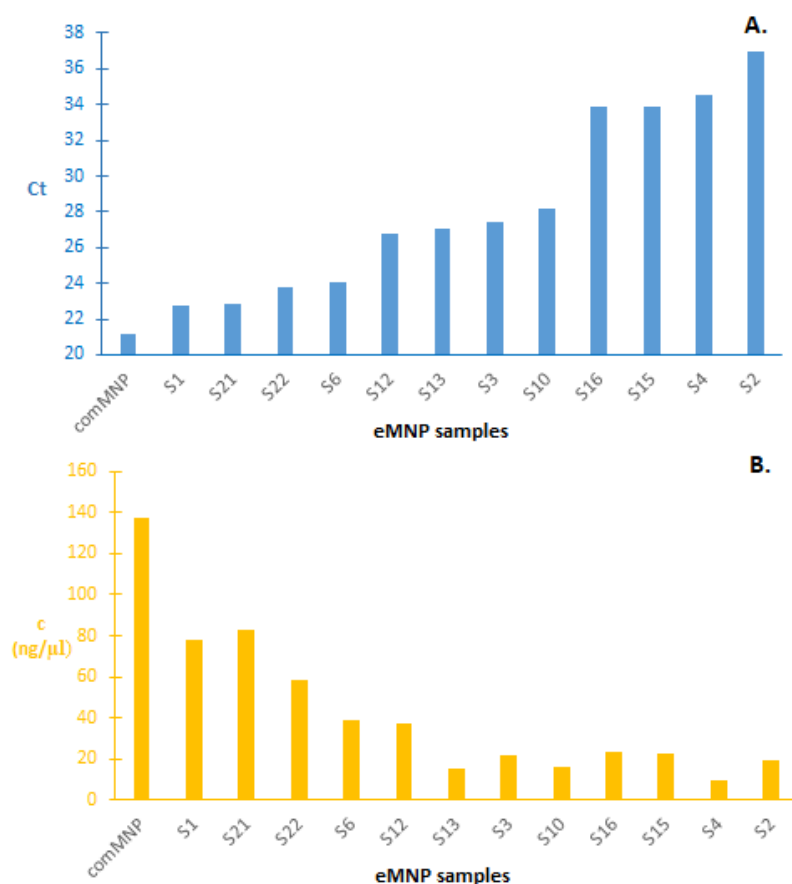
## Experimentálne metódy a výsledky

Testovanie 12 druhov experimentálnych magnetických nanopartikul (eMNP) na báze oxidu železa, bolo založené na izolácii nukleových kyselín komerčným kitom MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania). Komerčné magnetické nanopartikeluly (comMNP) z kitu boli nahradené eMNP. RNA vírusu hepatitídy E (HEV) bola izolovaná z 5 % (w/v) homogenátu pozitívnej klinickej vzorky pečene diviaka. Kvalita izolovanej nukleovej kyseliny bola zisťovaná na základe nameranej koncentrácie (A260) a čistoty (A260/280). Na detekciu RNA HEV bola využívaná metóda RT-qPCR [5] s iTaq Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) použitím prístroja Bio-Rad CFX Opus 96 Real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) (Obr. 1). Výsledkom RT-qPCR bola hodnota prahového cyklu (Ct). Izolácia RNA HEV eMNP bola zopakovaná trikrát, čo umožnilo vypočítať priemerné hodnoty koncentrácií a Ct pre každý druh testovaných nanopartikul.

Čistota a koncentrácia vyzolovanej RNA značne varírovala u všetkých magnetických nanopartikul. Čistota vyzolovanej RNA sa pohybovala v rozpätí od 1,25 do



**Obr. 1:** Termocyklér CFX Opus 96 Real-time PCR system.



**Obr. 2:** A. – hodnoty Ct RT-qPCR, B. – hodnoty koncentrácie vyizolovanej RNA.

2,5. Najvyššiu koncentráciu dosiahli comMNP z kitu (137,3 ng/μl). Najvyššiu koncentráciu z eMNP dosiahla vzorka S21 (83 ng/μl) a vzorka S1 (78,3 ng/μl), najnižšiu koncentráciu vzorka S4 (9,3 ng/μl) (Obr.2B). Hodnoty Ct získané z RT-qPCR dosiahli najnižšiu úroveň u comMNP (Ct = 21,16). Najnižšiu (najlepšiu) hodnotu Ct dosiahli testované nanopartikuly S1, s vrstvou siliky a bez ligandov (Ct = 22,78) a nanopartikuly S21, obalené poréznou vrstvou siliky (Ct = 22,88). Najvyššie hodnoty Ct dosiahli nanopartikuly S2 s ligandami modifikovaným povrchom (Ct = 36,93) (Obr.2A).

## Záver

V tejto práci sme skúmali schopnosť eMNP s rôznymi povrchovými modifikáciami izolovať vírusovú RNA z homogenátu pečene. Všetky pripravené nanopartikelky boli schopné izolovať RNA zo vzorky, žiadna z eMNP ale nedosiahla hodnoty ako com-MNP. Najvyššiu koncentráciu RNA dosiahli vzorky S21 a S1 a najnižšiu hodnotu Ct vzorky S1 a S21. Po zlepšení a úprave reakčných podmienok môžu byť nanopartikelky s rôznymi povrchovými modifikáciami efektívne využívané pri izolácii RNA vírusov.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

## Literatúra

- [1] Lee A.H., Gessert S.F., Chen Y., Sergeev N.V. and Haghiri B., "Preparation of iron oxide silica particles for zika viral RNA extraction", *Heliyon*, **4**(3), (2018), e00572, doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00572.
- [2] Kawadkar J., Chauhan M.K. and Maharana M., "Nanobiotechnology: Application of nanotechnology in diagnosis, drug discovery and drug development", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **4**(1), (2011), 23–28.
- [3] Berensmeier S., "Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**(3), (2006), 495–504, doi: 10.1007/s00253-006-0675-0.
- [4] Oberacker P., Stepper P., Bond D., Hipp K., Hore T. and Jurkowski T., "Simple synthesis of functionalized paramagnetic beads for nucleic acid purification and manipulation", *BIO-PROTOCOL*, **9**(20), doi: 10.21769/bioprotoc.3394.
- [5] Jothikumar N., Cromeans T.L., Robertson B.H., Meng X. and Hill V.R., "A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis e virus", *Journal of Virological Methods*, **131**(1), (2006), 65–71, doi: 10.1016/j.jviromet.2005.07.004.



## Testovanie experimentálnych magnetických nanočastíc NANOVIR na izoláciu RNA SARS-CoV-2 zo sterov z nosohltanu

J. Košuth<sup>1</sup>, J. Mačák<sup>2</sup>, E. Beňová<sup>3</sup>, B. Kočíková<sup>4</sup>, A. Jacková<sup>4</sup>, V. Zeleňák<sup>3</sup>, A. Zeleňáková<sup>5</sup>, Š. Vilček<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 040 01 Košice

<sup>2</sup> Synlab Slovakia s.r.o., Opatovská cesta 10, 040 01 Košice

<sup>3</sup> Katedra anorganickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 041 01 Košice

<sup>4</sup> Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

<sup>5</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

\* email korešpondujúceho autora: jan.kosuth@upjs.sk

---

**ABSTRAKT** Séria pripravených experimentálnych magnetických nanočastíc (eMNP) z projektu NANOVIR bola testovaná pre využitie na izoláciu vírusovej RNA zo sterov z nosohltanu v tekutom transportnom médiu COVID-19 pozitívnych pacientov. Na izoláciu vírusovej RNA sme využili dva experimentálne postupy izolácie ako aj štandardne používaný automatizovaný extrakčný postup využívaný v klinickom laboratóriu. Úspešná izolácia SARS-CoV-2 vírusovej RNA bola potvrdená amplifikáciou 3 génov vírusu pomocou IVD certifikovaného kitu. Väčšina testovaných eMNP bola vhodná na izoláciu vírusovej RNA, hoci množstvo izolovanej vírusovej RNA bolo nižšie ako pri izoláciách komerčnými MNP.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; automatická izolácia RNA; manuálna izolácia RNA; RT-qPCR; SARS-CoV-2

---

## Úvod

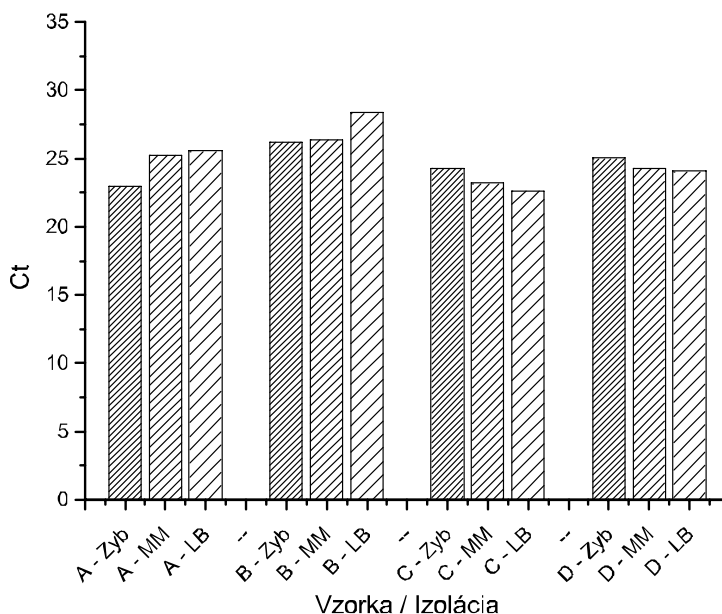
Súčasnú využitie magnetických nanočastíc (MNP) pri izolácii a detekcii nukleových kyselín (NK) výrazne prispelo k uľahčeniu experimentálneho výskumu a diagnostiky, zhrnuté v [1]. MNP pokryté silikou predstavujú alternatívu k tradičnej SPE (solid phase extraction). Výhodou oproti tradičnému použitiu izolačných kolóniek sú nižšie náklady, postup nevyžaduje centrifugáciu vzoriek a možnosť automatizácie izolačného postupu. Klúčové kroky pri izolácii sú lýza buniek, adsorpcia NK na povrch MNP, premytie a elúcia NK z MNP. NK sa na pevnú fázu/povrch MNP viažu počas extrakcie v závislosti od pH a zloženia soli v extrakčnom roztoku. Dôležité sú pritom predovšetkým interakcie vodíkových väzieb NK s hydrofilným matrixom za chaotropných podmienok lýzy, zhrnuté v [2]. Účinnosť izolácie nukleových kyselín z biologických vzoriek pomocou magnetických nanočastíc (MNP) je preto výrazne ovplyvnená samotnými povrchom MNP ako aj chemickým prostredím, v ktorom dochádza k naviazaniu/adsorbcií cieľovej NK na MNP. Interakciu individuálnych

MNP a NK tak potom možno optimalizovať zložením extrakčného roztoku. Cieľom našej práce preto bolo otestovať viaceré izolačné postupy (extrakčné roztoky) pri izolácii vírusovej RNA pomocou nami pripravených experimentálnych magnetických nanočastíc (eMNP). Ako model sme použili klinické vzorky sterov z nosohltana Covid-19 pozitívnych pacientov v tekutom transportnom médiu.

## Experimentálne metódy a výsledky

Biologický materiál. Vzorky sterov z nosohltanu a hrdla vo vírusovom transportnom médiu. Klinické vzorky pacientov infikovaných vírusom SARS-CoV-2 boli vo pred anonymizované. Všetky analýzy klinických vzoriek boli vykonané v súlade s laboratórnymi pravidlami a príslušnými usmerneniami a nariadeniami klinického laboratória. Magnetické nanočastice (MNP) použité na izoláciu vírusovej RNA. Originálne MNP použitých RNA izolačných kitov – zybMNP (MNP izolačného kitu Zybio), mmMNP (MNP izolačného kitu MagMax Viral RNA Isolation Kit; experimentálne MNP (eMNP) projektu NANOVIR - S1 (eMNP bez ligandov / povrchovej modifikácie), S3 a S6 (eMNP s povrchovo naviazaným ligandom MPTMS a CPTMS) a S21, S22 a S23 (eMNP s modifikovaným poréznym povrchom). Izolácia vírusovej RNA. Celková RNA zo vzoriek bola izolovaná pomocou experimentálneho postupu izolácie pomocou LB extrakčného roztoku publikovanom v [3] a dvoch komerčne dostupných kitov: i.) MagMax™ Viral RNA isolation Kit (Applied Biosystems) - kit určený na experimentálne účely na izoláciu NK z kvapalných vzoriek a ii.) Nucleic Acid Extraction Kit - Magnetic Bead Method (Zybio) – IVD certifikovaný kit pre automatizovanú izoláciu NK pomocou izolačného automatu Zybio EXM 3000 (Zybio). Kvantifikácia izolovanej vírusovej RNA (RT-qPCR). RNA vírusu SARS-CoV-2 v izolátoch zo sterov bola detegovaná pomocou komerčného IVD-certifikového kitu COVID-19 Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Labsystems Diagnostics), ktorým sa amplifikujú a detegujú súčasne tri špecifické gény SARS-CoV-2 (ORF1ab, E, N) spolu s jedným ľudským génom ako internou kontrolou (IC). Vzorky RNA izolované z rovnakého klinického materiálu s použitím rôznych eMNP a orgMNP boli vždy analyzované súčasne a hodnotené pri rovnakom nastavení prahu fluorescence (thresholdu) pre jednotlivé gény. Vyhodnotenie. Relatívne množstvo izolovanej RNA sme vyhodnocovali na základe priemernej Ct hodnoty (geometrický priemer) troch analyzovaných génov vírusu. Hodnoty Ct izolátov RNA získanými pomocou eMNP boli porovnávané s výsledkami získanými pomocou originálnych MNP použitého kitu, resp. pomocou komerčných mmMNP pri manuálnej izolácii extrakčným roztokom LB.

Na testovanie väzby vírusovej RNA na vybrané eMNP sme použili 3 izolačné postupy: izolácia RNA klinicky certifikovaným automatizovaným systémom Zybio (Zyb) a 2 manuálne izolačné postupy – izolácia komerčným kitom MagMax (MM) a izolácia RNA extrakčným roztokom LB postupom podľa [3] (LB). V prípade komerčných kitov (Zyb, MM) boli súčasťou izolačného kitu aj originálne MNP. V prípade



**Obr. 1:** Porovnanie účinnosti izolácie RNA vírusu SARS-CoV-2 zo vzorky výteru z nosohltana covid-19 pozitívnych pacientov. Zobrazená je priemerná Ct hodnota troch detegovaných génov vírusu prítomných v RNA izolovanej originálnymi MNP použitého RNA izolačného kitu: Zyb - automatický izolátor Zybio, MM - komerčný kit MagMax, LB - extrakčný roztok LB.

experimentálneho extrakčného roztoku LB sme na porovnanie efektivity izolácie eMNP používali MNP z kitu MagMax. Všetky tri izolačné postupy mali porovnateľnú účinnosť izolácie RNA. Využitím originálnych MNP sme pri 4 testovaných vzorkách pomocou všetkých troch postupov získali RNA s porovnateľnými hodnotami Ct troch sledovaných génov vírusu (priemerné Ct, Obr.1).

Kvantifikáciou RNA izolovanej pomocou pripravených eMNP sa nám, s výnimkou eMNP - S1 pri použití roztoku LB, nepodarilo získať väčšie množstvo izolovanej vírusovej RNA ako pri použití originálnych/komerčných MNP. Najhoršie výsledky s eMNP, hodnoty Ct detegovaných vírusových génov, sme získali pomocou automatického izolátora Zybio. Pri použití eMNP sa RNA vírusu SARS-CoV 2 v tomto spôsobom izolovanej RNA podarilo detegovať až o 1,5-3,84 cyklu neskôr (Tab. 1). Najvhodnejšie prostredie pre väzbu RNA na eMNP predstavovalo zloženie extrakčného roztoku v MagMax extrakčnom kite pre eMNP – S1, S21 a S23. V tomto prípade sme vírusovú RNA detegovali s odstupom menej ako jedného cyklu (+0,89,+0,70 a +0,90 cyklu, Tab. 1), čo je veľmi pozitívny výsledok ak si uvedomíme, že do zloženia extrakčných roztokov sme nijako nezasahovali. V prípade extrakčného roztoku

**Tabuľka 1:** *Nárast/pokles hodnoty Ct RT-qPCR-detegovaných génov vírusu SARS-CoV-2 v RNA izolovanej použitím experimentálnych MNP (eMNP) a komerčných MNP (comMNP). Hodnoty predstavujú rozdiel detekcie (Ct hodnoty) pri izolácii RNA pomocou eMNP vs. comMNP. (+) nárast Ct pri použití eMNP, (-) pokles Ct pri použití eMNP. Hodnoty predstavujú priemer analýz 3-4 vzoriek.*

eMNP	Rozdiel Ct eMNP oproti originálnym MNP					
	Zyb	±SD	MM	±SD	LB	±SD
S1	+ 2,46	0,50	+ 0,89	0,28	- 0,93	0,39
S3	+ 3,84	0,32	+ 3,59	0,68	+ 1,95	0,82
S6	+ 1,72	0,36	+ 2,46	0,31	+ 2,03	0,16
S21	+ 1,50	0,15	+ 0,70	0,34	+ 3,27	1,60
S22	+ 2,51	0,40	+ 2,06	0,55	+ 2,58	0,93
S23	+ 1,42	0,24	+ 0,90	0,25	+ 1,22	-

LB sme pomocou eMNP – S1 boli schopný detegovať vírusovú RNA o takmer jeden cyklus skôr ako pomocou komerčných MNP kitu MagMax. Na druhej strane, zloženie použitého LB roztoku nebolo optimalizované pre tieto MNP.

Predpokladom v tejto štúdii bolo, že povrchová modifikácia a povrchovo viazané ligandy MNP by mohli poskytnúť vyššiu kapacitu pre väzbu RNA a tým vyššiu účinnosť izolácie RNA. V doterajšom priebehu sme však nezaznamenali významné zlepšenie v procese izolácie, čoho dôvodom môže byť slabšia interakcia modifikovaného povrchu s RNA v lyzačno/väzbovom roztoku alebo naopak príliš silná afinita ligandových skupín k RNA a problémy s účinnosťou elúcie/desorpcie. Pozorované rozdiely v účinnosti izolácie RNA pomocou jednotlivých MNP, resp. izolačných postupov pravdepodobne odrážajú odlišné prostredie/podmienky pre adsorpciu RNA na eMNP v extrakčnom pufrí. Jeho zloženie významne ovplyvňuje interakciu RNA a MNP [4]. Účinnosť izolácie môže byť ovplyvnený napr. koncentráciou guanidíntiokyanátu, DTT, pH lyzačného pufru [3] alebo charakterom ligandov viazaných na magnetické jadro a veľkosťou MNP. S výnimkou nami pripraveného extrakčného pufru LB však zloženie extrakčných roztokov komerčných kitov nepoznáme.

## Záver

Použitím troch rôznych izolačných postupov sa nám pomocou pripravených eMNP podarilo vyizolovať RNA vírusu SARS-CoV-2 z tekutých klinických vzoriek sterov Covid-19 pozitívnych pacientov v množstve detekovateľnom RT-qPCR. Izolované množstvo vírusovej RNA však vo väčšine prípadov bolo výrazne nižšie ako pri použití komerčných MNP. Je zjavné, že použitý extrakčný roztok výrazne vplyva na väzbu RNA na MNP a tým aj na výťažok. Najlepšie výsledky sme získali pri izolácii

komerčným kitom MagMax, kde pri izolácii RNA pomocou eMNP S1, S21 a S23 bol vírus detekovateľný len o necelý 1 cyklus neskôr ako pri použití komerčných MNP.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Tang C., He Z., Liu H., Xu Y., Huang H., Yang G., Xiao Z., Li S., Liu H., Deng Y., Chen Z., Chen H. and He N., "Application of magnetic nanoparticles in nucleic acid detection", *Journal of Nanobiotechnology*, **18**(1), doi: 10.1186/s12951-020-00613-6.
- [2] Tan S.C. and Yiap B.C., "DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2009**, (2009), 1–10, doi: 10.1155/2009/574398.
- [3] He H., Li R., Chen Y., Pan P., Tong W., Dong X., Chen Y. and Yu D., "Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections", *Scientific Reports*, **7**(1), doi: 10.1038/srep45199.
- [4] Li P., Li M., Yue D. and Chen H., "Solid-phase extraction methods for nucleic acid separation. a review", *Journal of Separation Science*, **45**(1), (2021), 172–184, doi: 10.1002/jssc.202100295.

## Syntéza a charakterizácia magnetických nanočastíc obalených oxidom kremičitým

M. Kubovčíková<sup>1</sup>, Z. Bednaríková<sup>1</sup>, I. Antal<sup>1</sup>, A. Antošová<sup>1</sup>, M. Gančár<sup>1</sup>, J. Kováč<sup>2</sup>, V. Girman<sup>1</sup>, D. Fedunová<sup>1</sup>, I. Khmara<sup>1</sup>, M. Koneracká<sup>1</sup>, Z. Gažová<sup>1</sup>, V. Zavišová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied v.u.i., Watsonova 47, 040 01 Košice

<sup>2</sup> Katedra fyziky kondenzovaných látok, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Park Angelinum 9, 041 54 Košice

\* email korešpondujúceho autora: zavisova@saske.sk

**ABSTRAKT** Bola pripravená séria vzoriek magnetických nanočastíc (MNPs) oxidov železa, ktoré boli obalené vrstvou oxidu kremičitého (SiO<sub>2</sub>) s rôznou hrúbkou s cieľom ich využitia na efektívnu izoláciu nukleových kyselín pre citlivú detekciu vírusových infekcií. Rôzna hrúbka SiO<sub>2</sub> vrstvy bola dosiahnutá použitím rôznych pomerov prekursora tetraethylortosilikátu (TEOS) k magnetitu (TEOS/MNPs = 0,06 - 20,0 ml/g). Rôznymi metódami boli skúmané rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti syntetizovaných oxidom kremičitým obalených nanočastíc (SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ako napr. morfológia, veľkosť, zloženie, magnetické a povrchové vlastnosti.

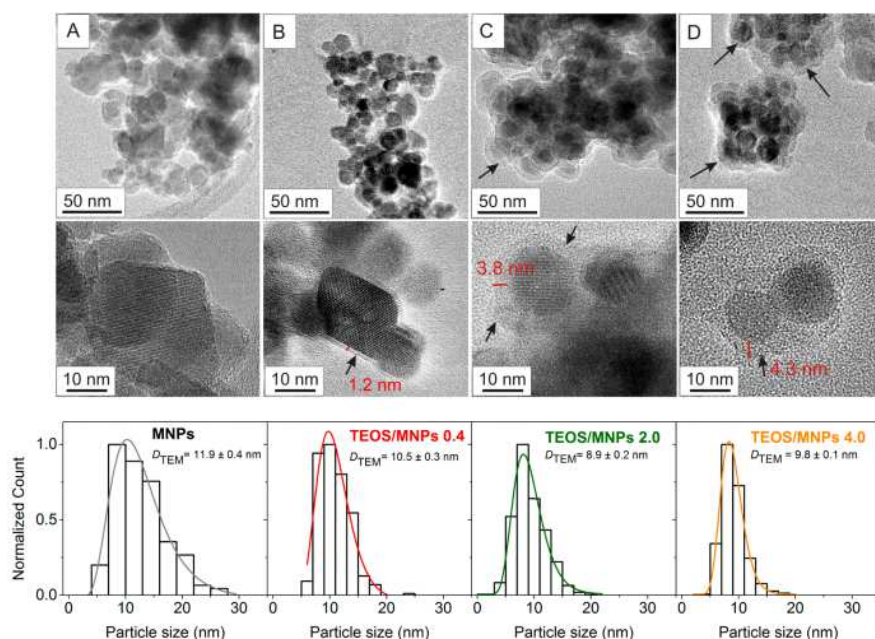
**KLÚČOVÉ SLOVÁ** magnetické nanočastice; fyzikálno-chemická charakterizácia; TEM; separácia

## Úvod

Magnetické nanočastice (MNPs) majú jedinečné vlastnosti, ktoré vznikli spojením magnetických vlastností materiálu a vysokého pomeru povrchu k objemu nanočastíc, čo otvára široké možnosti ich využitia v technike, biotechnológiách ale aj v oblasti medicíny. Magnetické nanočastice môžu rýchlo a účinne viazať biomolekuly ako enzýmy, DNA a proteíny z roztoku [1], ktoré môžu byť separované vonkajším magnetickým poľom. V diagnostike je potrebné vírusy a baktérie detegovať, čomu predchádza účinná separácia a skoncentrovanie nukleových kyselín z klinických vzoriek. V súčasnosti existujú rôzne postupy izolácie nukleových kyselín, ktoré využívajú mikrometrové magnetické častice obalené SiO<sub>2</sub>. Naším cieľom bolo pripraviť a charakterizovať magnetické nanočastice obalené SiO<sub>2</sub> a skúmať vplyv zloženia na jednotlivé vlastnosti ako napr. rozmer, náboj, hustota, magnetické vlastnosti s cieľom vyselektovať vzorky pre štúdium vplyvu týchto parametrov na účinnosť, citlivosť, detekciu a čas purifikačných postupov nukleových kyselín.

## Experimentálne metódy a výsledky

Magnetické SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> častice boli pripravené v dvojkrokovej syntéze. V prvom kroku boli MNPs pripravené vyzrážaním železitých a železnatých solí v zásaditom prostredí, premyté a lyofilizované [2]. V druhom kroku boli MNPs obalené rôznym



**Obr. 1:** TEM snímky (1. riadok), HRTEM snímky (2. riadok) a zodpovedajúce distribúcie veľkosti častíc a log-normálne rozdelenie (3. riadok) vybraných vzoriek (A) MNPs, (B)  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$ , (C)  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  2,0 a (D)  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  4,0.

množstvom  $\text{SiO}_2$  [2]. K práškovej vzorke magnetitu bol pridaný etanol, suspenzia bola sonifikovaná, následne miešaná a inkubovaná pri teplote  $80\text{ }^\circ\text{C}$ . Po pridaní amoniaku bol pridaný prekursor tetraetylortosilikát (TEOS) v pomere TEOS/MNPs od 0,06 do 20,0 ml/g. Ku vzorkám bola pridaná ultračistá voda. Po inkubácii za stáleho miešania sa zahrievanie odstavilo a miešanie pokračovalo cez noc. Vzorky sa premyli ultračistou vodou, potom etanolom a opäť vodou, aby sa odstránili neviazané nemagnetické zvyšky. Vzorky boli uchovávané vo forme lyofilizovaných práškov a pre ďalšie experimenty boli resuspendované v ultračistej vode. Vzorky boli následne charakterizované rôznymi technikami s cieľom stanoviť ich veľkosť, povrchový náboj, hustotu, magnetické vlastnosti a zloženie. Koncentrácia železa vo vzorkách bola stanovená kolorimetricky pomocou reakcie iónov  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{SCN}^-$  za vytvorenia  $[\text{Fe}(\text{SCN})]$  komplexov s charakteristickou červenou farbou, ktorého absorbanca bola meraná pomocou UV-VIS spektroskopie [3]. Výsledky stanovenia sú uvedené v tab. 1. Zeta potenciál vzoriek  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  sa meral ako funkcia vstupného pomeru TEOS/MNPs (v/w) a pH. Zeta potenciál pri obalovaní nanočastíc výrazne klesal z hodnoty  $+18\text{ mV}$  (pre neobalené MNPs) až na hodnotu cca  $-31\text{ mV}$  pre vzorku s TEOS/MNPs pomerom 0,2, čo indikuje postupné obalovanie povr-

**Tabuľka 1:** Fyzikálno-chemické vlastnosti  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  získané rôznymi metódami.

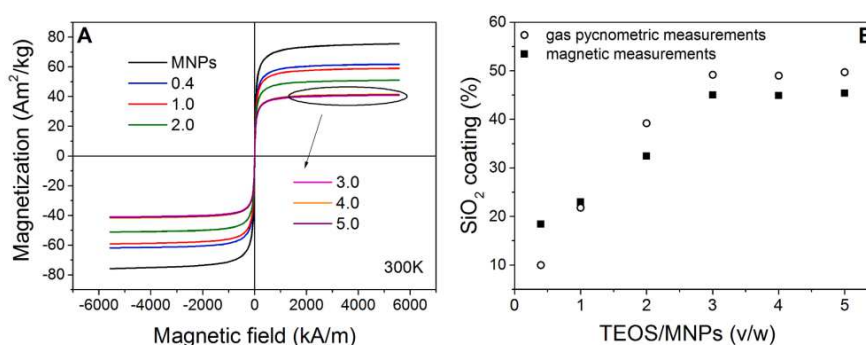
pomer [ml/g]	$Fe_3O_4^*$ [mg/mg]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$Fe_3O_4^\dagger$ [%]	$\zeta$ [mV]	$M_S$ [emu/g]	$Fe_3O_4^\ddagger$ [%]	$T_B$ [K]
0	1.000	5.06	100.0	+18.0	75.60	100	198.0
0.4	0.931	4.20	90.1	-31.6	61.70	81.6	182.6
1.0	0.763	3.83	78.2	-29.6	58.96	78.0	183.2
2.0	0.760	3.39	60.8	-31.8	51.10	67.6	180.7
3.0	0.585	3.18	50.8	-32.9	40.85	54.0	184.1
4.0	0.510	3.19	51.0	-35.2	41.66	55.1	185.8
5.0	0.528	3.08	45.6	-34.9	41.27	54.6	187.6

TEOS/MNPs [v/w] – vstupný pomer TEOS a magnetitu [mg/ml];  $Fe_3O_4^*$  – obsah  $Fe_3O_4$  (mg) v práškových  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  vzorkách stanovený UV-Vis spektroskopiou; Hustota častíc – objemová hmotnosť určená heliovým pyknometrom;  $Fe_3O_4^\dagger$  – obsah  $Fe_3O_4$  [%] vypočítaný z hustôt častíc;  $M_S$  – saturačná magnetizácia pri 300 K;  $Fe_3O_4^\ddagger$  – obsah  $Fe_3O_4$  [%] vo vzorkách vypočítaný z magnetických meraní;  $T_B$  – blokováca teplota určená z meraní FC-ZFC.

chu MNPs oxidom kremičitým. Hodnoty izoelektrického bodu (IEP) pripravených vzoriek boli získané z kriviek zeta potenciálu závislých od pH. IEP hodnoty vzoriek vo vzťahu k pomeru TEOS/MNPs sú zosumarizované v tab. 1. Vplyvom zvýšenia pomeru TEOS/MNPs z 0,06 na hodnotu 0,4 hodnota IEP klesla z 6,8 (neobalené MNPs) na ~1,3. Na obr.1. sú zobrazené TEM snímky neobalených (A) a  $\text{SiO}_2$  vrstvou obalených (B-D) MNPs, na ktorých vidieť nepravidelný tvar MNPs so strednou veľkosťou cca. 11 nm. Zvýšenie pomeru TEOS/MNPs viedlo k zvýšeniu hrúbky  $\text{SiO}_2$  obalu na povrchu MNPs od 1,2 nm do 4,3 nm. Z obrázkov vidieť, že  $\text{SiO}_2$  obal pokrýva zhluk MNPs a nie jednotlivé častice, najmä v prípade vzoriek  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  2,0 a  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  4,0. Toto zistenie bolo potvrdené aj magnetickými meraniami (vid' nižšie).

Magnetické vlastnosti neobalených MNPs a  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  boli charakterizované meraniami magnetizácie ako funkcie magnetického poľa a teploty. Ako je znázornené na obr. 2A, vzorky majú typické charakteristiky superparamagnetického správania s nedetegovateľnou koercitívou a remanenciou pri 300 K. Hodnoty saturačnej magnetizácie ( $M_S$ ) vybraných vzoriek získané z magnetizačných kriviek sú zahrnuté do tab. 1.  $M_S$  neobalených MNPs bola cca. 75,0 Am<sup>2</sup>/kg a v prípade  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$   $M_S$  klesala so zvyšujúcim sa pomerom TEOS/MNPs (obr. 2A). Tento pokles hodnoty  $M_S$  je spôsobený tým, že magnetizácia je úmerná hmotnosti magnetického materiálu v porovnaní s celkovou hmotnosťou  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$ , čo znamená, že čím je obal oxidu kremičitého hrubší, tým menšie množstvo magnetitu obsahuje vzorka s tou istou hmotnosťou. Zo závislosti  $M(T)$  boli získané informácie o blokovacej teplote ( $T_B$ ) a interakciách medzi časticami. Zníženie hodnoty  $T_B$  vzorky  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  0,4 na hodnotu 183 K v porovnaní s neobalenými MNPs ( $T_B = 198$  K) je spôsobené potlačením medzičasticových magnetických interakcií v dôsledku oba-





**Obz. 2:** Magnetické vlastnosti pre vybrané vzorky MNPs a  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  s rôznym pomerom  $\text{SiO}_2$  a  $Fe_3O_4$ . (B) Obsah  $\text{SiO}_2$  vo vzorkách  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  stanovený magnetickými a pyknometrickými meraniami.

lenia MNPs vrstvou  $\text{SiO}_2$ . So zvyšujúcim sa pomerom TEOS/MNPs sa hodnoty  $T_B$  takmer nemenili a kolísali okolo 184 K, čo naznačuje, že obalovanie častíc vrstvou  $\text{SiO}_2$  prebieha na povrchu aglomerovaných častíc a nie na povrchu jednotlivých nanočastíc. Hustota lyofilizovaných vzoriek bola meraná héliovým pyknometrom pri izbovej teplote. Hustota vzoriek  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  rýchlo klesala (z hodnoty cca. 4,9  $\text{g/cm}^3$  na 3,2  $\text{g/cm}^3$ ) so zvyšujúcou sa hodnotou vstupného pomeru TEOS/MNPs (0,06 - 3,0), čo potvrdzuje zvyšujúci sa obsah  $\text{SiO}_2$  vo vzorke. Hodnoty hustoty vzoriek s vyšším vstupným pomerom TEOS/MNPs (nad 3,0) klesali už omnoho pomalšie. Tieto hodnoty hustoty boli použité na výpočet obsahu  $\text{SiO}_2$  a  $Fe_3O_4$  vo vzorkách podľa rovnice uvedenej v práci [2] a výsledky pre vybrané vzorky sú znázornené na obr. 2B a v tab. 1. Takmer rovnaký obsah  $\text{SiO}_2$  a  $Fe_3O_4$  (49,2 % a 50,8 %) bol pozorovaný pri vstupnom pomere TEOS/MNPs 3,0 (ako aj pri vyšších pomeroch), čo môže byť spôsobené tvorbou čistých  $\text{SiO}_2$  nanočastíc pri nadbytku TEOS, ktoré boli odstránené magnetickou separáciou.

## Záver

V tejto práci bola pripravená séria vzoriek  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$ , ktoré boli charakterizované rôznymi metódami. Proces obalenia nanočastíc vrstvou  $\text{SiO}_2$  prebiehal hydrolyzou a polykondenzáciou TEOS a nukleáciou oxidu kremičitého na povrchu častíc. Synetizované obalené nanočastice boli pozorované elektrónovým mikroskopom, charakterizované meraním veľkosti častíc a zeta potenciálu. Okrem toho  $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$  vykazovali superparamagnetické správanie so symetrickou hysteréznou slučkou. Získané výsledky naznačujú, že veľkosť, zeta potenciál, a hrúbka obalu oxidu kremičitého môže byť kontrolovaná zmenou koncentrácie prekursora TEOS. Nanočastice obalené vrstvou  $\text{SiO}_2$  vykazujú nižšiu hodnotu izoelektrického bodu ako

neobalené MNPs, čo naznačuje tvorbu vrstvy oxidu kremičitého na povrchu MNPs. Na základe výsledkov bola vytypovaná užšia skupina vzoriek s rôznymi vlastnosťami pre štúdium vplyvu jednotlivých parametrov vzorky (veľkosť, náboj, zloženie, magnetický moment) na efektivitu separácie RNA.



POĎAKOVANIE Táto práca bola podporená z operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra pre projekt: "Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)", ITMS 2014 +:313011AUW7.

### Literatúra

- [1] Tang C., He Z., Liu H., Xu Y., Huang H., Yang G., Xiao Z., Li S., Liu H., Deng Y., Chen Z., Chen H. and He N., "Application of magnetic nanoparticles in nucleic acid detection", *Journal of Nanobiotechnology*, **18**(1), doi: 10.1186/s12951-020-00613-6.
- [2] Bednarikova Z., Kubovcikova M., Antal I., Antosova A., Gancar M., Kovac J., Sobotova R., Girman V., Fedunova D., Koneracka M., Gazova Z. and Zavisova V., "Silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, characterization and nucleic acid separation potential", *Surfaces and Interfaces*, **39**, (2023), 102942, doi: 10.1016/j.surfin.2023.102942.
- [3] Marczenko Z., *Spectrophotometric determination of elements*, E. Horwood ; Halsted Press, Chichester, Eng., New York (1976).

## Register autorov

- Almáši M., 99, 112, 121, 126  
Antal I., 32, 40, 104, 130, 144  
Antić B., 32  
Antošová A., 40, 93, 108, 144
- Barutiak M., 29, 40, 72, 89, 93  
Bednaríková Z., 144  
Bednarčík J., 63  
Bednáriková Z., 40, 108  
Beňová E., 29, 36, 45, 56, 68, 72, 81,  
93, 112, 121, 135, 139  
Bul'ková V., 50, 81
- Dolinská M.U., 135
- Fedunová D., 40, 108, 144
- Gančár M., 40, 108, 144  
Gažová Z., 40, 108, 144  
Girman V., 77, 144
- Hornebecq V., 99, 121  
Hrubovčák P., 29, 89, 93  
Huntošová V., 126
- Jacková A., 45, 56, 135, 139  
Jendželovská Z., 50  
Jendželovský R., 50, 81  
Juríková A., 32, 104, 130
- Khmara I., 104, 130, 144  
Király N., 68, 112  
Koneracká M., 32, 40, 104, 130, 144
- Kováč J., 144  
Kočíková B., 45, 56, 135, 139  
Košuth J., 45, 56, 135, 139  
Krstić I., 32  
Kubovčíková M., 32, 40, 104, 130, 144  
Kuraica M., 32
- Lisnichuk M., 93
- Matiašová A.A., 50, 81  
Mačák J., 45, 139  
Migasová A., 126  
Milanović Z., 32  
Mirković M., 32  
Molčan M., 130
- Nagy L., 29, 72, 89, 93
- Ognjanović M., 32
- Pavlová A., 56, 135  
Perić M., 32  
Pevná V., 126  
Princík D., 112, 116
- Sobotová R., 40  
Szücssová J., 29, 72, 89, 93
- Vargová J., 50, 81  
Vilček Š., 23, 45, 56, 135, 139  
Vranješ-Đurić S., 32
- Zauška L., 99, 121, 126  
Zavišová V., 104, 130, 144

Zeleňák V., 29, 36, 45, 56, 68, 72, 99,  
112, 116, 121, 135, 139

Zeleňáková A., 29, 36, 40, 45, 56, 68,  
72, 89, 93, 112, 135, 139

Závišová V., 32, 40, 72

Ševc J., 50, 81



**NANOVIR – Nanočastice pre riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19**

*Recenzovaný zborník príspevkov z vedeckej konferencie NANOVIR*

Editori: doc. RNDr. Adriana Zeleňáková, PhD.  
RNDr. Jozef Bednarčík, PhD.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika Košiciach  
Vydavateľstvo ŠAFÁRIKPRESS

Rok: 2023  
Vydanie: prvé  
Počet strán: 158  
Rozsah: 10 autorských hárkov (iba textová časť)  
Náklad: 50 ks

Dizajn zborníka, RNDr. Jozef Bednarčík, PhD.  
sadzba textu: RNDr. Ľuboš Nagy

ISBN 978-80-574-0232-9 (tlačená verzia)

ISBN 978-80-574-0233-6 (e-publikácia)