Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



Studium vlastností nanomateriálů pro biologické aplikace moderními mikroskopickými technikami

Mgr. Jana Jiravová

Školitel: doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková, Ph.D. Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP

Olomouc 2018

Prohlašuji, že jsem svoji disertační práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité zdroje literatury.

Olomouc, 2018

Mgr. Jana Jiravová

.....

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. Ing. Kateřině Bartoň Tománkové, Ph.D. za odborné vedení disertační práce, za cenné rady, připomínky a za veškerou pomoc během studia.

Také děkuji prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. za poskytnuté zázemí pro experimentální i teoretickou práci a celému kolektivu Ústavu lékařské biofyziky za vstřícný přístup při experimentální práci. Dále patří mé poděkování Mgr. Monice Perlovské Harvanové, Ph.D., Mgr. Šárce Hradilové, Ph.D., doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za všestrannou pomoc a ochotu při zpracování experimentální části a Mgr. Janě Zapletalové, Dr. za pomoc se statistickým vyhodnocením výsledků. Zvláštní poděkování patří Olze Hustákové a Mgr. Barboře Hošíkové za přípravu buněčných linií.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů: NPU I LO1304, IGA MZCR NT 14060-3/2013, IGA_LF_2018_001, LF_2015_008, LF_2014_003.

<u>Obsah</u>

Souhrn	7
Summary	8
Seznam zkratek a pojmů	9

1.	Úvod		11
	1.1. Historie		
	1.2. Původ nan	očástic	
	1.3. Definice na	nostruktur	
	1.4. Základní v	lastnosti nanostruktur	14
2	Přehled nanod	éástic	
	2.1. NP na báz	zi kovů	
	2.1.1. NP st	říbra (NP Ag)	
	2.1.1.1.	Využití NP Ag v prav	ii 16
	2.1.1.2.	Toxicita NP Ag	
	2.1.2. NP zl	ata (NP Au)	
	2.1.2.1.	Využití NP Au v pra	
	2.1.2.2.	Toxicita NP Ag	21
	2.1.3. Kvar	tové tečky (QD)	
	2.1.3.1.	Využití QD v praxi	
	2.1.3.2.	Toxicita QD	
	2.2. NP oxidů k	ovů	
	2.2.1. NP	oxidu titaničitého (NP	TiO ₂)24
	2.2.1.1.	Využití NP TiO ₂ v pr	axi24
	2.2.1.2.	Toxicita NP TiO ₂	
	2.2.2. Mag	netické NP	
	2.2.2.1.	Využití SPION v pra	xi25
	2.2.2.2.	Toxicita SPION	
	2.3. NP na bázi	uhlíku	
	2.3.1. Využ	ití uhlíkových NP v pra	xi28
	2.3.2. Toxic	cita uhlíkových NP	

	2.4. Polymerní NP	30
	2.4.1. Dendrimery	30
	2.4.1.1. Využití dendrimerů v praxi	31
	2.4.1.2. Toxicita dendrimerů	31
3.	Metody charakterizace NP	32
	3.1. Elektronová mikroskopie	32
	3.1.1. Transmisní a skenovací elektronová mikroskopie	33
	3.1.2. Aplikace TEM a SEM	34
	3.2. Mikroskopie atomárních sil (AFM)	34
	3.2.1. Operační režimy AFM	36
	3.2.2. Aplikace AFM	38
	3.3. Ramanova spektroskopie	38
	3.3.1. Aplikace Ramanovy spektroskopie	40
	3.4. Dynamický rozptyl světla (DLS)	41
	3.4.1. Aplikace DLS	43
	3.5. Atomová absopční spektrometrie (AAS)	44
	3.5.1. Aplikace AAS	45
4.	Studium buněčného poškození	45
4. 5.	Studium buněčného poškození Cíle práce	45 48
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce Materiál a metody	45 48 49
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce Materiál a metody 6.1. Materiál	45 48 49 49
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce Materiál a metody 6.1. Materiál 6.2. Přístroje	45 48 49 49 49
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál . 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice.	45 48 49 49 49 50
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál . 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS).	45 48 49 49 49 50 51
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál . 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS). 6.5. Příprava buněčných kultur.	45 49 49 49 50 51 51
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS). 6.5. Příprava buněčných kultur. 6.6. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie).	45 49 49 49 50 51 51 52
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS). 6.5. Příprava buněčných kultur. 6.6. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie). 6.7. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS).	45 48 49 49 50 51 51 52 52
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS). 6.5. Příprava buněčných kultur. 6.6. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie). 6.7. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS). 6.8. MTT test životnosti.	45 49 49 50 51 51 52 52 52
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS). 6.5. Příprava buněčných kultur. 6.6. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie). 6.7. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS). 6.8. MTT test životnosti. 6.9. Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS).	45 48 49 49 50 51 51 52 52 53 53
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS). 6.5. Příprava buněčných kultur. 6.6. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie). 6.7. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS). 6.8. MTT test životnosti. 6.9. Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). 6.10.	45 49 49 49 50 51 51 52 52 53 53
4. 5. 6.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS). 6.5. Příprava buněčných kultur. 6.6. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie). 6.7. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS). 6.8. MTT test životnosti. 6.9. Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). 6.10. Kometová analýza. 6.11. Detekce apoptózy a nekrózy.	45 49 49 49 50 51 51 52 52 53 53 53
 4. 5. 6. 	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS). 6.5. Příprava buněčných kultur. 6.6. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie). 6.7. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS). 6.8. MTT test životnosti. 6.9. Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). 6.10. Kometová analýza. 6.11. Detekce apoptózy a nekrózy. 6.12. Statistická analýza.	45 49 49 49 50 51 51 52 52 53 53 53 54 54
 4. 5. 6. 7.	Studium buněčného poškození. Cíle práce. Materiál a metody. 6.1. Materiál 6.2. Přístroje. 6.3. Použité nanočástice. 6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS). 6.5. Příprava buněčných kultur. 6.6. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie). 6.7. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS). 6.8. MTT test životnosti. 6.9. Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). 6.10. Kometová analýza. 6.11. Detekce apoptózy a nekrózy. 6.12. Statistická analýza.	45 48 49 49 50 51 51 52 52 53 53 53 54 54 54

	7.2. Detekce velikosti komerčních NP (DLS)	59
	7.3. Detekce velikosti syntetizovaných NP (DLS, TEM, UV-Vis)	60
	7.4. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie)	62
	7.5. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS)	66
	7.6. MTT test životnosti	67
	7.7. Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)	67
	7.8. Kometová analýza	73
	7.9. Detekce apoptózy a nekrózy	76
8.	Diskuze	79
9.	Závěr	83

Seznam použité literatury	
Publikační činnost autora	103

Souhrn

Nanočástice stříbra (NP Ag) a nanočástice oxidu titaničitého (NP TiO₂) jsou obecně nejčastěji aplikovanými nanomateriály. Komerčně vyráběné NP jsou již široce používány v produktech určených ke každodennímu použití, včetně výrobků pro děti. Je tedy důležité studovat jejich potenciální rizika. Mechanismus toxicity NP totiž není zatím zcela objasněn.

V rámci této disertační práce byly shrnuty výsledky studia komerčních NP TiO₂, komerčních NP Ag a NP Ag syntetizovaných na Katedře fyzikální chemie UP v Olomouci. Nejprve byly NP charakterizovány pomocí chemicko-fyzikálních metod. Následně byly provedeny *in vitro* studie buněčného poškození na nenádorových buněčných liniích BJ (lidské fibroblasty), NIH 3T3 (myší fibroblasty) a SVK 14 (lidské keratinocyty).

Na základě výsledků můžeme konstatovat, že údaje poskytnuté výrobci nejsou v souladu s provedeným měřením. Mimoto všechny studované NP penetrovaly do buněk a všechny NP měly významný vliv na kinetiku tvorby reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Nejvyšší hladiny ROS byly zaznamenány zejména po aplikaci NP TiO₂. S těmito výsledky korelovala i zvýšená míra fragmentace DNA a apoptózy. Oxidační poškození buněk hraje zřejmě u vzorků NP TiO₂ důležitou roli.

Z výsledků *in vitro* testů vyplývá, že toxicita NP Ag souvisí nejen s produkcí ROS a uvolňováním Ag⁺, ale pravděpodobně i s přímou interakcí NP Ag s DNA. Ramanovou spektroskopií byl potvrzen výskyt NP Ag v jádře buněk NIH 3T3, což vedlo ke zvýšenému poškození DNA a vyššímu počtu apoptotických buněk linie NIH 3T3.

Lokalizace intracelulární akumulace NP Ag však závisela na typu buněčné linie. Zatímco u buněčné linie NIH 3T3 byly detekovány syntetizované NP Ag především v jádře buněk, u buněčné linie SVK 14 byl potvrzen výskyt NP spíše v cytoplazmě. S lokalizací syntetizovaných NP Ag korespondovala míra buněčného poškození.

V disertační práci byly kromě konvenčních metod studia buněčného poškození představeny moderní mikroskopické a spektroskopické techniky, které jsou vhodné pro kvantitativní a kvalitativní vyhodnocení buněčné penetrace NP a jejich charakterizaci.

Summary

Silver nanoparticles (Ag NPs) and titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) are generally the most frequently applied nanomaterials. Commercially produced NPs are already widely used in products intended for everyday use, including products for children. It is therefore important to study their potential risks. The mechanism of toxicity of NPs is not yet completely elucidated.

In this dissertation the results of the study of commercial TiO_2 NPs, commercial Ag NPs and Ag NPs synthesized at the Department of Physical Chemistry, UP in Olomouc were summarized. At first, NPs were characterized by chemical-physical methods. Consequently *in vitro* cell damage study were performed on non-tumor cell lines BJ (human fibroblasts), NIH 3T3 (mouse fibroblasts) and SVK 14 (human keratinocytes).

Based on the results, we can conclude that the data provided by the manufacturers are not in accordance with the performed measurements. Furthermore, all studied NPs penetrated into the cells and all NPs had significant effect on the kinetics of reactive oxygen species (ROS) production. Highest levels of ROS were detected especially after application of TiO_2 NPs. These results correlated with increased DNA fragmentation and apoptosis. Oxidative damage to cells by NPs TiO_2 apparently plays an important role.

The results of *in vitro* tests show that the toxicity of Ag NPs is associated not only with ROS production and Ag⁺ release but probably also with the direct interaction of Ag NPs with DNA. Raman spectroscopy confirmed the occurrence of Ag NPs in the nucleus of NIH 3T3 cells, leading to increased DNA damage and increased number of apoptotic cells of NIH 3T3 line.

The location of intracellular accumulation of Ag NPs depended on the cell line type. Synthesized Ag NPs were detected in the nucleus of NIH 3T3 cells and in the cytoplasm of SVK 14 cells. With the location of the synthesized Ag NPs corresponded the degree of cellular damage.

In the dissertation work, in addition to conventional methods of studying cellular damage, modern microscopic and spectroscopic techniques have been introduced, which are suitable for quantitative and qualitative evaluation of cellular penetration of NP and their characterization.

Seznam zkratek a pojmů

- AAS atomová absopční spektrometrie (atomic absorption spektrometry)
- AFM mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy)
- ATP adenosintrifosfát
- BJ buněčná linie lidské fibroblasty
- CM -H2DCFDA 5,6-chloromethyl-2,7'-dichlorodihydrofluorescein
- 6-CFDA 6-karboxyfluorescein
- DLS dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
- DMEM kultivační médium (Dulbecco's modified Eagle medium)
- DMSO dimetylsulfoxid
- DNA deoxyribonukleová kyselina
- EDTA etylendiamintetraoctová kyselina
- FBS fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
- HIV virus lidské imunodeficience (human immunodeficiency virus)
- HMP s vysokým bodem tání (high melting point)
- IC50 střední inhibiční koncentrace (half inhibitory concentration)
- IR infračervené záření
- LMP s nízkým bodem tání (low melting point)
- MTT 3-(4,5 dimethylthiazol 2 yl) 2,5 difenyl tetrazolium bromid
- MWCNT vícevrstvé nanotrubice (multiwalled nanotube)
- NIH 3T3 buněčná linie myší fibroblasty
- NP nanočástice (nanoparticles)
- NP Ag nanočástice stříbra
- NP Au nanočástice zlata
- NP TiO₂ nanočástice oxidu titaničitého
- PBS solný fosfátový pufr (phosphate buffer saline)
- QD kvantové tečky (quantum dots)

RFU - relativní fluorescenční jednotka (relative fluorescence unit)

ROS - reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

RT - pokojová teplota (room temperature)

SEM - skenovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy)

SPION - superparamagnetické nanočástice oxidů železa (superparamagnetic iron oxide nanoparticles)

SVK 14 buněčná linie - lidské keratinocyty

SWCNT - jednovrstvé nanotrubice (single walled nanotube)

TEM - transmisní elektronová mikroskopie (transmission electron microscopy)

UV – ultrafialové záření

1. Úvod

V druhé polovině 19. století byl technologický pokrok lidstva založen na objevování nových sloučenin doposud známých prvků. Docházelo tedy k masové produkci nových materiálů. V současné době se většina výzkumu zaměřuje na studium nových vlastností již známých materiálů. Nejde jen o chemickou konfiguraci jednotlivých komponent, ale stále důležitější je rozměr a morfologie částic. Do popředí vědeckého zájmu se proto v poslední době dostávají nanočástice (NP) (Siegel *et al.*, 2014).

Chemické látky ve formě NP se často liší od jejich makroskopické formy svými vlastnostmi, díky kterým potom nalézají uplatnění v praxi. V současnosti roste produkce a využití nanočástic prakticky ve všech odvětvích lidské činnosti. Nanomateriály, přírodního nebo antropogenního původu, se tak postupně stávají běžnou součástí našeho života, s čímž souvisí nutnost provést důkladné studie zahrnující jejich zdravotní rizika (Bhatt *et* Tripathi, 2011; Dohnalová *et* Dohnal, 2015; Hoet *et al.*, 2004; Morose, 2010).

1.1 Historie

První zmínky o NP pocházejí z 5. nebo 4. století př. n. l. z Egypta a Číny. Tehdy bylo objeveno rozpustné zlato, které bylo používáno jak pro estetické (výroba rubínového skla, barvení keramiky), tak pro léčivé účely (srdeční a sexuální problémy, úplavice, epilepsie, nádory a diagnóza syfilis) (Řezanka *et al.*, 2007).

Snad nejznámějším dochovaným artefaktem dokazujícím znalost nanomateriálů jsou tzv. Lykúrgovy poháry, pocházející asi ze 4. století n. l., které se nacházejí v Britském muzeu v Londýně. Zvláštnost poháru spočívá v jeho neobvyklých barvách. Pohár vykazuje silný dichroismus, protože obsahuje stříbrné, zlaté a měděné NP, a to přibližně v poměru 26:12:1, které jsou rovnoměrně rozptýleny ve skleněné matrici. Je-li pozorován v odraženém světle, např. denním, je zelený. Je-li však zdroj světla umístěn dovnitř poháru, pohár je červený. V oblasti trupu krále Lykúrga přechází červená barva až ve fialový odstín (obr. 1). Za tyto barevné změny jsou zodpovědné kovové NP v uvedeném poměru. Červená barva je způsobena absorpcí NP zlata o velikosti cca 10 nm při vlnových délkách cca 520 nm. Fialové zbarvení je zapříčiněno většími NP zlata (cca 20–30 nm). Zelenou barvu způsobuje rozptyl světla stříbrných NP o velikosti větších než 40 nm (Barber *et* Freestone, 1990; Siegel *et al.*, 2014).



Obr.1. Lykúrgovy poháry (vlevo pohár v odraženém denním světle, vpravo je zdroj světla umístěn uvnitř poháru) (https://britishmuseum.tumblr.com/post/120689869617/the-lycurgus-cup)

Moderní éra syntetizovaných NP začala v roce 1857 prací Michaela Faradaye, který oznámil získání koloidního zlata redukcí vodného roztoku tetrachlorozlatitanu. Termín koloid (z francouzského colle) byl vytvořen Thomasem Grahamem v roce 1861. V tomto období byly také připraveny další koloidní kovy (Edwards *et* Thomas, 2007; Řezníka *et al.*, 2007; Řezníčková *et al.*, 2014).

Syntetizované koloidy byly dále studovány díky jejich unikátním vlastnostem. Například koloidní stříbro mohlo být díky svým antibakteriálním vlastnostem využíváno v medicíně. Antibakteriální vlastnosti stříbra byly sice známy již od starověku, avšak ve formě koloidu byl tento účinek mnohem vyšší. S nástupem antibiotik bylo používání koloidního stříbra omezeno (Prabhu *et* Poulose, 2012).

K výraznému pokroku v oblasti výzkumu koloidů došlo až ve druhé polovině 20. století s rozvojem nových experimentálních metod. O pár desítek let později došlo k dalšímu významnému pokroku s rozvojem nanotechnologií. V současné době zájem o nanomateriály a jejich studium stále prudce roste (Kvítek, 2006).

1.2 Původ nanočástic

Nanočástice mohou vznikat vlivem přírodních procesů nebo jako důsledek řízené či neřízené lidské činnosti. Přírodní NP jsou velmi rozmanité. Vznikají sopečnou činností, jsou přítomny v prachu i jemném mořském aerosolu, písku a půdních koloidech. Mezi přírodní NP se řadí také viry, DNA, proteiny, pyl, apod. NP produkované řízenou lidskou činností jsou mnohem lépe definované a více uniformní. Oproti tomu antropogenní NP, vznikající náhodným procesem, jsou ve své struktuře i velikosti velmi variabilní. Nejběžnějšími nekontrolovanými procesy vzniku NP jsou spalování v dieselových motorech, důlní činnost, svařování, apod. Významným zdrojem antropogenních NP je také automobilová doprava. NP jsou generovány nejen rozkladem větších částic, ale též nukleačními, koagulačními či kondenzačními procesy prakticky od atomární úrovně (Buzea *et al.*, 2007; Dohnalová *et* Dohnal, 2015; Monica *et* Cremonini, 2009; Sadik, 2013).

1.3 Definice nanostruktur

Za nanostruktury lze obecně považovat ty materiály, které mají alespoň jeden ze tří rozměrů menší než 100 nm (patří sem tedy i velmi tenké vrstvy, nanovlákna, nanotrubice atd.). Nanomateriály, které mají všechny tři rozměry menší než 100 nm, se nazývají nanočástice (Grillo *et al.*, 2015; Lövestam *et al.*, 2010; Nováková *et al.*, 2009). Zatím neexistuje jednotná všeobecně uznávaná definice nanomateriálu či nanočástic (Dohnalová *et* Dohnal, 2015).

Nanostruktury můžeme dále rozdělit dle počtu jejich dimenzí, které nespadají do rozměrového rozmezí 1–100 nm. Mohou existovat tedy NP (i) "bezrozměrné" (0D), kam řadíme hlavně sférické izolované NP, ale také NP jiných, mnohdy i komplikovaných tvarů (dendrity, disky, klece, duté koule), nebo kvantové tečky, (ii) jednorozměrné (1D) nanomateriály (nanopásky, nanodrátky, nanotrubičky, nanopilíře) a (iii) dvourozměrné (2D) nanoobjekty, kam patří tenké filmy nebo povlaky (Siegel *et al.*, 2014; Švorčík *et al.*, 2011).

Takto rozdělené nanomateriály můžeme dále definovat podle jejich chemických a fyzikálních vlastností, jako jsou chemická struktura, morfologie nebo krystalová symetrie, které mají vliv na jejich chování při interakci s okolím (Siegel *et al.*, 2014).

1.4 Základní vlastnosti nanostruktur

Nanomateriály vykazují řadu vlastností kvantitativně i kvalitativně odlišných od materiálů s charakteristickými rozměry nad 1 mikrometr. V mnoha případech se od objemových materiálů liší svojí strukturou jak na atomární úrovni (v důsledku povrchových efektů jsou stabilní jiné strukturní modifikace), tak i z hlediska formálně makroskopického (rozdílná hustota nano- a objemových materiálů). Jedním ze základních důvodů je vzrůstající podíl povrchových atomů se zmenšujícími se rozměry objektu (Mayoral *et al.*, 2009; Řezníčková *et al.*, 2014).

Atomy na povrchu nanostruktur mají pouze omezený počet sousedících atomů, což způsobuje jejich neúplnou koordinaci. Nevysycenost vazeb poslední atomové monovrstvy a neúplná koordinace zapříčiňuje nestabilitu těchto vnějších atomů vůči atomům uvnitř materiálu. Čím je menší NP nebo klastr, který tvoří nesouvislou deponovanou vrstvu (typicky 1–10 nm), tím je větší podíl atomů na povrchu NP vůči atomům uvnitř nanoobjektu a tím větší je i průměrná vazebná energie na atom (Siegel *et al.,* 2014). To má zásadní vliv hlavně na vazebné energie těchto atomů, ale také na jejich prostorové uspořádání. Liší se meziatomové vzdálenosti ve směru kolmém na povrch a v rovině povrchu (relaxace a rekonstrukce povrchu vede ke snížení povrchové energie). Zakřivený povrch nanočástic a nanovláken dále ovlivňuje strukturu těchto objektů v důsledku Youngova- Laplaceova efektu. Tlak indukovaný povrchovým napětím na konkávní straně rozhraní vede ke kontrakci meziatomových vzdáleností (Mayoral *et al.,* 2009; Řezníčková et al., 2014). Tyto jevy, mimo jiné, mohou způsobit změny některých fyzikálních vlastností, jako jsou teplota tání, teploty fázových přeměn nebo hustota (Siegel *et al.,* 2014).

2. Přehled nanočástic

NP produkované řízenou lidskou činností lze rozdělit dle použitého materiálu do čtyř základních skupin (i) materiály na bázi kovu jako jsou NP stříbra, zlata, zinku, hliníku, kvantové tečky, NP oxidů kovů jako TiO₂, ZnO, Al₂O₃ a NP sulfidů jako je CdS, (ii) materiály na bázi uhlíku, obvykle ve formě fullerenů, jednovrstevných (SWCNT) nebo vícevrstevných (MWCNT) nanotrubic, (iii) polymerní NP – dendrimery, kopolymery, (iv) kompozity, které kombinují NP s jinými materiály (Monica *et* Cremonini, 2009).

2.1. NP na bázi kovů

Koloidní roztoky NP kovů mohou být připraveny mechanickým dělením kovových agregátů (fyzikální metoda "top-down") nebo nukleací a růstem zárodku (chemická metoda "bottom-up").

Metoda "top-down" je založena na broušení kovových materiálů a následné stabilizaci výsledných kovových nanočástic přidáním koloidních stabilizačních činidel. Dalším možným postupem přípravy kovových nanočástic je depozice z par. Lze připravit široké spektrum koloidních roztoků kovových nanočástic (např. Ag, Au, Pt), ale pouze v laboratorních podmínkách. Tento postup přípravy je omezen parametry přístroje a neumožňuje získat úzkou distribuci velikostí částic. Fyzikální metody vedou většinou k částicím, které nejsou reprodukovatelně připravitelné (Řezanka *et al.*, 2007; Řezníčková *et al.*, 2014).

Metoda "bottom-up" je založena na mokrém způsobu chemické přípravy nanočástic. Mezi tyto postupy patří redukce kovových solí, elektrochemické postupy nebo kontrolovaný rozklad organometalických sloučenin. Částice opět musí být stabilizovány (Řezníčková et al., 2014). Ke kontrole růstu NP a k jejich ochraně před agregací je používáno velké množství stabilizátorů např. donorové ligandy nebo polymery (Řezanka *et al.*, 2007).

Syntéza nanočástic je tedy nejčastěji uskutečňována pomocí rutinních chemických a fyzikálních metod. Nicméně tyto metody jsou energeticky velmi náročné a neobejdou se bez použití toxických chemikálií. Proto v posledních letech vzrostl zájem o mikrobiální syntézu a fytosyntézu. O mikroorganizmech jako jsou bakterie, houby, aktinomycety, kvasinky a viry je známo, že mají přirozený potenciál produkovat kovové nanočástice buď intra, nebo extracelulárně, a jsou tedy považovány za potenciální zdroj nanočástic. Naproti tomu fytosyntéza využívá celou rostlinu k syntéze kovových nanočástic. Díky použití technik kultivace rostlinných pletiv, jejich optimalizaci a následnému zpracování je možné syntetizovat nanočástice kovů v průmyslovém měřítku (Harris *et* Bali, 2008; Jain *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2009; Žůrek *et al.*, 2014).

2.1.1. NP stříbra (NP Ag)

2.1.1.1. Využití NP Ag v praxi

Stříbro patří mezi ušlechtilé kovy. Díky svým antimikrobiálním účinkům je používané již od starověku. K uchovávání potravin sloužily nádoby ze stříbra a používání stříbrných příborů mělo napomoci k prevenci různých onemocnění. V 15. století si šlechta přidávala mleté stříbro dokonce přímo do jídla. U významných šlechtických rodů se často projevilo modro-šedé zbarvení kůže, odtud pochází označení "modrá krev". S objevem antibiotik aplikace stříbra ustoupila. V současné době dochází ke znovuobjevení stříbra pro medicínské i průmyslové použití (Alexander, 2009; Večeřová, 2016).

NP Ag jsou dnes široce používány v produktech ke každodennímu použití, jako jsou textilie, obuv, matrace, hračky, zubní pasty, kosmetika, čisticí prostředky pro domácnost, čističe vzduchu, potravinové obaly a nátěry ledniček. Obecně můžeme najít NP Ag všude tam, kde je vyžadován antibakteriální účinek. Proto materiály na bázi NP Ag jsou používány v lékařské praxi. Příkladem jsou lokální přípravky k ošetření ran a popálenin (náplasti, obvazový materiál), povrchová úprava zdravotnických nástrojů jako jsou katetry nebo dentální materiály (Cleveland *et al.*, 2012; Marambio-Jones *et* Hoek; 2010; Prabhu *et* Poulose, 2012; Tománková *et al.*, 2015; Večeřová, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

2.1.1.2. Toxicita NP Ag

Možné uvolňování NP Ag představuje jednu z nejčastěji diskutovaných toxikologických hrozeb. Uvolňované NP Ag mohou pronikat skrz kůži nebo membránami gastroinstestinálního traktu a plic (Fröhlich *et* Roblegg, 2012). Po průniku do organismu NP Ag mohou systematicky cirkulovat a migrovat do orgánů, jako jsou játra, slezina, plíce, ledviny nebo mozek. Singh a Ramarao (2012) zjistili, že k intracelulárnímu rozpouštění NP Ag dochází asi 50 krát rychleji než ve vodě (Singh *et* Ramarao 2012).

Mechanismus pronikání NP Ag do buněk závisí na typu buněk, velikosti, tvaru a povrchové úpravě NP. Může docházet k nespecifickému pasivnímu průniku do buněk. Pro fagocyty včetně makrofágů a monocytů je hlavním mechanismem rozsáhlá

fagocytóza shluků NP Ag. U nefagocytických eukaryotických buněk mohou být NP Ag přijaty prostřednictvím makropinocytózy nebo dalšími endocytickými cestami, včetně endocytózy závislé na klatrinu nebo kaveolinu. Navíc může docházet ke kombinaci různých endocytických cest (obr. 2) (Wang *et al.*, 2015).



Obr. 2 Mechanismus pronikání NP stříbra do buněk (*Wang et al., 2015*)

Antibakteriální a antimykotické účinky NP Ag byly popsány v mnoha studiích (Damm *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Neal, 2008; Marambio-Jones *et* Hoek; 2010; Panáček *et al.*; 2009; Panáček *et al.*, 2015; Panáček *et al.*; 2016; Večeřová, 2016). Nicméně jejich mechanismus působení není zatím zcela znám. Marambio-Jones *et* Hoek, (2010) uvádí tři nejběžnější mechanismy interakce NP Ag s bakteriální buňkou (i) uvolňování volných stříbrných iontů, následné narušení tvorby ATP a replikace DNA, (ii) tvorba reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) působením NP Ag nebo stříbrnými ionty, (iii) přímé poškození buněčných membrán NP Ag (obr. 3) (Damm *et al.*, 2008; Neal, 2008; Marambio-Jones *et* Hoek, 2010).



Obr. 3 Interakce NP stříbra s bakteriální buňkou (Marambio-Jones et Hoek, 2010)

Další *in vitro* studie se zabývají vlivem NP Ag na eukaryotní buňky, kde jedním ze základních mechanismů odpovědných za toxicitu je také produkce ROS. Přítomnost NP Ag v cytosolu může narušit funkci mitochondrií tím, že indukuje mechanické poškození a blokuje transport elektronů v mitochondriálním respiračním řetězci, což vede ke zvýšené produkci ROS. Ag také může nahradit ionty železa bílkovin a následně indukovat Fentonovy reakce pro generování ROS. Navíc se Ag může vázat na klíčový antioxidant glutathion (GSH) a zvyšovat tak hladinu ROS. Jakmile produkce ROS překročí úroveň, kterou mohou neutralizovat antioxidanty, bude následovat zánětlivá odpověď a buněčná smrt související s mitochondriemi. K buněčné smrti vyvolané přebytkem ROS může docházet různými mechanismy, jako jsou (i) lipidová peroxidace a zvýšení propustnosti membrány, (ii) aktivace signalizačních kaskád zahrnujících mitochondriální dráhu, (iii) abnormality autofagie (iv) poškození DNA a zastavení růstu buněk (obr. 4) (Wang *et al.*, 2015).

Přestože produkce ROS je obecně považována za hlavní příčinu toxicity NP Ag, existují i další mechanismy poškození nezávislé na produkci ROS. NP Ag, které jsou menší než 100 nanometrů, jsou schopny proniknout do buněk a přímo nebo nepřímo se

vázat na makromolekuly včetně proteinů a DNA (Dobrzynska *et al.*, 2014), což vede ke změnám integrity DNA nebo k ovlivnění její syntézy. Tyto poruchy mohou způsobovat poškození DNA nebo inhibovat buněčné procesy, které mohou vést k tvorbě mutantních nebo tumorigenních buněk (Asare *et al.*, 2012; Asharani *et al.*, 2009a; Chairuangkitti *et al.*, 2013).



Obr. 4 Interakce NP Ag s eukaryotní buňkou (*Wang et al., 2015*)

Pro snížení toxicity u vyšších organismů lze použít navázané NP Ag na vhodný nosič. Tím by docházelo k jejich cílené aplikaci a vyloučení z organizmu. Další možnost je využít synergického působení NP Ag s antibiotiky, kdy i velmi nízké koncentrace NP Ag působí antimikrobiálně. Tyto nízké koncentrace působící společně s antibiotiky vyvolávají dostatečný účinek a zároveň nepůsobí toxicky na eukaryotní organizmy. Synergický účinek antibiotik a NP stříbra na multirezistentní bakterie může mít významný potenciál pro využití. Je však třeba důkladně objasnit mechanismus této synergie a provést toxikologické studie těchto kombinací (Fayaz *et al.*, 2010; Panáček *et al.*, 2015; Panáček *et al.*, 2016; Večeřová, 2016).

Nicméně použití NP Ag má určitá omezení. Vzhledem k širokému použití NP Ag se očekává jejich uvolňování do atmosféry, pedosféry a povrchových vod, kde pravděpodobně interagují s živými organismy. I když čističky odpadních vod jsou schopné odstranit většinu mikropředmětů z přitékající odpadní vody, částice o průměru až desítek nanometrů nemohou být zcela eliminovány (Weir *et al.*, 2012).

2.1.2. NP zlata (NP Au)

2.1.2.1. Využití NP Au v praxi

NP Au jsou dlouho dobu široce využívány pro katalýzu, bioanalýzu a v zobrazovacích technikách. Výhodou NP Au je jejich inertnost, zanedbatelná toxicita, biokompatibilita a snadnost přípravy (Svoboda *et al.*, 2016). V současné době jsou tyto materiály reprodukovatelně syntetizovatelné a modifikovatelné zdánlivě neomezeným počtem chemických funkčních skupin (Giljohann *et al.*, 2010).

V posledních letech jsou NP Au široce využívány pro biomedicínské aplikace k cílené distribuci léčiv, k transfekci genů a k zobrazování molekul. Díky optickým vlastnostem lze NP Au použít k značení, zobrazování a snímání vedoucí jak k diagnostice, tak i k léčbě. NP Au mohou přispět k léčení nádorů použitím fototermální terapie. Díky molekulárním próbám na povrchu NP Au lze zajistit, že se budou selektivně vázat na nádorové buňky. Následným ozáření (laserem nebo mikrovlným zářením) dojde k fototermálnímu efektu, který vede k destrukci nádorových buněk (Boisselier *et* Astruc, 2009).

Existuje již mnoho příkladů vysoce citlivých a selektivních diagnostických metod na bázi nanokonjugátů zlata (Giljohann *et al.*, 2010). NP Au jsou vhodné i pro výrobu elektrokatalytických biosenzorů, které umožňují klinickou diagnostiku rakoviny, Alzheimerovy choroby, HIV, hepatitidy B, tuberkulózy, diabetu a artritidy (Boisselier *et* Astruc, 2009).

2.1.2.2. Toxicita NP Au

NP Au obvykle vykazují spíše malou toxicitu. Mnoho studií cytotoxicity vykazuje dokonce negativní výsledky cytotoxicity. Je však třeba rozlišovat mezi toxicitou jádra NP Au a ligandy. Kationtové ligandy NP Au jasně způsobují mírnou toxicitu a určitá toxicita může být také specifická pro jiné typy ligandů. Před každým konkrétním případem by tedy měla být provedena systematická studie toxicity (Boisselier *et* Astruc, 2009).

2.1.3. Kvantové tečky (QD)

QD jsou nanokrystaly polovodivého charakteru, jejichž velikost je několik nanometrů. Mohou se vyskytovat samostatně, nebo tvořit klastry (obr. 5). Nejčastěji jsou však uspořádány tak, že jeden typ polovodiče tvoří jádro QD (tzv. core) a několik vrstev atomů druhého typu polovodiče vytváří obal tohoto jádra (tzv. shell). Takto uspořádané QD nesou označení "core/shell" struktury (Hlaváček *et* Skládal, 2011; Reiss *et al.*, 2009).



Obr. 5 Struktura QD (A) QD tvořená jedním typem polovodiče, (B) QD tvořená dvěma typy polovodičů, (C) QD obalená vnějším obalem umožňujícím solvataci ve vodném

roztoku a nesoucím reaktivní skupiny R, které jsou důležité pro biokonjugaci, (D) polymerní částice, která obsahuje několik QD s reaktivními skupinami R na povrchu. *(Hlaváček et Skládal, 2011)*

2.1.3.1. Využití QD v praxi

QD se uplatňují v biologických a bioanalytických oborech stejným způsobem jako dlouho známé organické fluorofory. Některé chemické a fyzikální vlastnosti QD jsou však zcela specifické, což umožňuje vyvíjet nové analytické metody pro detekci virů, bakterií, nukleotidových sekvencí, iontů, proteinů a jiných analytů. Významné uplatnění nachází QD hlavně ve fluorescenční mikroskopii pro zobrazování specificky zvýrazněných biologických struktur (Hlaváček *et* Skládal, 2011; Hermanson, 2013).

Použitelnost současných fluoroforů, jako jsou organická barviva, fluorescenční bílkoviny a lanthanoidové cheláty, je dána šířkou excitačního a emisního spektra, fotostabilitou a dobu rozpadu. Obvyklá barviva vyžadují excitaci světla specifické vlnové délky, která se liší mezi jednotlivými barvivy. QD mají široké absorpční spektrum umožňující excitaci širokým rozmezím vlnových délek, což je vlastnost, která může být využita k současnému excitování více různě barevných QD s použitím jedné vlnové délky (obr. 6) (Chan et al., 2002; Jamieson et al., 2007). Konvenční barviva mají také široké emisní spektrum, což znamená, že spektra různých barviv se mohou do značné míry překrývat. Tím se omezuje počet fluorescenčních sond, které mohou být použity k označování různých biologických molekul současně. Naproti tomu QD mají úzké emisní spektrum. Mohou být navrženy tak, aby vyzařovaly světlo v různých přesných vlnových délkách od ultrafialového (UV) až po infračervené (IR). Díky úzkému emisnímu a širokému absorpčnímu spektru jsou QD vhodné pro multiplexní zobrazování, v nichž jsou kombinovány různé barvy a intenzity pro kódování genů, proteinů a malých molekul. Také díky jejich fotostabilitě lze sledovat dlouhodobé interakce vícenásobně značených biologických molekul v buňkách (Han et al., 2001; Jamieson et al., 2007).



Obr. 6 Srovnání absorpčních a emisních spekter rhodaminu 6G (červená) a CdSe QD (černá). Emisní spektrum QD je téměř symetrické a mnohem užší, zatímco jeho excitační profil je široký a spojitý. QD mohou být efektivně excitovány při jakékoliv vlnové délce kratší než ~ 530 nm. Naproti tomu organické barvivo rhodamin 6G má široký a asymetrický emisní profil a je excitován pouze v úzkém rozsahu vlnových délek. Pozn.: au - arbitrální jednotka.

(Chan et al., 2002)

2.1.3.2. Toxicita QD

Míra cytotoxicity QD závisí na řadě faktorů, včetně velikosti, složení a povrchové úpravy QD (Jamieson *et al.*, 2007). Mezi nejpoužívanější nanokrystaly patří CdSe a CdSe/ZnS nebo CdTe a CdTe/CdS. Pro biologické aplikace jsou nyní vyvíjeny QD, které tvoří méně toxické materiály, jako může být InP nebo ZnS (Hlaváček *et* Skládal, 2011). Předpokládá se, že za cytotoxicitu je zodpovědných několik základních mechanismů, mezi které patří desorpce volných kovů (degradace jádra QD), tvorba volných radikálů a interakce QD s intracelulárními komponenty (Derfus *et al.*, 2004; Jamieson *et al.*, 2007).

2.2. NP oxidů kovů

2.2.1. NP oxidu titaničitého (NP TiO₂)

TiO₂ neboli titanová běloba je jedním z nejpoužívanějších nanomateriálů. Ročně se ho na celém světě vyrobí kolem 4 milionů tun. Toto bílé barvivo je hydrofobní, pohlcuje UV záření, vyznačuje se vysokým jasem, indexem lomu i barevnou stálostí. (Shi *et al.*, 2013).

2.2.1.1. Využití NP TiO₂ v praxi

TiO₂ nachází uplatnění v celé řadě výrobků a průmyslových odvětví. Používá se jako bílý pigment v potravinářství (zejména pro žvýkačky a cukrovinky nebo k bělení odstředěného mléka), přidává se do kancelářských potřeb (papír, propisky), najdeme ho i v kosmetice (například v zubních pastách, UV opalovacích krémech, šamponech, deodorantech či holicích pěnách), lécích, nátěrových hmotách, glazurách či smaltech (Shi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2003).

2.2.1.2. Toxicita NP TiO_2

Jemné částice TiO₂ (> 100 nm) jsou obecně považovány za bezpečné a relativně neškodné pro člověka. Dostupné údaje v literatuře však naznačují, že TiO₂ ve formě NP

je toxičtější než jemné částice a může vyvolat nežádoucí účinky. Ve většině studií byly prokázány cytotoxické nebo genotoxické účinky NP TiO₂. (Iavicoli *et al.*, 2011).

NP TiO₂ mohou nejčastěji pronikat do lidského organismu skrz plíce. Plicní zánět, fibróza, poškození plic nebo dokonce rakovina plic patří tedy mezi nejdůležitější nežádoucí účinky NP TiO₂. NP TiO₂ mohou být také absorbovány do gastroinstestinálního traktu a poté distribuovány do různých orgánů jako jsou játra, ledviny, slezina nebo dokonce mozek. (Shi *et al.*, 2013). Průnik nanočástic do vrchních vrstev pokožky je vzhledem k jejich velikosti teoreticky možný, nicméně bylo opakovaně prokázáno, že reálně k tomu nedochází. NP TiO₂ deponovány na nejzevnějším povrchu rohovité vrstvy nebyly objeveny v hlubší vrstvě stratum corneum, epidermis ani dermis (Miletín, 2011).

V *in vitro* studiích prováděných na savčích buňkách docházelo po aplikaci TiO_2 ke zvýšení produkce ROS, hladiny cytokinů, snížení životaschopnosti, proliferace buněk, indukci apoptózy a genotoxicity (Iavicoli *et al.*, 2011).

Díky širokému využití NP TiO₂ může docházet k uvolňování do životního prostředí, což značí potenciální zdravotní riziko nejen pro člověka, hospodářská zvířat, ale i pro celý ekosystém (Shi *et al.*, 2013).

2.2.2. Magnetické NP

Magnetické NP obsahují některý z magnetických prvků jako je železo, kobalt, nikl nebo jejich chemické sloučeniny, např. feromagnetické spinely MgFe₂O₄, MnFe₂O₄ a CoFe₂O₄, nebo slitiny CoPt₃ a FePt. Nejčastěji používané jsou však oxidy železa, a to zejména magnetit Fe₂O₄, maghemit γ -Fe₂O₃ a hematit α - Fe₂O₃. Společným názvem se tyto nanočástice označují jako superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPION). Jejich velkou výhodou je snadná příprava, nízké náklady na zhotovení, vysoká chemická stabilita a unikátní elektrické, optické, tepelné a magnetické vlastnosti (Indira *et* Lakshmi, 2010; Kučírková *et al.*, 2015).

2.2.2.1. Využití SPION v praxi

Magnetické vlastnosti SPION poskytují, vzhledem k jejich snadné manipulovatelnosti po aplikaci vnějšího magnetického pole, nové možnosti jejich využití. SPION tak nacházejí řadu uplatnění v mnoha odvětvích medicíny, jako např. v nanochirurgii, kde se využívají jako "ohřívače" ke zničení maligních buněk vlivem lokálně zvýšené teploty, jako nanovektory k cílenému transportu léků, nebo jako kontrastní látky při magnetické rezonanci (Kučírková *et al.*, 2015).

Pro zajištění stability SPION během *in vivo* použití musí být tyto částice funkcionalizovány. Funkcionalizace je nutná k prevenci agregace, k zajištění biokompatibility a netoxicity SPION používaných v biomedicíně. Obal nanočástic neslouží pouze pro ochranu magnetického jádra, ale může být také dále použit pro sekundární navázání funkčních bioaktivních molekul, jako např. nukleových kyselin, proteinů, peptidů, fosfolipidů, enzymů, polysacharidů, fluorochromů (obr. 7) (Gupta *et* Gupta, 2005; Qian *et al.*, 2002).



Obr. 7 Možnosti povrchové modifikace SPION. (Kučírková et al., 2015)

2.2.2.2. Toxicita SPION

Se vzrůstajícím používáním SPION nabývají na významu také otázky týkající se toxicity. SPION mohou být do organismu vpravovány různými cestami, od inhalace, přes perorální podání, až po injekční aplikaci. Cesta podání, náboj, chemické složení, povrchové vlastnosti a velikost SPION mají vliv na biologický poločas a distribuci SPION do jednotlivých tkání a orgánů (Oberdörster *et al.*, 2005). Biodistribuce SPION

je typicky soustředěna do několika orgánů: 80–90 % v játrech, 5–8 % ve slezině a 1–2 % v kostní dřeni (Duguet *et al.*, 2006).

Většina *in vivo* studií se shoduje v tom, že SPION jsou netoxické, biokompatibilní, a tudíž použitelné v biomedicínských aplikacích. SPION mohou přetrvávat v těle bez toho, aniž by působily na organismus toxicky. Jedná se však o *in vivo* studie, které byly provedeny u SPION odhalující mezní nebo žádnou toxicitu již v *in vitro* testech (Jain *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Kučírková *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2008).

2.3. NP na bázi uhlíku

Mezi uhlíkové NP lze zařadit fullereny (0D), uhlíkové nanotrubice (1D) a grafen (2D). Jednotlivé uhlíkové NP se liší nejen svou strukturou, ale hlavně svými jedinečnými elektrickými, mechanickými, optickými, chemickými a dalšími vlastnostmi, které je předurčují k použití ve speciálních aplikacích (Prášek, 2011).

Struktura grafenu představuje jednu vrstvu grafitu a tvoří základní stavební prvek některých uhlíkových alotropů jako je grafit, uhlíkové nanotrubice a fullereny (obr. 8). Základem fullerenů je jedna vrstva grafenu, která vytváří uzavřený tvar (nejčastěji kouli nebo elipsoid). Nanotrubice mohou být konstruovány ve dvou základních formách. Jednovrstvé (single walled nanotube – SWCNT) se skládají z jedné grafenové nanotrubice. Vícevrstvé (multiwalled nanotube – MWCNT) jsou složeny z několika soustředěných grafenových nanotrubic vložených do sebe (Prášek, 2011; Sanchez *et al.*, 2012).



Obr. 8 Uhlíkové alotropy odvozené od grafenu. (*Kim et al.*, 2010)

2.3.1. Využití uhlíkových NP v praxi

Grafen nachází uplatnění jak v elektronice, tak i v oblasti bioaplikací. Díky své 2D struktuře může být využíván jako biosenzor. Dále je vhodný pro zobrazování biomolekul, cílený transport léčiv pro terapii nádorových onemocnění nebo levné sekvenování DNA. Pro většinu aplikací je potřeba grafen funkcionalizovat, aby byl biokompaktibilní. Přímá funkcionalizace naráží na nízkou ochotu grafenu reagovat, a proto se pro funkcionalizace hojně využívá grafen oxid (Shen *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2008). Zvláštní pozornost si zaslouží také výzkum materiálů na bázi grafenu a grafen oxidu v oblasti buněčných kultur. Studie dosud prokázaly, že grafen a grafen oxid jsou schopny urychlit růst, diferenciaci a proliferaci kmenových buněk, a proto mají velký potenciál v oblasti tkáňového inženýrství, regenerační medicíny a dalších biomedicínských oborech (Shen *et al.*, 2012).

Fullereny mají také uplatnění v oblasti medicíny. Velmi dobře reagují s volnými radikály, jsou tedy dobrými antioxidanty. Jsou schopny pohltit 20 i více volných

radikálů na jeden fulleren, čímž až stokrát převyšují běžně používané antioxidanty. Zkoumají se tady možnosti využití fullerenů například pro léčbu Alzheimerovy choroby, amyotrofické laterální sklerózy, Parkinsonovy choroby, ale také jako potencionální inhibitor HIV proteázy (Bosi *et al.*, 2003; Prášek, 2011).

Praktické využití nanotrubic je obvykle dáno jejich strukturou (počet stěn, průměr, délka, chirální úhel), která jim dává specifické vlastnosti. Velmi slibnou aplikací nanotrubic je oblast medicíny. Na jejich povrch lze totiž snadno navázat další molekuly například v podobě léčiv a ty pak cíleně transportovat k rakovinným buňkám. Díky své schopnosti pronikat membránami by mohly sloužit i jako nanojehly pro vpravování QD a proteinů do rakovinných buněk (Kam *et al.*, 2005). Nanotrubice se mohou uplatnit i v oblasti mikroskopie atomárních sil (AFM) v podobě nanohrotů. Představují zde možnost, jak minimalizovat velikost hrotu do řádu nanometrů a tak zlepšit rozlišení AFM mikroskopů (Hafner *et al.*, 2001). Dále mohou být nanotrubice využívány jako sensory při detekci plynů, biologických molekul, toxických látek nebo výbušnin. Je zde využíváno schopnosti molekul z okolního prostředí dobře se vázat na atomy uhlíku, což má za následek výraznou změnu vodivosti nanotrubic (Tang *et al.*, 2017).

2.3.2. Toxicita uhlíkových NP

Vzhledem k velikosti NP, které díky svým rozměrům mohou pronikat do tkání, se stále více hovoří o možné toxicitě uhlíkových NP. Zatímco jsou fullereny dobrými antioxidanty, nanotrubice vykazují známky toxicity. *In vivo* experimenty prováděné převážně na zvířecím modelu myši prokázaly plicní toxicitu zahrnující zánět, fibrózu i rakovinu plic. Po intravenózním podávání byl zaznamenán embryolethální a teratogenní účinek nanotrubic. Nicméně toxicita nanotrubic lze do značné míry ovlivnit jejich délkou. Kratší nanotrubice vykazují menší toxicitu (Kobayashi *et al.*, 2017; Muller *et al.*, 2005).

U grafenu se očekává podobně jako u uhlíkových nanotrubic a dalších vláknitých materiálů, že může působit jako azbest prostřednictvím ostrých plochých okrajů. Předběžné výsledky studií také naznačují, že fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je plochý tvar a náboj, jsou úzce spjaty s cytotoxicitou a ovlivňují biodistribuci *in vivo*. Ukázalo se, že grafen se hromadí v ledvinách, plicích, játrech a slezině po intravenózní aplikaci. Mechanismy *in vitro* biotoxicity způsobené grafenem souvisejí s oxidačním stresem a poškozením buněčných membrán. Bylo prokázáno, že grafen může také

pronikat do mitochondrií a jader buněk, což může vést i k poškození DNA (Fahmi *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2012).

2.4. Polymerní NP

2.4.1. Dendrimery

Dendritické polymery vzbudily v posledních desetiletích zvýšený zájem v akademické i průmyslové sféře díky svým zajímavým fyzikálním a chemickým vlastnostem. Základní jednotkou dendrimeru je molekula označovaná jako větvící se jednotka. Na základ, jádro dendrimeru, se navazují přesně definovaným způsobem větvící se jednotky, v dalším kroku se navazují další větvící se jednotky, až vznikne pravidelná struktura (obr. 11). Dendrimery lze klasifikovat podle generace, což se týká počtu opakovaných cyklů větvení, které se provádějí během syntézy.

Charakteristickým znakem těchto polymerů je tedy vysoce větvená struktura s velkým počtem koncových skupin. To umožňuje uzavřít aktivní látku uvnitř dendrimeru a na povrch dendrimeru navázat látky zvyšující biokompatibilitu nebo látky selektivně vázající dendrimer na určitý typ buněk (Hobzová *et al.*, 2008; Patel *et* Patel, 2013; Singh *et al.*, 2014; Šrámek, 2009).

jádro - iniciuje tvar a způsob větvení



Obr. 11 Struktura dendrimeru. (Singh et al., 2014)

2.4.1.1. Využití dendrimerů v praxi

Pro své specifické vlastnosti se dendrimery dobře hodí k cílené distribuci léčiv. Protože jejich velikost je do 10 nm, nemají příliš velkou kapacitu pro inkorporaci léčiva, které je však možno vázat na jejich povrch. Obsazení povrchu specifickými protilátkami může zvýšit schopnost cíleného transportu. Vedle cílené distribuce léčiv jsou dendrimery testovány jako antimikrobiální činidla, nebo činidla pro genový a transmembránový přenos (Patel *et* Patel, 2013; Vaculíková *et al.*, 2015)

2.4.1.2. Toxicita dendrimerů

Dendrimery jsou obecně považovány za biokompatibilní. Nicméně *in vitro* testy prokázaly, že mohou vykazovat cytotoxicitu a hematologickou toxicitu. Jejich účinky však značně závisí na specifickém složení a struktuře každého typu materiálu. Důležitým faktorem při určování stupně toxicity jsou periferní skupiny dendrimerů. Dendrimery s kationtovými skupinami na periferii jsou mnohem toxičtější než látky s

aniontovými nebo neutrálními skupinami. Neutrální hydrofilní periferní skupiny mohou vykazovat lepší biokompatibilitu ve srovnání s dendrimery obsahujícími hydrofobní skupiny. To by mohlo být zapříčiněno tím, že pozitivní náboje na povrchu dendrimeru mohou interagovat s buněčnou membránou prostřednictvím elektrostatických interakcí, což může způsobit destabilizaci membrány a aktivaci apoptózy (Liu *et al.*, 2012).

3. Metody charakterizace NP

V posledních letech je zaznamenáván enormní nárůst inovačních postupů přípravy a charakterizace materiálů. Základní znalost struktury materiálů umožňuje získávat informace pro přípravu nových materiálů a nanomateriálů s lepšími nebo zcela novými užitnými vlastnostmi.

Pro primární charakteristiku materiálů a nanomateriálů jsou používány především neinvazivní metody, které poskytují důležité informace o struktuře, mikrostruktuře, složení, vadách a defektech, distribuci fází, velikosti zrna, nebo také o historii zpracování materiálů. V současnosti je pozornost zaměřována zejména na metody instrumentální. Pro moderní instrumentální metody je charakteristická jejich vysoká citlivost a rychlost. Mezi základní metody, kterými lze charakterizovat NP patří především mikroskopické techniky. Nicméně velký význam při primární charakterizaci materiálů mají i metody spektroskopické (Barabaszová, 2014; Charurvedi *et* Dave, 2012).

3.1. Elektronová mikroskopie

Jednou z vhodných metod k charakterizaci nanostruktur je elektronová mikroskopie. Funkčně je velmi podobná světelné mikroskopii (obr. 13). Důležitý rozdíl mezi světelným a elektronovým mikroskopem spočívá v tom, že elektronový mikroskop využívá k zobrazování svazek elektronů urychlených pomocí elektrického pole místo světelného paprsku a využívá čočky elektromagnetické (různé typy cívek) místo skleněných. Elektronový mikroskop tedy disponuje mnohem větší rozlišovací schopností než světelný. Rozlišovací schopnost u světelné mikroskopie je totiž limitována vlnovou délkou viditelného světla, zatímco u elektronových mikroskopů je vlnová délka dána energetickými elektrony (Barabaszová, 2014; Egerton, 2005; Charurvedi *et* Dave, 2012; Watt, 1997).

3.1.1. Transmisní a skenovací elektronová mikroskopie

Elektronovou mikroskopii rozdělujeme podle způsobu zobrazení na transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) (obr. 12). TEM je systém přímého pozorování a snímání obrazu, kdy proud elektronů prostupuje speciálně připraveným objektem a difraktované paprsky na jeho strukturách vytvoří interferencí výsledný obraz na luminiscenčním stínítku, který můžeme pozorovat okulárem nebo jej převést CCD kamerou na monitor, případně snímat fotografickou cestou. SEM představuje systém nepřímého pozorování a snímání obrazu, kdy objekt je řádkován urychleným elektronovým svazkem a uvolněné elektrony ze vzorku jsou registrovány příslušným detektorem. Následně dochází ke zpracování ve výsledný obraz (Egerton, 2005; Charurvedi *et* Dave, 2012; Navrátil *et al.*, 2005).



Obr. 12 Schéma optického, transmisního elektronového a skenovacího elektronového mikroskopu.

(https://www.jeol.co.jp/en/science/sem.html)

3.1.2. Aplikace TEM a SEM

Elektronovou mikroskopii lze využít k detekci rozměrů NP (stanovení velikosti a distribuce částic), morfologie, k vizualizaci povrchový vrstev, určení fázového složení anebo potvrzení krystalického či amorfního charakteru vzorku. (Barabaszová, 2014; Liu *et al.*, 2010a).

Významnou podmínkou pro získání vhodných výstupů elektronové mikroskopie je správná příprava vzorků. Ta je volena se snahou potlačit jakékoliv artefakty preparátu a s cílem získat reprodukovatelným způsobem morfologickou informaci. Vzorek musí být stabilní v elektronovém poli, neměl by obsahovat těkavé látky nebo vodu a měl by být vodivý, aby nedocházelo k nabíjení elektrony a současně docházelo k vyzáření sekundárních elektronů. Vodivosti vzorků se dosahuje napařováním tenkého vodivého povlaku, které se provádí v silném vakuu nebo naprašováním při nízkém vakuu. Práškové preparáty jsou nanášeny na speciální folie. Pro pozorování morfologie se zhotovují otisky (repliky) vzorku. Biologické vzorky jsou fixovány, odvodněny a zality do bločku akrylátu nebo pryskyřice. Takové preparáty jsou následně krájeny na ultratenké řezy o tloušťce cca 50 nm (Dolníček *et* Sulovský, 2013; Egerton, 2005).

3.2. Mikroskopie atomárních sil (AFM)

AFM přístroje jsou založeny na zcela jiném principu než klasické mikroskopické metody. Mechanická sonda nacházející se v blízkosti povrchu vzorku snímá povrch a vytváří signál zpětné vazby, který slouží k vertikálnímu polohování sondy. Pohyb sondy a vzorku zajišťuje piezoelektrická keramika, která umožňuje řádkové snímání v rovině *x* a *y*. Signálem zpětné vazby se řídí pohyb sondy ve směru osy *z* (Prado *et al.*, 2012).

U mikroskopie atomárních sil jsou k detekci vzdálenosti sondy od povrchu využívány meziatomární síly, které způsobují nepatrné deformace držáku sondy. Pomocí optické detekce laserovým paprskem je pak vyhodnocována poloha této sondy a topografie povrchu je dále softwarově zpracovávána (obr. 13) (Eaton *et* West, 2010).



Obr. 13 Princip detekce AFM. (http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/povrchy/metoda/afm-principy)

Hlavním prvkem AFM je raménko (volný konec pružného držáku), na jehož konci je umístěn hrot. Raménka s hroty jsou základem AFM přístrojů, protože zprostředkují interakci mezi povrchem vzorku a hrotem. Bývají nejčastěji vyrobeny z nitridu křemíku nebo křemíku s využitím fotolitografické techniky. Nejběžnější jsou raménka tvarem připomínající písmeno V, které zajišťujíí nízký mechanický odpor k vertikálnímu ohybu a vysoký odpor k příčné torzi. Obvykle jsou raménka dlouhá 100 až 200 µm, široká 10 až 40 µm a jejich tloušťka je 0,3 až 2 µm. Další důležitou vlastností raménka je pružnost (tuhost), která by měla být nižší než je vazebná síla mezi atomy v pevných látkách, aby nedocházelo k poškození hrotu nebo vzorku. Vlastnosti ramének s hroty pak vyplývají z jejich případné aplikace (Eaton *et* West, 2010; Kubínek *et al.* 2001; Prado *et al.*, 2012).

Na hrot, který se nachází v blízkosti povrchu vzorku, působí hlavně krátkodosahové odpudivé síly elektrostatického původu (odpudivá Pauliho síla, pramenící z Pauliho

vylučovacího principu) a dlouhodosahové, přitažlivé van der Waalsovy síly (síly dipól – dipólové interakce). Celková síla může být jak odpudivá, tak přitažlivá v závislosti na vzdálenosti hrotu od vzorku/materiálu. V grafu (obr. 14) je pak zaznamenána závislost celkové síly na vzdálenosti hrotu od povrchu vzorku. Na křivce jsou také znázorněny úseky charakteristické pro různé režimy AFM (Jalili *et* Laxminarayana, 2004; Kubínek *et al.* 2001).



Obr. 14 Graf působení sil AFM. (Kubínek et al. 2001)

3.2.1. Operační režimy AFM

Metoda AFM zahrnuje několik způsobů skenování. V závislosti na vzdálenosti hrotu od povrchu vzorku rozlišujeme tři základní operační režimy AFM (obr. 15) - kontaktní mód, nekontaktní mód a poklepový mód neboli přerušovaný kontakt (Barabaszová, 2014; Eaton *et* West).

V kontaktním módu je vzdálenost hrotu od povrchu vzorku velmi malá, tudíž převládá odpudivá síla, která se snaží vychýlit raménko od povrchu vzorku. Jestliže je tuhost hrotu menší než efektivní tuhost držící pohromadě atomy povrchu, můžeme ohnutí raménka použít k měření sil. Pokud tomu je naopak, raménko se neohne a může dojít k poškození povrchu vzorku. Na ohyb raménka mají vliv také kapilární síly, které
zhoršují kvalitu zobrazení. Vznikají díky okolní vlhkosti v kapičkách vody zkondenzovaných na povrchu vzorku. Další důležitou veličinou ovlivňující kvalitu obrazu je vlastní pružnost hrotu. V kontaktním módu bývá síla působící na vzorek řádově 10⁻⁷ N. Nejčastěji se při měření využívá konstantní výšky (měří se ohyb raménka) nebo konstantní síly, kdy se udržuje konstantní ohyb raménka. Kontaktní mód dosahuje vysokého rozlišení, ale je vhodný pouze pro tvrdé vzorky. U měkkých vzorků (např. biologických) by mohlo dojít k jejich poškození (Eaton *et* West, 2010; Jalili *et* Laxminarayana, 2004; Kubínek *et al.* 2001).

Nekontaktní mód pracuje v oblasti přitažlivých van der Waalsových sil dále od vzorku. Hrot přitahovaný ke vzorku je umístěn na raménku s vyšší tuhostí, aby nedocházelo k poškození vzorku. Na hrot však působí velmi malé síly, proto je udržován při oscilacích blízko své rezonanční frekvence. Pro tvorbu obrazu slouží tedy změny rezonanční frekvence. Nevýhodou tohoto módu je snímání mikrokapek zkondenzované vody na povrchu vzorku (Eaton *et* West, 2010; Jalili *et* Laxminarayana, 2004).

Tento problém řeší poklepový mód, který je velmi podobný nekontaktnímu módu, ale rozkmit raménka je větší, proto dochází i ke kontaktu s povrchem vzorku. Navíc je tato modifikace lepší než kontaktní, kdy by mohlo dojít k poškození vzorku. Obraz opět vzniká na základě změny rezonanční frekvence (Jalili *et* Laxminarayana, 2004).



Obr. 15 Schematické znázornění jednotlivých operačních režimů AFM. (Jalili et Laxminarayana, 2004)

3.2.2. Aplikace AFM

AFM nachází široké uplatnění v praxi. Lze ji využít k charakterizaci mikro a nanoobjektů a také ke studiu povrchových procesů (katalýz, chemických reakcí, adsorpcí, difuzí). Dále lze AFM využít v oblasti nanotechnologií k zobrazení atomů a manipulaci s nimi. Touto technikou je možné vytvářet struktury na atomární úrovni (Barabaszová, 2014).

Princip metody nám dovoluje měřit materiály jak vodivého tak i nevodivého charakteru. AFM můžeme také využít pro vzorky v kapalném prostředí (buňky v živném médiu). Metoda AFM má však i svá omezení. Výška vzorku musí odpovídat možnostem hlavy mikroskopu a tvarem by měl být vzorek makroskopicky rovný či vypouklý. Vzorek musí být řádně fixován (znehybněn), což může být problém u práškových či měkkých vzorků. Příliš lesklé vzorky mohou způsobovat také problémy díky snížení viditelnosti a interferenci obrazce. V neposlední řadě je nevýhodou AFM i malý rozměr skenovaných vzorků a pomalost snímání. I přes tato omezení je AFM jedinečnou mikroskopickou metodou s vysokým rozlišením na atomární úrovni a možností tvorby 3D obrazů. Navíc se nejedná o destruktivní metodu, při níž by došlo k znehodnocení vzorku, protože nemusí být před samotným měřením nijak upravován (kromě fixace) (Barabaszová, 2014; Eaton *et* West, 2010).

3.3. Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je spektroskopická vibrační technika, jejímž základem je Ramanův nepružný rozptyl monochromatického světla. Po interakci fotonu s atomem je atom excitován na vyšší energetickou hladinu a při přechodu do základního stavu dochází k vyzáření energii zpět do prostoru. Existují dva typy rozptýlení světla. Pružný Rayleighův rozptyl nastává tehdy, jestliže je vyzářen foton o stejné vlnové délce. Protože pružný rozptyl nenese žádnou analytickou informaci, je potřeba jej odfiltrovat. Pokud jsou vyzářeny fotony s větší vlnovou délkou (Stokesovy fotony) nebo menší vlnovou délkou (anti-Stokesovy fotony), hovoříme o nepružném Ramanově rozptylu (obr. 16). Při těchto nepružných srážkách se mění vnitřní energie zúčastněných molekul, což způsobuje změnu vibračně-rotačního stavu molekuly. Rozdíl frekvencí rozptýleného a zdrojového záření se označuje jako Ramanův posun a odpovídá frekvenci příslušného pásu v Ramanově spektru (Barabaszová, 2014; Rostron et al., 2016).





Pro měření Ramanových spekter se používají dva základní typy Ramanových spektrometrů. Jde o spektrometry disperzní nebo FT-spektrometry, využívající Fourierovu transformaci. V praxi nacházejí oba typy přístrojů své uplatnění. Výběr závisí hlavně na požadované aplikaci. Obecně u analyzovaných látek, kde Ramanovo spektrum obsahuje dostatečně intenzivní pásy nebo vzniká fluorescence, je vhodné použít FT-spektrometry. Ale u vzorků s nízkou koncentrací, které však nevykazují fluorescenci, je třeba zvolit disperzní spektrometry. Disperzní spektrometry lze také vyžít u pokročilejších Ramanových technik (Barabaszová, 2014; Rostron *et al.*, 2016).

Měřená spektra čistých látek je možné srovnávat s knihovnami spekter a provádět jejich identifikaci. Komerčně jsou využívány například knihovny spekter návykových látek, hořlavých látek nebo farmaceuticky důležitých chemikálií. Mnohdy lze ve složitých směsích identifikovat více složek vedle sebe bez předchozí separace. Různé databáze jsou komerčně dostupné, nicméně je vhodné tvořit knihovny spekter z vlastních dat.

Ramanova spektroskopie nachází uplatnění také v kvantitativní analýze. Je však potřeba brát v úvahu řadu specifických faktorů (reabsorpce rozptýleného záření, stabilní výkon laseru, hloubka průniku excitujícího záření). V případě Ramanovy spektroskopie obvykle nejde o jednoduchou lineární závislost intenzity pásu na koncentraci vzorku, protože nelze vyloučit překryvy Ramanových pásů a vliv měnících se koncentrací složek na tvar pásů. Je tedy nutné pro kalibraci využít složitější kalibrační modely s pokročilými algoritmy, pro které je třeba použít dostatečně reprezentativní sadu standardů.

(http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf)

3.3.1. Aplikace Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie je vhodnou metodou jak pro identifikaci látek, tak při určování jejich složení a struktury. Používá se při analýze pevných látek, kapalin, plynů, ale i při analýze biologických systémů (http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf). Kapalné látky lze měřit v křemenných či skleněných kyvetách, pevné krystalické látky v kovových kalíšcích, ve skleněných kapilárách nebo je možné lisovat KBr tablety. V Ramanově spektroskopii je však celkem obtížné měření plynů, protože Ramanovy spektrální pásy nejsou příliš intenzivní díky množství rozptylových částic (malý počet molekul). Jsou proto používány kyvety s násobným odrazem nebo výkonnější lasery (Barabaszová, 2014). Oproti infračervené spektrometrii lze analyzovat i vodné roztoky, protože voda se projevuje jen slabými pásy. Navíc, optické materiály, které jsou citlivé využívány v Ramanově spektroskopii, nejsou na vlhkost (http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf).

Ramanova spektroskopie patří v současné době mezi dynamicky se rozvíjející analytické metody. Předností této metody je snadná příprava analyzovaného materiálu a rychlost měření. Než samotné měření je časově náročnější vyhodnocování naměřených dat. Jelikož jde o bezkontaktní měření, nedochází k poškození vzorku (Valášek, 2012). Ramanova spektroskopie tak nachází široké praktické uplatnění v mineralogii, geochemii, v chemickém, farmaceutickém průmyslu nebo také v biologii a lékařství. (http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf)

3.4. Dynamický rozptyl světla (DLS)

Metoda DLS je vhodná pro měření velikosti částic menších než 1 µm. Základem měřící techniky DLS (nazývané též jako fotonová korelační spektroskopie nebo kvazielastický rozptyl světla) je detekce fluktuace intenzity rozptýleného světla (Rayleighův rozptyl) z laserového zdroje. Tyto fluktuace závisí na interferenčním zesilování a zeslabování světla rozptýleného na nestacionárních částicích, které podléhají Brownovu pohybu. Rychlost změn intenzity rozptýleného světla tedy přímo závisí na pohybu molekuly a informaci o velikosti částic získáme prostřednictvím Stokesovy-Einsteinovy rovnice:

$$d(H) = kT/3\pi\eta D$$

kde d(H) je hydrodynamický průměr částice, k je Boltzmannova konstanta, D je translační difuzní koeficient, T je absolutní teplota a η je viskozita disperzního prostředí (Hassan *et al.*, 2014; Kvítek *et al.*, 1998; Ševčíková *et al.*, 2014).

Nezbytnou součástí DLS systémů je digitální korelátor, který zjišťuje stupeň korelace mezi signály a korelační funkce potom slouží pro vypočítání distribuce velikosti. Částice sice podléhají Brownovu pohybu, nicméně přístroje DLS pracují s malými časovými měřítky. Nulová korelace (korelace = 0) nastává již v čase 1 – 10 milisekund. Dokonalé korelace dosáhneme srovnáním identických signálů (korelace = 1). Průběh korelační funkce znázorňuje graf na obr. 17 (https://www.xray.cz/kfklosa/eng/zetasizer/dls.htm).



Obr. 17 Průběh typické korelační funkce v závislosti na čase. (https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm)

Korelační funkce úzce souvisí s velikostí částic. Velké částice pohybující se pomalu budou fluktuovat pomaleji a malé částice pohybující se rychle budou fluktuovat rychleji (Lim *et al.*, 2013; Ševčíková *et al.*, 2014). Korelační funkce v případě velkých a malých částic zobrazují grafy na obr. 18.



Obr. 18 Grafické znázornění intenzity rozptýleného světla (a) a korelační funkce (b) u disperzních systémů s velkými a malými částicemi.

(Lim et al., 2013)

3.4.1. Aplikace DLS

Metoda DLS je vhodná k přesnému stanovení velikosti částic v suspenzích. Může být využita pro charakterizaci emulzí, liposomů, micel, pigmentů a latexů. Metoda DLS tedy slouží k základní charakterizaci částic v řadě aplikačních oblastí jako je potravinářství, kosmetika, farmacie, polymerní průmysl nebo průmysl nátěrových hmot. Tato metoda našla uplatnění také v biologických a mikrobiologických oborech, které pracují s biomateriálem jako jsou viry, bakterie, DNA a proteiny (Hassan *et al.*, 2014; Ševčíková *et al.*, 2014).

Mezi výhody této metody patří rychlost, jednoduchost měření a reprodukovatelnost výsledků u materiálů s malým sklonem k aglomeraci. Pro analýzu částic je potřeba jen malé množství vzorku. Jedná se navíc o metodu absolutní bez nutnosti použití kalibrace. Automatizované přístroje DLS jsou komerčně dostupné včetně analýzy dat. Přístroje jsou schopné detekovat částice v rozsahu od několika nanometrů po $1 - 2 \mu m$ (Kvítek *et al.*, 1998; Ševčíková *et al.*, 2014).

3.5. Atomová absopční spektrometrie (AAS)

Analytická metoda AAS slouží ke stanovení obsahu prvků v analyzovaném vzorku. Základem AAS je absorpce monochromatického světla volnými atomy vzorku v plynném stavu. Přítomnost záření vyvolá přechod atomu ze základní nižší energetické hladiny na vyšší hladinu. Atomy pohlcují pouze záření o vlnových délkách, které samy emitují. Vlnová délka absorbovaného záření je tedy charakteristická pro každý prvek. Vyhodnocením úbytku záření pomocí Lambert-Beerova zákona získáme také informaci o koncentraci daného prvku ve vzorku (García *et* Báez, 2012; Komínková *et* Mestek, 1997; Sardans *et al.*, 2010).

AAS přístroje se dělí dle způsobu atomizace na plamenovou AAS a elektrotermickou AAS. K převedení vzorku do atomárního stavu dochází tepelným rozkladem vzorku, který nastává při teplotě 2000 – 3000 K. V případě plamenových atomizátorů je této teploty dosaženo plamenem, který vzniká hořením paliva (např. acetylenu, propanu) za přítomnosti oxidantu (např. vzduchu, oxid dusného). U elektrotermických atomizátorů probíhá zahřívání působením elektrického proudu na vzorek v grafitové nebo wolframové kyvetě. Kromě atomizátoru patří mezi základní konstrukční prvky atomového absorpčního spektrometru zdroj monochromatického záření, atomizátor, monochromátor a detektor (obr.19) (García *et* Báez, 2012; Komínková *et* Mestek, 1997; Sardans *et al.*, 2010; Spěváčková *et* Knotková, 1998).



Obr. 19 Schéma dvoupaprskového plamenového atomového absopčního spektrometru. (*http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/D/STAAD.htm*)

3.5.1. Aplikace AAS

AAS slouží ke stanovení hlavních nebo stopových prvků v analyzovaném vzorku a k určení jejich koncentrace. Tato metoda může být prakticky využita k detekci prvků v životním prostředí, a to jak ve vodách, kalech, sedimentech, odpadech, horninách, půdě, tak i v rostlinné biomase, potravinách, biologických materiálech a tělních tekutinách (Costley *et al.*, 2000; Koplík *et al.*, 1997; Tsalev, 2011). AAS nachází tedy uplatnění například v potravinářském průmyslu, geologii, medicíně a biologických oborech (Koplík *et al.*, 1997; Tsalev, 2011). AAS hraje důležitou úlohu také ve forenzní chemii, kde slouží převážně ke stanovení těžkých kovů či zbytků střeliva (Zieba–Palus, 1998).

4. Studium buněčného poškození

Za fyziologických podmínek prochází buňky funkčními a morfologickými změnami a reagují na různé fyziologické podněty. Nicméně zůstávají v dynamické rovnováze, kterou označujeme jako normální homeostáza. Malé patologické podněty či nadměrnou fyziologickou zátěž obvykle buňky překonají pomocí buněčných adaptačních mechanismů. Pokud však zátěž přesáhne určité meze, dochází k buněčnému poškození, které může být buď reverzibilní nebo ireverzibilní, kdy dochází k buněčné smrti (Kroemer *et al.*, 2010; Milisav *et al.*, 2011).

Mezi příčiny buněčného poškození patří fyzikální faktory (např. extrémní teploty, ozáření, změny tlaku, mechanické poranění), chemické faktory (např. soli, kyslík, glukóza ve vysoké koncentraci nebo toxické látky), infekce, imunitní reakce, genetické poruchy nebo nutriční nerovnováha (Milisav *et al.*, 2011).

Reakce buněk na poškození závisí nejen na druhu a intenzitě stresového faktoru, ale také na typu, stavu a adaptibilitě buněk. Základními biochemickými mechanismy buněčného poškození je tvorba ROS, influx Ca²⁺ z extracelulárního prostoru, mitochondrií a endoplasmatického retikula, změny permeability membrán a vyčerpání ATP (obr. 20).



Obr. 20 Biochemické mechanismy buněčného poškození. (https://veteriankey.com/cellular-adaptations-injury-and-death)

Důsledkem oxidačního stresu je peroxidace membránových lipidů, oxidace postranních aminokyselin proteinů a jejich následná fragmentace, oxidační poškození DNA a tvorba jedno řetězcových zlomů. Porucha kalciové homeostázy vede ke zvýšení membránové permeability a k aktivaci některých degradačních enzymů (proteázy, fosfolipázy, ATPázy, endonukleázy). ATP je důležitá pro řadu syntetických a degradačních procesů v buňce. Snížení hladiny ATP v buňce má vliv na aktivitu

sodíkových pump, dochází ke změnám energetického metabolismu, což způsobuje změny integrity buněčných membrán (Kroemer *et al.*, 2010; Milisav *et al.*, 2011).

Základním testem sloužícím k detekci buněčného poškození je samotný test viability buněk. K analýze metabolické aktivity buněk lze použít například kolorimetrický MTT test, který je založen na redukci MTT tetrazoliové soli (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na fialové krystalky formazanu pomocí mitochondriálních dehydrogenáz. K reakci dochází pouze u živých buněk, jejichž procentuální zastoupení lze po rozpuštění formazanu kvantifikovat spektrofotometricky (Boncler *et al.*, 2014).

Při studiu buněčného poškození můžeme využít různé fluorescenční sondy. K detekci ROS je velmi často používána sonda CM-H₂DCFDA (5-(a-6)-chloromethyl-2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetát). Sonda je aplikována ve formě diacetátu (CM-H₂DCFDA) a v cytozolu buněk dochází k jeho hydrolýze buněčnou esterázou na CM-H₂DCF, který je pomocí ROS oxidován a vzniká fluorescenční CM-DCF. Pomocí této časově nenáročné metody lze detekovat peroxidový radikál, hydroxylový radikál, kyselinu chlornou a peroxylový radikál (Eruslanov *et* Kusmartsev, 2010).

Pro stanovení poškození DNA je efektivní kometová analýza. Tento test umožňuje detekovat DNA zlomy na úrovni jednotlivých buněk. Jde o elektroforetickou metodu, při níž dochází k migraci fragmentů DNA z jádra buněk ke kladné elektrodě. Intaktní DNA zůstává v jádře buněk. Míra fragmentace odráží stupeň poškození DNA (Kumaravel *et al.*, 2009, Novotná *et al.*, 2016). Migrující DNA vytváří obraz podobný kometě, který lze vizualizovat fluorescenčními barvivy a vyhodnocovat vhodným počítačovým programem založeným na analýze obrazu (Dvořák *et al.*, 2014, Kumaravel *et al.*, 2009).

Při stanovení cytotoxicity je důležité rozlišovat typy programované buněčné smrti. Mezi základní typy buněčné smrti patří apoptóza a nekróza, které lze rozlišit například kombinací fluorescenční sondy annexin V-Cy3 a 6-CFDA (6-karboxyfluorescein diacetát). Sonda annexin V-Cy3 umožňuje detekci annexinu V vázaného na apoptotické buňky a sonda 6-CFDA je po vstupu do živých buněk hydrolyzována esterázami za vzniku fluorescence. Tato kombinace tedy umožňuje diferenciaci mezi časnými apoptotickými buňkami (pozitivní annexin V-Cy3, 6-CFDA pozitivní), nekrotickými buňkami (pozitivní na annexin V-Cy3, 6-CFDA negativní) a životaschopnými buňkami (annexin V-Cy3 negativní, 6-CFDA pozitivní). Ke zobrazení a rozlišení buněk můžeme použít fluorescenční mikroskop (Farinacci, 2007).

5. Cíle práce

- Charakterizovat NP TiO₂ a NP Ag pomocí fyzikálně-chemických metod (AFM, DLS, TEM).
- 2. Kvantitativně a kvalitativně vyhodnotit buněčnou penetraci NP na nenádorových buněčných liniích.
- Zhodnotit míru buněčného poškození po aplikaci NP TiO₂, NP Ag a Ag⁺ pomocí in vitro testů na buněčných liniích BJ, SVK 14 a NIH 3T3.

6. Materiál a metody

6.1. Materiál

Jako biologický materiál byly použity buněčné linie BJ (lidské fibroblasty), NIH3T3 (myší fibroblasty) a SVK14 (lidské keratinocyty). Pro kultivaci bylo použito kultivační médium DMEM (Dublecco's Modified Eagle Medium, Sigma Aldrich) s 10% FBS (fetal bovine serum, Sigma Aldrich), 2% 200 mM L-glutaminem a 0,4% penicilinem / streptomycinem (Sigma).

K experimentům byly použity následující chemikálie: annexin V-Cy3 kit (APO-AC, Sigma Aldrich), dimetylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich), EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová, Lachema), 4% formaldehyd (Sigma Aldrich), fosfátový pufr (PBS, pH 7,4), HMP agaróza (Serva), LMP agaróza (Qbiogene), peroxid vodíku (Lach-Ner, ČR), NaCl (Tamda), NaOH (Sigma Aldrich), SYBR Green (Invitrogen), thiazolyl blue tetrazolium bromid (MTT, Sigma Aldrich), tris (tris-hydroxymethyl) aminomethan, (Sigma Aldrich), Triton X-100 (Serva), trypsin (Sigma Aldrich), 5-(a-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (CM-H₂DCFDA, Invitrogen). Kromě toho byly použity 96, 6 a 24-jamkové desky (TPP) pro pěstování buněčných linií a 1×1 cm křemenná sklíčka (Meopta-optika) pro Ramanovu spektroskopii.

6.2. Přístroje

Vlastnosti nanočástic byly detekovány pomocí multi-detekčního mikrodestičkového readeru Synergy HT (BioTek), mikroskopu Olympus IX81 s DSU jednotkou (Olympus), mikroskopu atomárních sil Bioscope Catalyst (Bruker) s SNL-A hrotem (Bruker), DLS přístroje Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, UK), transmisního elektronového mikroskopu JEM 2010 instrument (Jeol, Japan) a spektrofotometru UV/Vis Specord S 600 spectrophotometer (Analytik Jena, Germany). Obsah stříbra byl stanoven atomovým absorpčním spektrometrem ContrAA® 300 High-Resolution Continuum Source (Analytik). Ramanova spektra byla získána pomocí konfokálního Ramanova mikroskopu, model 300 alfa R, (WITec, GmbH). Excitace byla prováděna s dvojnásobnou frekvencí Nd: YAG laseru (Spectra Physics Excelsior 532 nm). Byl použit suchý objektiv Zeiss EC Epiplan-Neofluar (50 × / 0,8 NA, WD = 0,58 mm). Výsledky byly zpracovány pomocí softwaru Phototox verze 2.0 (ZEBET, Berlín,

Německo), Comet Score (Tritek Corp, Sumerduck, VA, USA), Gwyddion verze 2.28 (Český metrologický institut, Brno, Česká republika), Nanoscope analysis (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) a ASpect CS1.5.5.0 software (Analytic, Jena, Německo).

6.3. Použité nanočástice

Bylo studováno 7 vzorků určených pro komerční využití (2 vzorky NP oxidu titaničitého a 5 vzorků NP stříbra). K experimentům byly také použity NP stříbra vyrobené na Katedře fyzikální chemie UP v Olomouci.

Disperze NP TiO₂ (označená jako TiO₂), s deklarovanou koncentrací 8 g/l a průměrem NP 28 nm byla dodána firmou Precheza, a.s. (produkt číslo 180311/2). Stabilizace nebyla provedena. Druhý vzorek obsahující NP TiO₂ (označený jako Nanorutil) byl dodán rovněž od firmy Precheza, a. s. (produkt č 150311/1). Výrobcem deklarovalovaná koncentrace byla 16,4 g/l a průměr NP 128 nm. Stabilizace byla provedena pomocí SiO₂/Al₂O₃.

Dalších pět komerčních disperzí obsahovalo NP Ag. Čtyři vzorky byly získány od firmy KC Rulc (http://www.kcrulc.cz/en). První dva vzorky (označené jako KC Rulc 14 a KC Rulc 20) měly koncentraci Ag 14 mg/l a 20 mg/l. První zmíněný vzorek byl vyroben 12/10/2009 a druhý 02/15/2013. Další dva vzorky NP Ag (označené jako S9 a S29) o deklarované koncentraci 20 mg/l byly vyrobeny elektrolýzou lišící se pouze mezikrokem při přípravě, který zahrnoval odlišné způsoby míchání. Dle výrobce byla disperze vzorků NP Ag složena ze stříbra (99,99%) a ultračisté vody. U žádného vzorku nebyla provedena stabilizace a žádný ze vzorků neměl specifikační výrobní list. Nebyly tedy k dispozici žádné informace týkající se průměru částic, velikosti nebo stability vůči agregaci. Poslední komerční vzorek (označený jako Vintr) byl zakoupen od firmy Lakshmi-Narayan (http://www.lakshmi-narayan.eu); opět bez specifikačního výrobního

NP Ag (označené jako synt. NP Ag) vyrobené na Katedře fyzikální chemie UP v Olomouci byly připraveny Tollensovým procesem zahrnujícím redukci komplexního kationtu [Ag (NH₃)₂]⁺ D-maltózou v alkalických médiích (Panáček *et al.*, 2006). Vzorek měl koncentraci Ag 108 mg/l a byl stabilizován 0,05% želatinou.

6.4. Charakterizace NP (AFM, TEM, DLS)

DLS je obvykle první charakterizační metodou, protože nedochází k destrukci vzorku, který může být následně použit pro další testy. DLS metoda byla použita k detekci velikosti NP jak u komerčních vzorků, tak u syntetizovaných NP Ag (synt. NP Ag).

Rozměr synt. NP Ag byl také potvrzen pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Kapka desetkrát zředěné disperze NP Ag byla nanesena na měděnou mřížku potaženou uhlíkem (300 mesh) a vysušena při 30°C ve vakuové sušárně. K zobrazení NP Ag bylo použito zrychlovací napětí 160 kV. Distribuční analýza NP Ag byla provedena pomocí softwaru Gwyddion.

Pro AFM zobrazení byly vzorky nanočástic zředěny takto: TiO₂ - 1:100, Nanorutil 1:1000, KC Rulc 14 - 1:10, KC Rulc 20 - 1:1, Vintr 1: 100, S9 - 1:100, S29 - 1:100, synt. Ag NP - 1:100. Pak byly aplikovány na mikroskopické sklíčko, vysušeny při teplotě 60°C a zobrazeny skenovací rychlostí 0,3 Hz. Pro měření vzorků TiO₂, Nanorutil, KC Rulc 14, KC Rulc 20, Vintr a synt. NP Ag byl použit křemíkový hrot SNL-A na nitridovém nosníku s rezonanční frekvencí 40-75 kHz a silovou konstantou 0,58 N m⁻¹. K měření vzorků S9 a S29 byl použit křemíkový hrot ScanAsyst-Air na nitridovém nosníku s rezonanční frekvencí 45-95 kHz a silovou konstantou 0,4 N m⁻¹. AFM zobrazení bylo provedeno v režimu Peak Force tapping. Výsledné obrázky AFM byly zpracovány v programu Gwydion 2.40. Horizontální a vertikální rozměry byly zpracovány v programu Nanoscope Analysis (Jiravová *et al.*, 2016; Horáková *et al.*, 2014; Tománková *et al.*, 2015).

6.5. Příprava buněčných kultur

 10^4 , 2.10^5 a 10^6 BJ (lidské fibroblasty), NIH 3T3 (myší fibroblasty) a SVK 14 (lidské keratinocyty) byly inkubovány v termoboxu při 37°C a 5% CO₂ po dobu 24 hodin v 96/6/24-jamkových destičkách s čerstvým DMEM. Poté byly buňky inkubovány s NP nebo Ag⁺ v termoboxu po dobu 1 hodiny (ROS), po dobu 6 hodin (kometová analýza), nebo 24/48 hodin (MTT, AAS, Ramanova spektroskopie). Všechny testy byly provedeny po tripletech ve třech opakováních.

6.6. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie)

Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM na křemenných sklíčkách pro Ramanovu spektroskopii v 24-jamkových destičkách po 24 hodin. Potom byly inkubovány s disperzí NP po dobu 24 nebo 48 hodin. Následně byly buňky třikrát promyty 1 ml PBS a fixovány v 1 ml 4% formaldehydu po dobu 10 minut při pokojové teplotě (RT). Pak byly opět promyty 1 ml PBS a měřeny pomocí Ramanovy spektroskopie. Vzorek byl skenován prostřednictvím laseru kontinuálně podél řad vybrané oblasti a Ramanova spektra byla odebírána v 0,5 µm rastru s integračním časem 0,2 s. Síla dopadajícího laseru byla ~ 20 mW. Byl použit vyhlazovací filtr Savitzky-Golay. Pro vizualizaci buněk byla použita jednorozměrná Ramanova zobrazovací metoda. Intenzita určitého vibračního pásu v Ramanově spektru byla zaznamenána v podobě pseudobarevných Ramanových map intenzity. Ramanovo jednorozměrné zobrazení buněk bylo získáno integrací intenzity C-H vazeb Ramanova rozptylu v jeho maximu 2935 cm⁻¹. K zobrazení distribuce studovaných nanočástic TiO₂ a Ag byly použity jejich specifické vibrace. Konečné obrázky distribuce nanočástic v buněčném prostředí byly vytvořeny překrytím jednorozměrných obrázků stejné buňky sestavené z C-H vazeb a vibračních pásů nanočástic (Jiravová et al., 2016; Horáková et al., 2014; Tománková et al., 2015).

6.7. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS)

10⁶ SVK 14 buněk bylo kultivováno v DMEM v 6-jamkových destičkách po dobu 24 hodin. Buňky pak byly inkubovány s disperzí NP po dobu 24 nebo 48 hodin. Nejprve bylo médium s NP odsáto. Poté byly buňky trypsinizovány po dobu 5 minut při pokojové teplotě (RT) a trypsinizace byla zastavena pomocí DMEM s 10% FBS. Izolované buňky byly centrifugovány 5 minut při 2000 rpm a RT. Buněčný pelet byl dvakrát promyt 1 ml PBS a znovu centrifugován po dobu 5 minut při 2000 rpm a RT. Vzorky (buňky nebo médium) byly štěpeny ve 3 ml koncentrované kyseliny dusičné v odměrné baňce 10 ml po dobu 1 hodiny a RT. Po digesci byla ke vzorkům přidána deionizovaná voda na konečný objem 10 ml. Koncentrace Ag byla kvantifikována proti vnější kalibrační křivce. Všechna měření byla opakována třikrát a údaje byly zprůměrovány. Koncentrace Ag byly stanoveny pomocí atomové absorpční monochromátorem Echelle double (spektrální šířka pásma od 2 pm do 200 nm) a zdrojem kontinuálního záření (xenonová výbojka). Absorpční linie použitá pro tyto analýzy byla 328,068 nm. Kalibrační standardy byly připraveny pomocí AgNO₃ (Sigma-Aldrich, 99,8%). NP TiO₂ nebylo možné změřit metodou AAS v důsledku nedostatečného odstranění NP z povrchu buněk (Horáková *et al.*, 2014; Tománková *et al.*, 2015).

6.8. MTT test životnosti

Cytotoxický účinek a IC50 byly stanoveny za použití MTT testu. Buňky byly inkubovány s NP nebo Ag^+ v termoboxu 24 hodin. DMEM bylo nahrazeno za 50 µl 20 mmol/l MTT (rozpuštěného v PBS) a buňky byly inkubovány další 3 hodiny při teplotě 37°C a 5% CO₂. Roztok MTT byl opatrně odstraněn a bylo přidáno 100 µl dimethylsulfoxidu za účelem rozpuštění formazanových krystalů. Absorbance byla měřena mikrodestičkovým readrem Synergy HT při 570 nm a 690 nm. Data byla zpracována s použitím softwaru Phototox 2.0 (Jiravová *et al.*, 2016; Tománková *et al.*, 2015).

6.9. Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)

Bezprostředně po přidání NP nebo Ag^+ byla monitorována kinetika tvorby ROS po dobu 1 hodiny za použití CM-H₂DCFDA fluorescenční sondy a mikrodestičkového readru Synergy HT. Doba inkubace s CM-H₂DCFDA (5 µmol/l) sondou (rozpuštěné v DMSO) byla 30 min (Jiravová *et al.*, 2016; Tománková *et al.*, 2015).

6.10. Kometová analýza

Šest hodin po přidání NP nebo Ag⁺ byla použita k detekci poškození DNA kometová analýza. Mikroskopická sklíčka byla nejprve předem potažena 1% HMP agarózou rozpuštěnou v destilované vodě a vysušena při teplotě 60°C po dobu 30 minut. Na vysušená sklíčka bylo naneseno 85 µl 1% HMP agarózy rozpuštěné v PBS. Ihned byla pokryta krycím sklíčkem a umístěna do lednice. Buňky byly trypsinizovány a trypsinizace byla zastavena růstovým médiem DMEM obsahujícím 10% FBS. Izolované buňky byly centrifugovány 4 minuty při 1500 rpm. 85 µl 1% LMP agarózy bylo přidáno k 25 µl buněčného peletu a 85 µl této rozsuspendované směsi bylo po odstranění krycího sklíčka přidáno na mikroskopická sklíčka s agarózovým gelem. Ihned byla pokryta krycím sklíčkem. Po ztuhnutí (15 minut, 4°C) byla krycí sklíčka opět odstraněna a ponořena do lyzačního pufru (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA 10 mM Tris, 1% Triton X-100, pH = 10) po dobu 1 hodiny, při 4°C. Poté byla umístěna do elektroforetické nádrže a ponořena do chladného elektroforetického roztoku (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) po dobu 40 minut. Elektroforéza probíhala při 0,8 V/cm a 380 mA po dobu 20 minut. Po neutralizaci v pufru (0,4 M Tris, pH = 7,5) byly vzorky inkubovány s fluorescenční sondou SYBR Green po dobu 15 minut a následně vyhodnocovány pomocí fluorescenčního mikroskopu s CCD kamerou a programu SW Comet Score. Bylo analyzováno náhodně vybraných 50 buněk z každého vzorku (Tománková *et al.*, 2011).

6.11. Detekce apoptózy a nekrózy

Měření bylo prováděno pomocí Annexin V-Cy3 kitu. Buňky byly inkubovány při 37° C a 5% CO₂ po dobu 24 hodin v čerstvém DMEM společně s NP nebo Ag⁺. Před zahájením měření bylo DMEM nahrazeno 50 µl vazebného pufru, který obsahoval 5 mM glukózu. K pufru byl přidán 1 µl 50 mM 6-CFDA a 1 µl annexinu (100 µg/l). Po inkubaci (10 minut, 37° C a 5% CO₂) byl detekován fluorescenční signál pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81 s DSU jednotkou, manuálně vyhodnocen a stanoven jako procento kontrolních buněk (100 × průměr měřené skupiny / průměr kontrolní skupiny) (Jiravová *et al.*, 2016; Tománková *et al.*, 2015).

6.12. Statistická analýza

Výsledky byly zpracovány pomocí softwaru SPSS v. 15 a 22(SPSS Inc. Chicago, USA). Uváděné údaje pocházejí ze tří nezávislých pokusů. ANOVA a post hoc Dunnet testy byly použity pro srovnání jednotlivých koncentrací s kontrolou. Test rovnosti regresních koeficientů, založený na porovnání 95% CI (intervalu spolehlivosti) pro regresní koeficienty, byl použit k popisu kinetiky produkce ROS. Výsledky kometové analýzy byly porovnány pomocí testu Mann-Whitney U s korekcí Bonferroniho pro vícenásobné srovnání. K analýze výsledků apoptózy a nekrózy byl použit Chi-square test s korekcí Bonferroniho. Výsledky pro každý měřený vzorek v různých

koncentracích byly porovnány s příslušnou kontrolou a s ostatními vzorky měřenými v buněčné linii. Všechny statistické analýzy byly provedeny na úrovni signifikance, která se rovná 0,05 (Jiravová *et al.*, 2016; Tománková *et al.*, 2015).

7. Výsledky

7.1. Charakterizace NP (AFM zobrazení)

Pomocí mikroskopie atomárních sil byla zaznamenána morfologie povrchu NP 7 komerčních vzorků (5 NP Ag a 2 TiO₂) a NP Ag vyrobených na Katedře fyzikální chemie UP. Z výsledků je patrné, že zatímco malé NP zaujímají tvar koule, velké shluky NP netvoří přesné geometrické tvary (obr. 21 - 24).

Přestože mohly být vzorky NP ovlivněny procesem stárnutí nebo degradací v důsledku osvětlení, je z výsledků AFM patrné, že nebyly respektovány deklarované velikosti komerčních NP (obr. 25). U vzorku TiO₂ byl výrobcem deklarován průměr 28 nm, zatímco medián naměřeného výškového průměru NP byl 20,7 nm. Pro vzorek Nanorutil byl deklarován průměr 128 nm, avšak medián naměřeného výškového průměru byl 22,8 nm (obr. 21 a 25).

V případě komerčních vzorků KC Rulc 14 a KC Rulc 20 nebyl výrobcem deklarován průměr NP. Nicméně bylo předpokládáno, že tyto vzorky mají stejnou velikost částic a liší se pouze koncentrací Ag. Naše výsledky však tento předpoklad nepotvrdily. Medián výškového průměru NP KC Rulc 14 byl 10,2 nm, zatímco u vzorku KC Rulc 20 dosáhl více než dvojnásobné hodnoty, tj. 24,4 nm. Komerční vzorek Vintr byl dodán také bez specifikace velikosti. Pomocí AFM byl naměřen medián výškového průměru NP 10 nm (obr. 22 a 25).

U komerčních vzorků S9 a S29 výrobce též neuvedl velikost NP. Tyto vzorky měly stejnou koncentraci, rozdíl byl pouze v mezikroku při přípravě, který zahrnoval odlišné způsoby míchání. Z našeho měření vyplývá, že tento mezikrok měl výrazný vliv na velikost NP. U vzorku S9 byl medián výškového průměru NP 30,6 nm a u vzorku S29 20,4 nm (obr. 23 a 25).



Obr. 21 AFM zobrazení 2 komerčních vzorků NP TiO₂ (TiO₂, Nanorutil) - 2D zobrazení (A - výškový profil, B - peak force error) a 3D zobrazení (C). Skenovací rychlost 0,3 Hz, rozlišení 256 pixelů. Obrázky byly zpracovány v programu Gwydion 2.40.



Obr. 22 AFM zobrazení 3 komerčních vzorků NP Ag (KC Rulc 14, KC Rulc 20 a Vintr) - 2D zobrazení (A - výškový profil, B - peak force error) a 3D zobrazení (C). Skenovací rychlost 0,3 Hz, rozlišení 256 pixelů. Obrázky byly zpracovány v programu Gwydion 2.40.



Obr. 23 AFM zobrazení 2 komerčních vzorků NP Ag (S9 a S29) - 2D zobrazení (A - výškový profil, B - peak force error) a 3D zobrazení (C). Skenovací rychlost 0,3 Hz, rozlišení 256 pixelů. Obrázky byly zpracovány v programu Gwydion 2.40.



Obr. 24 AFM zobrazení synt. NP Ag - 2D zobrazení (A - výškový profil, B - peak force error) a 3D zobrazení (C). Skenovací rychlost 0,3 Hz, rozlišení 256 pixelů. Obrázky byly zpracovány v programu Gwydion 2.40.



Obr. 25 Vertikální rozměr nanočástic - vzorek 1 (TiO₂), vzorek 2 (Nanorutil), vzorek 3 (KC Rulc 14), vzorek 4 (KC Rulc 20), vzorek 5 (Vintr), vzorek 6 (S9), vzorek 7 (S29). Výsledky byly zpracovány v programu Nanoscope Analysis (Bruker).

7.2. Detekce velikosti komerčních NP (DLS)

K určení velkosti NP bylo použito měření DLS, jehož výsledky jsou shrnuty v tabulce 1. První dva vzorky obsahující NP TiO₂ (TiO₂, Nanorutil) byly dodány s výrobním specifikačním listem, který obsahoval i informace o průměru NP. Bylo deklarováno, že první vzorek (TiO₂) o koncentraci 8 g/l obsahuje částice s průměrem 28 nm. Z měření DLS vyplývá, že vzorek zjevně prošel nějakým procesem stárnutí. V módu, kdy jsou částice srovnávány podle jejich počtu ve vzorku, hlavní frakce obsahuje částice s 44,6 nm v průměru. Nicméně dle intenzity rozptylu bylo zjištěno, že je zde také frakce agregovaných objektů v mikrometrové oblasti, a to do 1730 nm v průměru. U druhého vzorku (Nanorutil) byla deklarovaná relativně vysoká koncentrace 16,4 g/l a velikost částic 128 nm. Zajímavé je, že i když byla koncentrace dvojnásobná, nebyly detekovány pomocí DLS žádné velké agregáty na rozdíl od vzorku TiO₂. To může být způsobeno tím, že vzorek Nanorutil byl stabilizován pomocí SiO₂/Al₂O₃. Nicméně deklarovaný průměr nebyl potvrzen. Byl naměřen průměr 410,7 nm s nejintenzivnějším vrcholem (mód dle počtu) 227,7 nm (tab. 1).

U vzorků obsahující stříbro bohužel informace o velikosti NP nebyly dodány. Měření DLS prvního vzorku (KC Rulc14) prokázalo přítomnost částic ve dvou frakcích – jednu v mikrometrech (1793 nm, 80%) a jednu v subnanometrovém měřítku (0,75 nm, 20%).

Vzhledem k přítomnosti téměř 2 µm částic je průměrná hodnota velikosti NP také poměrně vysoká, tj. 986,1 nm. V případě druhého vzorku z firmy KC Rulc (KC Rulc 20) je průměrná hodnota mnohem menší, tj. 106 nm, s přítomností 162,5 nm částic (91,4%), 19,4 nm částic (4,8%) a 4 µm částic (3,8%). Ačkoli tento vzorek byl koncentrovanější než KC Rulc 14 a bylo by pravděpodobnější, že podstoupí agregaci z pohledu disperzní stability, výsledky DLS ukazují opak. Příčinou je možná mnohem delší doba stárnutí (KC Rulc 14 byl vyroben 10/12/2009, zatímco KC Rulc 20 02/15/2013). Obecně jsou NP Ag považovány za hydrofobní, a pravděpodobně proto se oddělují od vodného média a sedimentují. Z tohoto důvodu časové a skladovací podmínky (teplota a světlo) mohou silně ovlivnit jejich chování. Výrobce neposkytl informace o velikosti NP ani u posledního vzorku NP Ag od firmy Lakshmi Narayan (Vintr) o nejvyšší koncentraci stříbra (40 mg/l). Měřením DLS bylo zjištěno, že průměrná hodnota velikosti NP tohoto vzorku je 131,5 nm a hlavní frakce je tvořena částicemi s průměrná 48,4 nm (tab. 1).

	Z- nrůměr	PDI	mód intenzity					mód počtu		
vzorek			1. pík		2. pík		3. pík		pík	
	prumer		[nm]	[%]	[nm]	[%]	[nm]	[%]	[nm]	[%]
TiO ₂	251,4	1,000	1730	76,1	51,6	23,9	-	-	44,6	100
Nanorutil	410,7	0,247	552,5	100	-	-	-	-	227,7	100
KC Rulc14	986,1	0,624	1793	80,1	0,8	19,9	-	-	0,7	100
KC Rulc20	106,0	0,403	162,5	91,4	19,3	4,8	4167	3,8	13,6	100
Vintr	131,5	0,248	187,2	100	-	-	-	-	48,4	100

Tabulka 1 Výsledky měření DLS (velikost a distribuce NP).

7.3. Detekce velikosti syntetizovaných NP (DLS, TEM, UV-Vis)

NP Ag (synt. NP Ag) byly vyrobené modifikovaným Tollensovým procesem zahrnujícím redukci komplexního kationtu $[Ag (NH_3)_2]^+$. Díky této metodě byly připraveny NP Ag s definovanou velikostí 27 nm s velmi úzkou distribucí velikosti, což je patrné z výsledků měření DLS. Tyto výsledky byly také potvrzeny zobrazením synt. NP Ag transmisním elektronovým mikroskopem. Dále byl zaznamenán typický absorpční pík při vlnové délce 409 nm prokazující přítomnost malých stříbrných NP (obr. 26).



Obr. 26 Charakterizace synt. NP Ag – TEM zobrazení, spektrum UV/Vis, výsledky DLS (velikost a distribuce).

7.4. Penetrace NP do buněk (Ramanova spektroskopie)

Ramanovo zobrazení distribuce NP v buněčném prostředí je založeno na detekci specifických vibrací NP. Ramanova spektra zkoumaných NP vykazují specifické rysy, které jsou podstatně odlišné od vibrací biomolekul (obr. 27).

V Ramanově spektru NP TiO₂ bylo nalezeno několik viditelných vibračních pásů. Pro detekci NP v buněčném prostředí byly použity jejich nejintenzivnější vibrace. Univariační Ramanovo zobrazení NP TiO₂ bylo tvořeno vibracemi o frekvenci 150 cm⁻¹ (TiO₂) a 455 cm⁻¹ (Nanorutil). Vibrační pás s maximem 2895 cm⁻¹ nemohl být použit pro vizualizaci NP TiO₂ v buněčném prostředí, protože tato vibrace interferovala s vibrační frekvencí C-H oblasti používané pro vizualizaci buněk (obr. 27).

Ramanova spektra všech měřených NP Ag obsahovala viditelný široký pás v oblasti 1250 a 1650 cm⁻¹ s maximy 1360 a 1585 cm⁻¹. Navzdory skutečnosti, že tento vibrační pás leží v rozmezí biomolekulárních vibrací, vizualizace NP Ag mohla být realizována díky mnohem vyšší intenzitě Ramanova rozptylu NP Ag ve srovnání s Ramanovým signálem buňky. Pro znázornění rozložení NP Ag v buněčném prostředí byla tedy k rekonstrukci univariačního zobrazení použita frekvence 1585 cm⁻¹ (obr. 27).

U všech studovaných NP byla zaznamenána intracelulární penetrace. V buněčné cytoplasmě docházelo ke tvorbě agregátů. Vibrace C-H vazby byly nejintenzivnější v oblasti výskytu NP. Předpokládáme, že NP byly do cytoplasmy transportovány pomocí vezikulárního transportu (obr. 28-30). V případě synt. NP Ag byl zaznamenán rozdíl v intracelulární akumulaci NP v závislosti na typu buněčné linie. U buněčné linie NIH 3T3 byly detekovány synt. NP Ag především v jádře buněk, zatímco u buněčné linie SVK 14 spíše v cytoplazmě (obr. 30).



Obr. 27 Ramanovo spektrum kontrolních buněk SVK 14 a Ramanova spektra NP TiO₂ (TiO₂, Nanorutil) a NP Ag.



Obr. 28 Ramanovo zobrazení komerčních NP TiO₂ (vzorek TiO₂, Nanorutil) a NP Ag (vzorek KC Rulc 14, KC Rulc 20 a Vintr) v buňkách buněčné linie SVK 14: a - snímky jasného zorného pole (bright field) buněk SVK-14, b - Ramanovo univariační zobrazení buněk tvořené C-H vibracemi o frekvenci 2935 cm⁻¹, c - Ramanovo univariační zobrazení NP tvořené vibracemi o frekvenci 150 cm⁻¹ (TiO₂), 455 cm⁻¹ (Nanorutil) a 1585 cm⁻¹ (NP Ag), d - kombinace zobrazení b a c.



Obr. 29 Ramanovo zobrazení komerčních NP Ag (vzorek S9 a S29) v buňkách buněčné linie BJ: a - Ramanovo univariační zobrazení buněk tvořené C-H vibracemi o frekvenci 2935 cm⁻¹, b - Ramanovo univariační zobrazení NP Ag o frekvenci 1585 cm⁻¹, c - kombinace zobrazení a a b.



Obr. 30 Ramanovo zobrazení synt. NP Ag v buňkách buněčných linií NIH 3T3 a SVK 14: a - Ramanovo univariační zobrazení buněk tvořené C-H vibracemi o frekvenci 2935 cm⁻¹, b - Ramanovo univariační zobrazení NP Ag o frekvenci 1585 cm⁻¹, c - kombinace zobrazení a a b.

7.5. Kvantitativní analýza penetrace NP (AAS)

Koncentrace komerčních vzorků NP Ag (KC Rulc 14, KC Rulc 20, Vintr) v disperzi byla měřena metodou AAS. Deklarované hodnoty, naměřené hodnoty \pm SD a rozdíly naměřených a deklarovaných údajů jsou shrnuty v tabulce 2A. Deklarované a naměřené koncentrace NP Ag byly v dobré korelaci u vzorků KC Rulc 14 a KC Rulc 20, zatímco vzorek Vintr vykazoval významný rozdíl. Téměř 72% rozdíl značně převyšoval možnou chybu měření, proto byla koncentrace deklarovaná výrobcem považována za zcela nesprávnou. Následně byla měřena koncentrace NP Ag, která pronikla do buněk a zbytková koncentrace v médiu (tabulka 2B). V případě vzorků KC Rulc 14 a KC Rulc 20 byly pro naše další výpočty použity koncentrace NP Ag poskytované výrobcem. V případě vzorku Vintr byla použita naměřená data (11,2 mg/l). Ukázalo se, že množství NP Ag, které vstoupilo do buněk, bylo mezi 4,38 a 7,86 %. U vzorků NP TiO₂ nebylo možné rozlišit penetraci do buněk pomocí AAS, protože NP TiO₂ nemohly být dostatečně odstraněny z buněčného povrchu bez poškození buněk.

Tabulka 2A Srovnání deklarovaných a skutečně naměřených koncentrací komerčních vzorků NP Ag (KC Rulc 14, KC Rulc 20 a Vintr) pomocí AAS.

- ---

vzorek	deklarovaná konc. [mg/l]	měřená konc. [mg/l ± SD]	rozdíl mezi deklarovanou a měřenou konc. [%]
KC Rulc 14	14	$13,4 \pm 1.2$	-4,3
KC Rulc 20	20	$20,4 \pm 2.3$	2,2
Vintr	40	$11,2 \pm 3.1$	-71,9

Tabulka 2B Kvantitativní analýza penetrace NP Ag - procentuální zastoupení komerčních NP Ag (KC Rulc 14, KC Rulc 20 a Vintr) v buňkách buněčné linie SVK 14 a médiu měřené AAS.

vzorek	v buňkách [%]	v médiu [%]	ztráta [%]
KC Rulc 14	7,86	57,7	34,44
KC Rulc 20	5,79	66,44	27,77
Vintr	4,38	78,75	16,87
kontrola	-	-	-

7.6. MTT test životnosti

Výsledky MTT testu životnosti buněk buněčných linií SVK 14, NIH 3T3 a BJ jsou shrnuty v tabulce 3. IC50 pro NP TiO₂, Ag a Ag⁺ byly stanoveny v mg/l. Hodnoty IC50 pro buněčnou linii SVK 14 se pohybovaly v rozmezí od 2,1 mg/l (KC Rulc 20) do 1744,1 mg/l (TiO₂), pro buněčnou linii NIH 3T3 v rozmezí od 1,3 mg/l (KC Rulc 20) do 3234,4 mg/l (TiO₂), pro buněčnou linii BJ v rozmezí od 2,2 mg/l (KC Rulc 20) do 5659,8 mg/l (TiO₂). Z těchto hodnot vyplývá, že NP Ag mají vyšší cytotoxický potenciál než NP TiO₂. Je zajímavé, že buněčná linie SVK 14 je nejcitlivější na NP TiO₂ a buněčná linie NIH 3T3 je nejcitlivější na NP Ag a Ag⁺.

vzorek	SVK 14	4 [mg/l]	NIH 3T3 [mg/l]		
TiO ₂	174	4,1	3234,4		
Nanorutil	50	8,6	1571,2		
KC Rulc 14	2	,7	1,9		
KC Rulc 20	2	,1	1,3		
Vintr	2	,2	1,4		
Synt. NP Ag	60,1		50,7		
Ag^+	3,6		2,5		
VZO	rek	BJ [I	mg/l]		
Ti	O ₂	565	59,8		
Nano	orutil	259	96,6		
KC R	ulc 14	2,	53		
KC R	ulc 20	2,2			
Vi	ntr	2,3			
S	9	4	,8		
S	29	4.	.4		

Tabulka 3 Hodnoty IC50 NP TiO₂, NP Ag a Ag^+ (mg/l).

7.7. Měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)

Produkce ROS byla měřena pomocí fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA (detekce peroxidového radikálu, hydroxylového radikálu, kyseliny chlorné a peroxylového radikálu).

Výsledky kinetické produkce ROS dokazují významný vliv komerčních NP (vzorek TiO₂, Nanorutil, KC Rulc 14, KC Rulc 20, Vintr - koncentrace IC50) ve všech

buněčných liniích, vzorku S9, S29 (koncentrace IC50 a IC75) u buněčné linie BJ, Ag⁺ (koncentrace IC25, IC50, IC75) u buněčné linie SVK 14 a NIH 3T3, synt. NP Ag (koncentrace IC75) u buněčné linie SVK 14 a synt. NP Ag (koncentrace IC50, IC75) u buněčné linie NIH 3T3 ve srovnání s odpovídajícími kontrolními skupinami (obr. 31-35). K nejrychlejší produkci ROS docházelo u buněčné linie NIH 3T3. Při porovnání vlivu NP TiO₂ a NP Ag na kinetiku produkce ROS můžeme konstatovat, že NP TiO₂ mají vyšší účinek, a tudíž představují vyšší potenciální nebezpečí tkáňové oxidace (obr. 31 a 32). Při srovnání Ag⁺ a synt. NP Ag na produkci ROS jsme zaznamenali významnější vliv Ag⁺, a to zejména u buněčné linie NIH 3T3 (obr. 33 a 34). Výsledky kinetické produkce ROS naznačují, že účinek volných radikálů nepředstavuje v případě NP Ag hlavní mechanismus vedoucí ke smrti buňky.



Obr. 31 Kinetická produkce ROS v buněčných liniích SVK 14, NIH 3T3 a BJ vyvolána komerčními NP TiO₂ a NP Ag o koncentraci IC50. Lineární regresní koeficient ROS vyjadřuje množství ROS produkované každou minutu. Pozitivní signifikance v porovnání s kontrolou je značena *.



Obr. 32 Kinetická produkce ROS v buněčných liniích SVK 14, NIH 3T3 a BJ vyvolána komerčními NP TiO₂ a NP Ag o koncentraci IC50. Grafy znázorňují lineární trend produkce ROS.



Obr. 33 Kinetická produkce ROS v buněčných liniích SVK 14 a NIH 3T3 vyvolána synt. NP Ag a Ag^+ o koncentraci IC25, IC50 a IC75. Lineární regresní koeficient ROS vyjadřuje množství ROS produkované každou minutu. Pozitivní signifikance v porovnání s kontrolou je značena *.



Obr. 34 Kinetická produkce ROS v buněčných liniích SVK 14 a NIH 3T3 vyvolána synt. NP Ag a Ag⁺ o koncentraci IC50. Grafy znázorňují lineární trend produkce ROS.



Obr. 35 Kinetická produkce ROS v buněčné linii BJ vyvolána komerčními NP Ag (vzorek S9 a S29) o koncentraci IC25, IC50 a IC75 (A) a IC50 (B). Lineární regresní koeficient ROS vyjadřuje množství ROS produkované každou minutu. Pozitivní signifikance v porovnání s kontrolou je značena *. Graf B znázorňuje lineární trend produkce ROS.
7.8. Kometová analýza

K vyhodnocení poškození DNA po aplikaci NP byla použita kometová analýza. Rozsah poškození DNA je přímo úměrný fragmentaci DNA směrem z hlavy k ocasu komety (obr. 36-38).

Téměř všechny vzorky NP způsobily značné poškození DNA. Nejvyšší fragmentace DNA byla zaznamenána po aplikaci NP TiO₂ především u buněčné linie NIH 3T3. Vzorky NP TiO₂ vykazovaly také nejvyšší trend produkce ROS, a tak zde zřejmě poškození ROS hraje důležitou roli. Nicméně v případě NP Ag výsledky poškození DNA nekorespondují s produkcí ROS. Při porovnání vlivu Ag⁺ a synt. NP Ag na poškození DNA byl zaznamenán výraznější účinek synt. NP Ag, zejména u buněčné linie NIH 3T3, což také neodpovídá výsledkům kinetické produkce ROS. Jak již bylo zmíněno, domníváme se, že účinek ROS není hlavním mechanismem poškození buněk v případě vzorků NP Ag. Tyto výsledky nás také vedou k hypotéze, že uvolnění Ag⁺ z NP Ag není jediným mechanismem poškození DNA.



Obr. 36 Fragmentace DNA stanovená kometovou analýzou v buněčných liniích SVK 14, NIH 3T3 a BJ po aplikaci komerčních NP TiO_2 a NP Ag o koncentracích IC50. Pozitivní signifikance v porovnání s kontrolou je značena *.



Obr. 37 Fragmentace DNA stanovená kometovou analýzou v buněčných liniích SVK 14 a NIH 3T3 po aplikaci synt. NP Ag a Ag⁺ o koncentraci IC25, IC50 a IC75. Pozitivní signifikance v porovnání s kontrolou je značena *.



Obr. 38 Fragmentace DNA stanovená kometovou analýzou v buněčné linii BJ po aplikaci komerčních NP Ag o koncentraci IC25, IC50 a IC75. Pozitivní signifikance v porovnání s kontrolou je značena *.

7.9. Detekce apoptózy a nekrózy

K vyhodnocení apoptózy byly buňky barveny 6-CFDA, annexinem a pak vyhodnoceny fluorescenčním světelným mikroskopem. Životaschopné buňky byly identifikovány jako zelené, nekrotické buňky červené a po sloučení zelených a červených signálů byly buňky označeny za apoptotické.

Aplikace NP o koncentraci IC50 zvýšila procento apoptotických buněk ve srovnání s kontrolou u všech buněčných linií (kromě vzorku Nanorutil, linie SVK 14) (obr. 39 a 40). Nicméně červená autoflourescence TiO₂ NP (zejména u vzorku Nanorutil) zhoršila identifikaci červeně obarvených buněk. Tato skutečnost mohla vést k falešně pozitivním výsledkům nekrózy. Nejvyšší míra apoptózy byla zaznamenána po aplikaci vzorku TiO₂ na buněčnou linii NIH 3T3. Při porovnání vlivu Ag⁺ a synt. NP Ag na apoptózu u buněčné linie NIH 3T3 byl detekován výraznější účinek synt. NP Ag. Tyto výsledky tedy korespondují s výsledky kometové analýzy.



Obr. 39 Počet apoptotických a nekrotických buněk v buněčných liniích SVK 14, NIH 3T3 a BJ po aplikaci komerčních NP TiO₂ a NP Ag o koncentracích IC50. Pozitivní signifikance v porovnání s kontrolou je značena *.



Obr. 40 Počet apoptotických a nekrotických buněk v buněčných liniích SVK 14 a NIH 3T3 po aplikaci synt. NP Ag a Ag^+ o koncentraci IC25, IC50 a IC75. Pozitivní signifikance v porovnání s kontrolou je značena *.

8. Diskuze

NP Ag a NP TiO₂ jsou obecně nejčastěji aplikovanými nanomateriály, a to nejen pro své jedinečné vlastnosti, ale také pro jejich relativně jednoduchou výrobu a nízké náklady. Komerčně vyráběné nanomateriály jsou již široce používány v produktech určených ke každodennímu použití, včetně výrobků pro děti. Je tedy důležité studovat jejich potenciální rizika. Mechanismus toxicity NP totiž není zatím zcela objasněn (Cleveland *et al.*, 2012; Marambio-Jones *et* Hoek; 2010; Prabhu *et* Poulose, 2012; Shi *et al.*, 2013; Tománková *et al.*, 2015; Večeřová, 2016; Wang *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2016). V rámci této disertační práce byly shrnuty výsledky studia komerčních NP TiO₂, komerčních NP Ag a NP Ag syntetizovaných na Katedře fyzikální chemie UP v Olomouci.

Parametry komerčních NP TiO₂ a NP Ag deklarované výrobcem byly nejprve ověřeny pomocí chemicko-fyzikálních metod (AFM, DLS, AAS). Přestože mohly být vzorky NP ovlivněny procesem stárnutí nebo degradací v důsledku osvětlení, je z výsledků AFM a DLS patrné, že nebyly respektovány deklarované velikosti komerčních NP. Nicméně u vzorku Nanorutil byl zaznamenán vliv stabilizace, protože nebyly pomocí DLS detekovány žádné velké agregáty na rozdíl od vzorku TiO₂, přestože byla jeho koncentrace dvojnásobná. U ostatních komerčních vzorků nebyla provedena žádná stabilizace. Význam skladovacích podmínek NP a jejich stabilizace byl prezentován například také ve studii Pinto *et al.* (2010). NP Ag o velikosti 5 nm skladované v temnu při nižší teplotě vykazovaly menší změny morfologie NP a nižší sklon k agregaci. Podobný trend nižší agregace byl zaznamenán při použití stabilizovaných NP Ag citrátem (Pinto *et al.*, 2010).

Z měření koncentrace komerčních NP Ag pomocí AAS vyplývá, že deklarované hodnoty byly v dobré korelaci, pouze vzorek Vintr vykazoval významný rozdíl. Znalost správné koncentrace, velikosti, tvaru, povrchu, stupně agregace, náboje a reaktivity NP je zásadní při hodnocení jejich buněčné penetrace a možných toxických účinků (López-Heras *et al.*, 2014).

K průniku malých NP do buněk může docházet nespecifickou pasivní cestou. Shluky NP mohou být fagocytovány nebo přijaty prostřednictvím makropinocytózy a dalších endocytických mechanismů (Wang *et al.*, 2015). V rámci této práce byla pomocí Ramanovy spektroskopie potvrzena intracelulární penetrace všech studovaných NP. Kinetika absorpce a intracelulární lokalizace NP závisí nejen na základní charakteristice

NP, ale také na typu buněčné linie (Asharani *et al.*, 2009b, Bartłomiejczyk *et al.*, 2013). V případě synt. NP Ag (27 nm) můžeme pozorovat rozdíl v intracelulární akumulaci NP. U buněčné linie NIH 3T3 byly detekovány synt. NP Ag především v jádře buněk, zatímco u buněčné linie SVK 14 spíše v cytoplazmě.

Greulich *et al.*, (2011) zaznamenali aglomeraci NP Ag (80 nm) uvnitř perinukleární oblasti lidských mezenchymálních kmenových buněk. Vzhledem k intracelulární aglomeraci bylo tedy nepravděpodobné, že částice budou transportovány do buněčného jádra, Golgiho komplexu nebo endoplazmatického retikula. Naopak ve studii Hackenberg *et al.*, (2011) byly NP Ag (46 nm) detekovány v cytoplazmě i v jádře mezenchymálních kmenových buněk. Ve studii Mahmood *et al.*, (2010) byly NP Ag (23 nm) detekovány cytoplazmě myších osteocytů, zase zejména v perinukleární oblasti, nikoliv však v samotném jádře. Oproti tomu Asharani *et al.*, (2009b) prokázali přítomnost NP Ag (6 a 20 nm) uvnitř mitochondrií a jádra buněk lidských plicních fibroblastů a lidského glioblastomu, což může vést k přímému poškození DNA. Transport NP do jádra nemusí být tedy ovlivněn pouze jejich velikostí.

Obecně savčí buňky interagují s NP podobným způsobem. Jejich toxicita je často spojována s indukcí oxidačního stresu (Bartłomiejczyk *et al.*, 2013). Růst ROS po aplikaci NP byl prokázán v řadě studií (Asharani *et al.*, 2009a; Braydich-Stolle *et al.*, 2010, Carlson *et al.*, 2008; Miura *et* Shinohara, 2009; Vrček *et al.*, 2014). Všechny námi studované NP měly také významný vliv na tvorbu ROS u všech buněčných linií. Nejvyšší hladiny ROS byly zaznamenány po aplikaci NP TiO₂. Nejvyšší míra fragmentace DNA a apoptózy byla zaznamenána po aplikaci vzorku NP TiO₂ na buněčnou linii NIH 3T3. Oxidační poškození buněk hraje zřejmě u vzorků NP TiO₂

Přímá korelace mezi produkcí ROS a oxidačním poškozením DNA byla popsána také ve studii Shukla *et al.*, (2011) po aplikaci NP TiO₂ na lidské epidermální buňky. ROS zde vedly dále k peroxidaci lipidů, poškození membrán, mitochondrií a následné apoptóze (Shukla *et al.*, 2011). Ve studii Periasamy *et al.*, 2015 byl sledován vliv NP TiO₂ extrahovaných z běžně dostupných potravinářských výrobků na lidské fibroblasty. Po aplikaci NP TiO₂ na buňky bylo zaznamenáno zvýšení hladiny intracelulárních ROS, vyšší poškození mitochondriálních membrán, zvýšení exprese cytochromu P450 1A, GSTM3, glutathion S-transferázy A4 a změny stádia buněčného cyklu (Periasamy *et al.*, 2015). Tyto výsledky poukazují také na význam oxidačního stresu v případě toxicity NP TiO₂. Vliv oxidačního stresu vyvolaného NP TiO₂ byl

prokázán i v *in vivo* studiích (Meena *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2010; Trouiller *et al.*, 2009). Například ve studii Meena *et al.*, (2015), kde byly sledovány potenciální účinky NP TiO₂ na reprodukční systém krys, způsobil oxidační stres po aplikaci NP TiO₂ cytotoxické a genotoxické změny spermií (Meena *et al.*, 2015).

Nicméně v případě komerčních NP Ag výsledky poškození DNA nekorespondují s produkcí ROS. Zvýšená cytotoxicita, poškození DNA a poškození mitochondrií bez přítomnosti buněčného oxidačního stresu byly zaznamenány ve studii Sahu *et al.*, (2014) po aplikaci NP Ag na lidské hepatocyty HepG2 a lidské enterocyty Caco2. Po penetraci NP Ag do eukaryotních buněk zřejmě dochází k aktivaci antioxidačních mechanismů, které chrání buňky před možným oxidačním poškozením (Arora *et al.*, 2009). V *in vivo* studii Blanco *et al.*, 2018 byl sledován vliv perorálně podávaných NP Ag krysám. V jaterních buňkách byla zaznamenána zvýšená aktivita enzymů kalalázy, superoxid dismutázy, zvýšená hladina proteinů IRS-1, AKT, mTOR, p53, p21 a kaspázy 3, které se podílí na antioxidační ochraně buněk a zachování integrity DNA (Blanco *et al.*, 2018).

Další *in vitro* studie naznačují, že cytotoxicita NP Ag má spojitost s intracelulárním uvolňováním Ag⁺ z NP Ag. (Kittler *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010b; George *et al.*, 2012). Singh a Ramarao (2012) zjistili, že k intracelulárnímu rozpouštění NP Ag dochází dokonce 50krát rychleji než ve vodě (Singh *et* Ramarao 2012). Avšak v našich výsledcích byl při porovnání vlivu Ag⁺ a synt. NP Ag na poškození DNA zaznamenán mnohem výraznější účinek synt. NP Ag, zejména u buněčné linie NIH 3T3 v rozporu s výsledky produkce ROS. Tyto výsledky s největší pravděpodobností souvisí s akumulací NP Ag v jádře buněk NIH 3T3. Je známo, že NP Ag mohou přímo interagovat s DNA a následně způsobit její poškození (McShan *et al.*, 2014). Rahban *et al.* (2010) zjistili, že interakcí NP Ag s dvoušroubovicí DNA dochází k tvorbě komplexu, což zvyšuje její teplotu tání. Tento typ vazby může způsobit změnu v konformaci DNA. Dále mohou NP Ag působit jako interkalátor, což vede ke změně orientace bází (Rahban *et al.*, 2010). Toxicita NP Ag tedy souvisí nejen s produkcí ROS a uvolňováním Ag⁺, ale pravděpodobně i s přímou interakcí NP s biologickými makromolekulami (Bartłomiejczyk *et al.*, 2013).

Ve studii Poon *et* Burd (2004) byl sledován cytotoxický účinek stříbra na keratinocytech a fibroblastech. Zdrojem stříbra bylo stříbro uvolněno z roztoku dusičnanu stříbrného a nanokrystalické stříbro uvolněné z komerčně dostupného obvazu. Po aplikaci stříbra na buněčné linie byla zaznamenána vyšší citlivost

81

fibroblastů oproti keratinocytům (Poon *et* Burd, 2004). Bylo také prokázáno, že NP Ag po penetraci do fibroblastů, způsobily poškození DNA a následnou apoptózu (Arora *et al.*, 2009). Tyto výsledky potvrzují naši hypotézu možného přímého poškození DNA vlivem NP Ag, a to v souvislosti s typem použité buněčné linie. V našich *in vitro* experimentech byly použity tři typy buněčných linií (lidské fibroblasty BJ, myší fibroblasty NIH 3T3 a lidské keratinocyty SVK 14). Vyšší cytotoxický účinek byl zaznamenán po aplikaci NP Ag než po aplikaci NP TiO₂. Je zajímavé, že dle výsledků testu životnosti je buněčná linie SVK 14 nejcitlivější na NP TiO₂ a buněčná linie NIH 3T3 je nejcitlivější na NP Ag a Ag⁺. Vyšší kinetická produkce ROS (všechny studované NP a Ag⁺), zvýšené poškození DNA (NP TiO₂, synt. NP Ag a Ag⁺) a vyšší počet apoptotických buněk (všechny studované NP a Ag⁺) byly detekovány u fibroblastů. Z výsledků je patrná souvislost, jak s použitou buněčnou linií, tak s typem a vlastnostmi NP.

Přestože se NP vyskytují v komerčních výrobcích v nízké koncentraci, která neohrožuje živé organismy akutní toxicitou, objevuje se obava z možné akumulace v životním prostředí a také živých organismech, kde by mohlo dojít k toxicitě chronické. Z toho důvodu je důležité studovat možné nežádoucí účinky NP a vyvíjet nové metody a postupy k posouzení jejich toxicity.

9. Závěr

NP Ag a NP TiO₂ nacházejí díky svým specifickým vlastnostem široké praktické využití v běžném životě, proto se postupně stávají součástí našeho životního prostředí. Mechanismus jejich účinku na živé organismy však zatím nebyl zcela objasněn, tudíž je v současné době jejich potencionální toxicita intenzivně studována.

V rámci této práce byly charakterizovány komerční vzorky NP Ag a NP TiO₂, přičemž bylo zjištěno, že výrobci nedodrželi deklarovanou velikost a koncentraci NP. Dále byla potvrzena penetrace všech studovaných NP (komerčních NP Ag, NP TiO₂ a synt. NP Ag) do buněk. U studovaných NP byla zaznamenána míra buněčného poškození v závislosti na použité koncentraci. NP Ag vykazovaly vyšší cytotoxické účinky, u NP TiO₂ byla detekována vyšší míra poškození DNA. Přestože je specifikace NP důležitá k posouzení jejich toxicity, výrobce nedodržel u studovaných komerčních vzorků deklarované parametry. Vzhledem k širokému použití NP v produktech určených ke každodennímu použití, včetně výrobků pro děti, je velmi důležité zabývat se studiem jejich negativních účinků. S tím souvisí i vývoj a aplikace nových metod a postupů.

Věřím, že tato práce přispěla k hlubšímu pochopení interakcí NP Ag, NP TiO₂ a savčích buněk. Mimo klasických metod studia buněčného poškození byly ke kvantitativnímu a kvalitativní vyhodnocení buněčné penetrace NP a jejich charakterizaci použity moderní mikroskopické a spektroskopické techniky. V budoucnu je však třeba provést také *in vivo* experimenty vedoucí ke komplexnějším znalostem účinků NP na biologické systémy.

Práce poukazuje na rizika spojená s potencionální toxicitou NP při jejich častém používání v praxi a přináší ucelený pohled na tuto problematiku. Přestože mnoho vědeckých prácí na tato rizika upozorňje, nejsou výrobky s NP dostatečně specifikovány a jejich produkce stále roste. Díky možné akumulaci NP jsou ohroženy nejen živé organismy, ale celé životní prostředí.

83

Seznam použité literatury

Alexander, J. W. (2009). History of the medical use of silver. Surgical infections, 10(3), 289-292.

Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., Paknikar, K. M. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. Toxicology and applied pharmacology, 236(3), 310-318.

Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., Brunborg, G. (2012). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. Toxicology, 291(1-3), 65-72.

Asharani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., Valiyaveettil, S. (2009a). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS nano, 3(2), 279-290.

Asharani, P. V., Hande, M. P., Valiyaveettil, S. (2009b). Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. BMC cell biology, 10(1), 65.

Barabaszová Č, K. (2014), Mikroskopické metody analýzy materiálů a nanomateriálůpraktická část. In: Praktické příklady analýzy materiálů a nanomateriálů. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 6-16. ISBN 978-80-248-3571-6.

Barber, D. J., Freestone, I. C. (1990). An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*, *32*(1), 33-45.

Bartlomiejczyk, T., Lankoff, A., Kruszewski, M., Szumiel, I. (2013). Silver nanoparticles–allies or adversaries?. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 20(1).

Bhatt, I., Tripathi, B. N. (2011). Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. Chemosphere, 82(3), 308-317.

Blanco, J., Tomás-Hernández, S., García, T., Mulero, M., Gómez, M., Domingo, J. L., Sánchez, D. J. (2018). Oral exposure to silver nanoparticles increases oxidative stress markers in the liver of male rats and deregulates the insulin signalling pathway and p53 and cleaved caspase 3 protein expression. Food and Chemical Toxicology, 115, 398-404.

Boisselier, E., Astruc, D. (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. Chemical society reviews, 38(6), 1759-1782.

Boncler, M., Różalski, M., Krajewska, U., Podsędek, A., Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. Journal of pharmacological and toxicological methods, 69(1), 9-16.

Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., Prato, M. (2003). Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. European journal of medicinal chemistry, 38(11-12), 913-923.

Braydich-Stolle, L. K., Lucas, B., Schrand, A., Murdock, R. C., Lee, T., Schlager, J. J., Hussain, S. M., Hofmann, M. C. (2010). Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. Toxicological sciences, 116(2), 577-589.

Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases, 2(4), MR17-MR71.

Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K. L., Jones, R. L., Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: sizedependent generation of reactive oxygen species. The journal of physical chemistry B, 112(43), 13608-13619. Cleveland, D., Long, S. E., Pennington, P. L., Cooper, E., Fulton, M. H., Scott, G. I., Brewer, T., Davis, J., Petersen, E. J., Wood, L. (2012). Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of silver nanomaterials leached from consumer products. Science of the Total Environment, 421, 267-272.

Costley, C. T., Mossop, K. F., Dean, J. R., Garden, L. M., Marshall, J., Carroll, J. (2000). Determination of mercury in environmental and biological samples using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold amalgamation. Analytica Chimica Acta, 405(1-2), 179-183.

Daer, S., Kharraz, J., Giwa, A., Hasan, S. W. (2015). Recent applications of nanomaterials in water desalination: a critical review and future opportunities. Desalination, 367, 37-48.

Damm, C., Münstedt, H., Rösch, A. (2008). The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano-and microcomposites. Materials Chemistry and Physics, 108(1), 61-66.

Dennler, G., Scharber, M. C., Brabec, C. J. (2009). Polymer-fullerene bulkheterojunction solar cells. Advanced materials, 21(13), 1323-1338.

Derfus, A. M., Chan, W. C., Bhatia, S. N. (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. Nano letters, 4(1), 11-18.

Dobrzyńska, M. M., Gajowik, A., Radzikowska, J., Lankoff, A., Dušinská, M., & Kruszewski, M. (2014). Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo. Toxicology, 315, 86-91.

Dohnalová, L., Dohnal, V. (2015). Nanočástice a jejich toxicita. Chem. Listy, 109(6), 444-450.

Dolníček, Z., Sulovský, P. (2013). Laboratorní metody výzkumu. Univerzita Palackého v Olomouci.

Duguet, E., Vasseur, S., Mornet, S., Devoisselle, J. M. (2006). Magnetic nanoparticles and their applications in medicine.

Dvořák, M., Urbanová, P., Matejovičová, M. (2014). Chem. Listy 108, 1149-1152.

Eaton, P., West, P. (2010). Atomic force microscopy. Oxford University Press.

Edwards, P. P., Thomas, J. M. (2007). Gold in a Metallic Divided State—From Faraday to Present-Day Nanoscience. Angewandte Chemie International Edition, 46(29), 5480-5486.

Egerton, R. F. (2005). Physical principles of electron microscopy (p. 41). New York: Springer.

Eruslanov, E., Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In Advanced protocols in oxidative stress II (pp. 57-72). Humana Press, Totowa, NJ.

Fahmi, T., Branch, L. D., Nima, Z. A., Jang, D. S., Savenka, A. V., Biris, A. S., Basnakian, A. G. (2017). Mechanism of graphene-induced cytotoxicity: Role of endonucleases. Journal of Applied Toxicology, 37(11), 1325-1332.

Farinacci, M. (2007). Improved apoptosis detection in ovine neutrophils by annexin V and carboxyfluorescein diacetate staining. Cytotechnology, 54(3), 149-155.

Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., Venketesan, R. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 6(1), 103-109.

Fröhlich, E., Roblegg, E. (2012). Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. Toxicology, 291(1-3), 10-17.

García, R., & Báez, A. P. (2012). Atomic absorption spectrometry (AAS). In Atomic absorption spectroscopy. InTech.

George, S., Lin, S., Ji, Z., Thomas, C. R., Li, L., Mecklenburg, M., Meng, H., Wang, X., Zhang, H., Xia, T., Hohman, J. N. (2012). Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish gill cell line and zebrafish embryos. ACS nano, 6(5), 3745-3759.

Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C., Mirkin, C.A. (2010). Gold nanoparticles for biology and medicine. Angewandte Chemie International Edition, 49(19), 3280-3294.

Grégr, J. (2004). Moderní pohled na formy a modifikace uhlíku. Technická Univerzita v Liberci.

Greulich, C., Diendorf, J., Simon, T., Eggeler, G., Epple, M., Köller, M. (2011). Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. Acta biomaterialia, 7(1), 347-354.

Grillo, R., Rosa, A. H., Fraceto, L. F. (2015). Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art. Chemosphere, 119, 608-619.

Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials, 26(18), 3995-4021.

Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Hagen, R, Kleinsasser, N. (2011). Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. Toxicology letters, 201(1), 27-33.

Hafner, J. H., Cheung, C. L., Woolley, A. T., Lieber, C. M. (2001). Structural and functional imaging with carbon nanotube AFM probes. Progress in biophysics and molecular biology, 77(1), 73-110.

Han, M., Gao, X., Su, J. Z., Nie, S. (2001). Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. Nature biotechnology, 19(7), 631.

Harris, A. T., Bali, R. (2008). On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. Journal of Nanoparticle Research, 10(4), 691-695.

Hassan, P. A., Rana, S., Verma, G. (2014). Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. Langmuir, 31(1), 3-12.

Hermanson, G. T. (2013). Bioconjugate techniques. Academic press.

Hirsch, A. (2002). Functionalization of single-walled carbon nanotubes. Angewandte Chemie International Edition, 41(11), 1853-1859.

Hlaváček, A., Skládal, P. (2011). Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. Chem. Listy, 105, 611-615.

Hobzová, R., Peter, J., Sysel, P. (2008). Hypervětvené polymery. Chem. Listy, 102, 906-913.

Hochmannova, L., Vytřasová, J. (2010). Effect of TiO₂ and ZnO Nanoparticles on Photocatalytic and Antimicrobial Activities of Silicate Coatings. Chemické listy, 104(10), 940-944.

Hoet, P. H., Brüske-Hohlfeld, I., Salata, O. V. (2004). Nanoparticles–known and unknown health risks. Journal of nanobiotechnology, 2(1), 12.

Horáková, J., Tománková, K., Harvanová, M., Hradilová, S., Mašek, V., Malohlava, J., Malina, L., Manišová, B., Kejlová, K., Jírová, D., Kolářová, H., 2014. Study of the penetration of silver nanoparticles into SVK14 cells. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), Microscopy: Advances in Scientific Research and Education 6, 2. Formatex, Badajoz, Spain, pp. 173e178.

Chairuangkitti, P., Lawanprasert, S., Roytrakul, S., Aueviriyavit, S., Phummiratch, D., Kulthong, K., Chanvorachote, P., Maniratanachote, R. (2013). Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. Toxicology in vitro, 27(1), 330-338.

Chan, W. C., Maxwell, D. J., Gao, X., Bailey, R. E., Han, M., Nie, S. (2002). Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. Current opinion in biotechnology, 13(1), 40-46.

Charurvedi, S., Dave, P. N. (2012). Microscopy in Nanotechnology.

Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., Bergamaschi, A. (2011). Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 15(5), 481-508.

Indira, T. K., & Lakshmi, P. K. (2010). Magnetic nanoparticles–a review. Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol, 3(3), 1035-1042.

Jain, T. K., Reddy, M. K., Morales, M. A., Leslie-Pelecky, D. L., Labhasetwar, V. (2008). Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. Molecular pharmaceutics, 5(2), 316-327.

Jain, N., Bhargava, A., Majumdar, S., Tarafdar, J. C., Panwar, J. (2011). Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using Aspergillus flavus NJP08: a mechanism perspective. Nanoscale, 3(2), 635-641.

Jalili, N., Laxminarayana, K. (2004). A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. Mechatronics, 14(8), 907-945.

Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M., Seifalian, A. M. (2007). Biological applications of quantum dots. Biomaterials, 28(31), 4717-4732. Janssen, R. A., Hummelen, J. C., Sariciftci, N. S. (2005). Polymer–fullerene bulk heterojunction solar cells. MRS bulletin, 30(1), 33-36.

Jiravová, J., Tomanková, K. B., Harvanová, M., Malina, L., Malohlava, J., Luhová, Panacek, A., Manišová, B., Kolářová, H. (2016). The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells *in vitro*. Food and Chemical Toxicology, 96, 50-61.

Kam, N. W. S., O'Connell, M., Wisdom, J. A., Dai, H. (2005). Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(33), 11600-11605.

Kim, J. S., Yoon, T. J., Yu, K. N., Kim, B. G., Park, S. J., Kim, H. W., Lee, K. H., Park,S. B., Lee, J. K., Cho, M. H. (2005). Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. Toxicological Sciences, 89(1), 338-347.

Kim, K. J., Sung, W. S., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., Lee, D. G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. J Microbiol Biotechnol, 18(8), 1482-1484.

Kim, S. W., Kim, K. S., Lamsal, K., Kim, Y. J., Kim, S. B., Jung, M., Sim, S. J., Kim, H. S., Chang, S. J., Kim, J. K., Lee, Y. S. (2009). An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. J Microbiol Biotechnol, 19(8), 760-764.

Kim, H., Abdala, A. A., Macosko, C. W. (2010). Graphene/polymer nanocomposites. Macromolecules, 43(16), 6515-6530.

Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Koller, M., Epple, M. (2010). Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. Chemistry of Materials, 22(16), 4548-4554.

Kobayashi, N., Izumi, H., Morimoto, Y. (2017). Review of toxicity studies of carbon nanotubes. Journal of occupational health, 59(5), 394-407.

Köhler, A. R., Som, C., Helland, A., Gottschalk, F. (2008). Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. Journal of Cleaner Production, 16(8-9), 927-937.

Komínková, J., Mestek, O. (1997). Atomová absorpční spektrometrie. Návod pro laboratorní cvičení. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha.

Koplík, R., Čurdová, E., Mestek, O. (1997). Speciace stopových prvků ve vodách, půdách, sedimentech a biologických materiálech. Chem. Listy, 91(38), 38-47.

Kroemer, G., Mariño, G., Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. Molecular cell, 40(2), 280-293.

Kubínek, R., Vůjtek, M., Holubová, R. (2001). Mikroskopie atomárních sil. Matematika, fyzika, informatika, 9(10), 536-546.

Kučírková, L., Královec, K., Havelek, R., Brůčková, L., Sedlák, M. (2015). Toxicita magnetických nanočástic. Chem. Listy, 109, 693-700.

Kvítek, L., Novotný, R., Pikal, P. (1998). Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. Chemické listy, 92(5), 431-433.

Kvítek, L. (2006). Metody studia koloidních soustav. Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc.

Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., Jha, A. N. (2009). Comet assay measurements: a perspective. Cell biology and toxicology, 25(1), 53-64.

Laurent, C., Flahaut, E., Peigney, A. (2010). The weight and density of carbon nanotubes versus the number of walls and diameter. Carbon, 48(10), 2994-2996.

Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., Low, S. C. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. Nanoscale research letters, 8(1), 381.

Liu, F., Wu, J., Chen, K., Xue, D. (2010a). Morphology study by using scanning electron microscopy. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education, 1781-1792.

Liu, J., Sonshine, D. A., Shervani, S., Hurt, R. H. (2010b). Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. ACS nano, 4(11), 6903-6913.

Liu, J., Gray, W. D., Davis, M. E., Luo, Y. (2012). Peptide-and saccharide-conjugated dendrimers for targeted drug delivery: a concise review. Interface Focus, 2, 307–324.

López-Heras, I., Madrid, Y., Cámara, C. (2014). Prospects and difficulties in TiO_2 nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. Talanta, 124, 71-78.

Lövestam, G., Rauscher, H., Roebben, G., Klüttgen, B. S., Gibson, N., Putaud, J. P., Stamm, H. (2010). Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. Joint Research Centre (JRC) Reference Reports, 80004-1.

Ma, H. L., Qi, X. R., Ding, W. X., Maitani, Y., Nagai, T. (2008). Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 84(3), 598-606.

Mahmood, M., Casciano, D. A., Mocan, T., Iancu, C., Xu, Y., Mocan, L., Iancu, C., Xu, Y., Mocan, L., Iancu, D. T., Dervishi, E., Li, Z., Abdalmuhsen, M., Biris, A. R., Ali, N., Howard, P., Biris, A. R. (2010). Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. Journal of Applied Toxicology, 30(1), 74-83.

Marambio-Jones, C., Hoek, E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research, 12(5), 1531-1551.

Mayoral, A., Barron, H., Estrada-Salas, R., Vazquez-Duran, A., José-Yacamán, M. (2010). Nanoparticle stability from the nano to the meso interval. Nanoscale, 2(3), 335-342.

McShan, D., Ray, P. C., Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. Journal of food and drug analysis, 22(1), 116-127.

Meena, R., Kajal, K., Paulraj, R. (2015). Cytotoxic and genotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles in testicular cells of male wistar rat. Applied biochemistry and biotechnology, 175(2), 825-840.

Miletín, M. (2011). Prostředky na ochranu pokožky proti škodlivým vlivům UV záření. Praktické lékárenství, 7(1), 34-38.

Milisav, I. (2011). Cellular stress responses. In Advances in regenerative medicine. InTech, 215-232.

Miura, N., Shinohara, Y. (2009). Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. Biochemical and biophysical research communications, 390(3), 733-737.

Monica, R. C., Cremonini, R. (2009). Nanoparticles and higher plants. Caryologia, 62(2), 161-165.

Morose, G. (2010). The 5 principles of "design for safer nanotechnology". Journal of cleaner production, 18(3), 285-289.

Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J. F., Delos, M., Arrasa, M., Fonsecab, A., Nagy, J. B, Lison, D. (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. Toxicology and applied pharmacology, 207(3), 221-231.

Navrátil, L. (2005). Medicínská biofyzika. Grada.

Neal, A. L. (2008). What can be inferred from bacterium–nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?. Ecotoxicology, 17(5), 362.

Nováková, T., Šváb, M., Švábová, M. (2009). Využití nanočástic v dekontaminačních technologiích: současný stav. Chem. Listy, 103(7), 524-532.

Novotná, B., Svobodová, L., Čechová, M., Jarolím, L., Chocholatý, M., Bagryantseva, Y., Macek, M., Macek M. Jr. (2016). Naše první zkušenosti s využitím kometového testo při hodnocení integrity DNA ve spermiích. Ces Urol 2016; 20(4): 317–325.

Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and fibre toxicology, 2(1), 8.

Panáček, A., Kvitek, L., Prucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., Sharma, V. K, Nevěčná, T., Zbořil, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. The Journal of Physical Chemistry B, 110(33), 16248-16253.

Panáček, A., Kolář, M., Večeřová, R., Prucek, R., Soukupová, J., Kryštof, V., Hamal,
P., Zbořil, R., Kvítek, L. (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. Biomaterials, 30(31), 6333-6340.

Panáček, A., Smékalová, M., Kilianová, M., Prucek, R., Bogdanová, K., Večeřová, R., Kolář, M., Havrdová, M., Płaza, G. A., Chojniak, J., Zbořil, R., Kvítek, L. (2015). Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. Molecules, 21(1), 26.

Panáček, A., Smékalová, M., Večeřová, R., Bogdanová, K., Röderová, M., Kolář, M., Kilianová, M., Hradilová, Š., Froninga, J. P., Havrdová, M., Prucek, R., Zbořil, R., Kvítek, L. (2016). Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 142, 392-399.

Patel, H. N., Patel, P. M. (2013). Dendrimer applications–a review. Int J Pharm Bio Sci, 4(2), 454-463.

Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., Al-Hadi, A. M., Al Juhaimi, F., Alshatwi, A. A. (2015). Effects of titanium dioxide nanoparticles isolated from confectionery products on the metabolic stress pathway in human lung fibroblast cells. Archives of environmental contamination and toxicology, 68(3), 521-533.

Pinto, V. V., Ferreira, M. J., Silva, R., Santos, H. A., Silva, F., Pereira, C. M. (2010). Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: effect of the synthesis and storage conditions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 364(1-3), 19-25.

Poon, V. K., Burd, A. (2004). *In vitro* cytotoxity of silver: implication for clinical wound care. Burns, 30(2), 140-147.

Prabhu, S., Poulose, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. International nano letters, 2(1), 32.

Prado, M., Lima, L. C., Simão, R. A. (2012). Scale laws for AFM image evaluation: potentialities and applications. Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology, 1(2), 923-929.

Prášek, J. (2011). Uhlíkové nanočástice: Grafen, nanotrubice, fullereny. Brno: VÚT Brno.

Qian, Z. M., Li, H., Sun, H., Ho, K. (2002). Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. Pharmacological reviews, 54(4), 561-587.

Rahban, M., Divsalar, A., Saboury, A. A., Golestani, A. (2010). Nanotoxicity and spectroscopy studies of silver nanoparticle: Calf thymus DNA and K562 as targets. The Journal of Physical Chemistry C, 114(13), 5798-5803.

Reiss, P., Protiere, M., Li, L. (2009). Core/shell semiconductor nanocrystals. Small, 5(2), 154-168.

Rostron, P., Gaber, S., Gaber, D. (2016). Raman Spectroscopy, Review. laser, 21, 24.

Řezanka, P., Záruba, K., Král, V. (2007). Potenciál modifikovaných nanočástic v analytické chemii. Chem. Listy, 101, 881-885.

Řezníčková, A., Novotná, Z., Kolská, Z., Ulbrich, P., Švorčík, V. (2014). Příprava, funkcionalizace a roubování nanočástic ušlechtilých kovů na aktivovaný polymer. Chem. Listy, 108, 865-874.

Sadik, O. A. (2013). Anthropogenic nanoparticles in the environment. Environmental Science: Processes & Impacts, 15(1), 19-20.

Sahu, S. C., Zheng, J., Graham, L., Chen, L., Ihrie, J., Yourick, J. J., Sprando, R. L. (2014). Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells in culture. Journal of Applied Toxicology, 34(11), 1155-1166.

Saleh, T. A. (2017). Pharmaceutical characterization and detection using surfaceenhanced Raman scattering. Int Arch Clin Pharmacol, 3(1).

Sanchez, V. C., Jachak, A., Hurt, R. H., Kane, A. B. (2011). Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. Chemical research in toxicology, 25(1), 15-34.

Sardans, J., Montes, F., Peñuelas, J. (2010). Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 65(2), 97-112.

Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. Advances in colloid and interface science, 145(1-2), 83-96.

Shen, H., Zhang, L., Liu, M., Zhang, Z. (2012). Biomedical applications of graphene. Theranostics, 2(3), 283.

Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Particle and fibre toxicology, 10(1), 15.

Shin, J. A., Lee, E. J., Seo, S. M., Kim, H. S., Kang, J. L., Park, E. M. (2010). Nanosized titanium dioxide enhanced inflammatory responses in the septic brain of mouse. Neuroscience, 165(2), 445-454.

Shukla, R. K., Sharma, V., Pandey, A. K., Singh, S., Sultana, S., Dhawan, A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. Toxicology in vitro, 25(1), 231-241.

Siegel, J., Staszek, M., Švorčík, V. (2014). Nanočástice ušlechtilých kovů připravené v kapalinách. Chem. Listy, 108, 1102-1112.

Singh, R. P., Ramarao, P. (2012). Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. Toxicology letters, 213(2), 249-259.

Singh, U., Dar, M. M., Hashmi, A. A. (2014). Dendrimers: synthetic strategies, properties and applications. Oriental Journal of Chemistry, 30(3), 911-922.

Spěváčková, V., Knotková, J. (1998). Prvková analýza klinických materiálů – aplikace elektrotermické atomové absorpční spektrometrie. Chem. Listy, 92(4), 287-293.

Sun, X., Liu, Z., Welsher, K., Robinson, J. T., Goodwin, A., Zaric, S., Dai, H. (2008). Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. Nano research, 1(3), 203-212.

Svoboda, J., Syslová, K., Kačer, P. (2016). Cílený transport platinových cytostatik. Chem. Listy, 110, 909-916.

Ševčíková, P., Kašpárková, V., Krejčí, J., Vltavská, P. (2014). Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. Chem. Listy, 108, 479-482.

Šrámek, J. (2009). Nanotechnologie v medicíně. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta–Biofyzikální ústav.

Švorčík, V., Kvítek, O., Lyutakov, O., Siegel, J., Kolská, Z. (2011). Annealing of sputtered gold nano-structures. Applied Physics A, 102(3), 747-751.

Tang, R., Shi, Y., Hou, Z., Wei, L. (2017). Carbon nanotube-based chemiresistive sensors. Sensors, 17(4), 882.

Tománková, K., Horáková, J., Harvanová, M., Malina, L., Soukupová, J., Hradilová, Š., Kejlova, K., Malohlava, J., Licman, L., Dvořáková, M., Jírová, D., Kolářová, H. (2015). Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles *in vitro*. Food and chemical toxicology, 82, 106-115.

Tománková, K., Kejlová, K., Binder, S., Dašková, A., Zapletalová, J., Bendová, H., Kolářová, H., Jírová, D. (2011). *In vitro* cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. Toxicology in Vitro, 25(6), 1242-1250.

Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., Schiestl, R. H. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. Cancer research, 69(22), 8784-8789.

Tsalev, D. L. (2011). Atomic absorption spectrometry (flame, electrothermal, vapour generation) in environmental, biological and food analysis. In Environmental Heavy

Metal Pollution and Effects on Child Mental Development, Springer, Dordrecht, 171-202.

Vaculíková, E., Plachá, D., Jampílek, J. (2015). Toxikologie nanoforem nosičů léčiv. Chem. Listy 109, 346–352.

Vairavapandian, D., Vichchulada, P., Lay, M. D. (2008). Preparation and modification of carbon nanotubes: Review of recent advances and applications in catalysis and sensing. Analytica chimica acta, 626(2), 119-129.

Valášek, P. (2012). Využití Ramanovy spektroskopie pro identifikaci inkoustů na českých bankovkách a jejich padělcích. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

Večeřová, R. (2016). Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita. Klinická farmakologie a farmacie, 30(3), 18-20.

Vidu, R., Rahman, M., Mahmoudi, M., Enachescu, M., Poteca, T. D., Opris, I. (2014). Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation. Frontiers in systems neuroscience, 8, 91.

Vrček, I. V., Žuntar, I., Petlevski, R., Pavičić, I., Dutour Sikirić, M., Ćurlin, M., Goessler, W. (2016). Comparison of *in vitro* toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. Environmental toxicology, 31(6), 679-692.

Wang, J. J., Sanderson, B. J., Wang, H. (2007). Cyto-and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 628(2), 99-106.

Wang, Z., Xia, T., Liu, S. (2015). Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effects. Nanoscale, 7(17), 7470-7481.

Watt, I. M. (1997). The principles and practice of electron microscopy. Cambridge University Press.

Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., Von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. Environmental science & technology, 46(4), 2242-2250.

Wolf, R., Matz, H., Orion, E., Lipozencic, J. (2003). Sunscreens - the ultimate cosmetic. Acta Dermatovenerol Croat, 11(3), 158-162.

Yildirim, T., Gülseren, O., Kılıç, Ç., Ciraci, S. (2000). Pressure-induced interlinking of carbon nanotubes. Physical Review B, 62(19), 12648-12651.

Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. International journal of molecular sciences, 17(9), 1534.

Zieba–Palus, J. (1998). Examination of used motor oils by flame AAS for criminalistic purposes: a diagnostic study. Forensic science international, 91(3), 171-179.

Žůrek, M., Kopel, P., Hynek, D., Adam, V., Kizek, R. (2014). Zelená syntéza stříbrných a zlatých nanočástic pomocí extraktů z vyšších rostlin. Journal of Metallomics and Nanotechnologies, 1, 47-49.

Internetové zdroje:

https://britishmuseum.tumblr.com/post/120689869617/the-lycurgus-cup

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biosph%C3%A8re_Montr%C3%A9al.jpg

http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/D/STAAD.htm

https://www.jeol.co.jp/en/science/sem.html

http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf

http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/povrchy/metoda/afm-principy

https://cs.wikipedia.org/wiki/Fullereny

https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm

Publikační činnost autora

Vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Perlovská Harvanová M., Malohlava J., **Jiravová J**., Bartoň Tománková K., Kolářová H. (2017) Raman imaging of cellular uptake and studies of silver nanoparticles effect in BJ human fibroblasts cell lines, International Journal of Pharmaceutics, 528(1-2), IF: 3.649.

Jiravová J., Bartoň Tománková K., Harvanová M., Malina L., Malohlava J., Luhová L., Panáček A., Manišová B., Kolářová H. (2016) The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro, Food And Chemical Toxicology, 96, 50-61, IF: 3.58.

Malina L., Bartoň Tománková K., Malohlava J., **Jiravová J**., Manišová B., Zapletalová J., Kolářová H. (2016). The *in vitro* cytotoxicity of metal-complexes of porphyrin sensitizer intended for photodynamic therapy. Toxicology in Vitro, 34, 246-256. IF 3,338.

Malohlava J., Bartoň Tománková K., Malina L., **Jiravová J.**, Hanáková A., Pižová K., Zapletalová J., Kolářová H. (2016). Effect of porhyrin sensitizer MgTPPS4 on cytoskeletal systém of HeLa cell line – microscopic study. Cell Biochemistry and Biophysics, 74, 419-425. IF 1,627.

Tománková, K., **Horáková, J**., Harvanová, M., Malina, L., Soukupová, J., Hradilová, Š., Kejlova, K., Malohlava, J., Licman, L., Dvořáková, M., Jírová, D., Kolářová, H. (2015). Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles *in vitro*. Food and chemical toxicology, 82, 106-115, IF: 3.584.

Tománková K., Poláková K., Pižová K., Binder S., Havrdová M., Kolářová M., Kriegová E., Zapletalová J., Malina L., **Horáková J**., Malohlava J., Kolokithas-Ntoukas A., Bakndritsos A., Kolářová H., Zbořil R. (2015). *In vitro* cytotoxicity analysis of doxorubicinloaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. International Journal of Nanomedicine, 10, 949-961. IF 4,383.

Tománková K., Kolářová H., Pižová K., Binder S., Konečný P., Kriegová E., Malina L. **Horáková J.**, Malohlava J., Kejlová K., Jírová D. (2014). Cytotoxicity and antioxidative effects of herbal and fruit extracts *in vitro*. Food Biophysics, 9, 267-276. IF 1,642.

Kapitoly v monografii

Horáková J., Tománková K., Harvanová M., Hradilová Š., Mašek V., Malohlava J., Malina L., Manišová B., Kejlová K., Jírová D., Kolářová H. Study of the penetration of silver nanoparticles into SVK14 cells. Méndez-Vilas A. ed. Microscopy: advances in scientific research and education. Badajoz: Formatex Research Center, 2014, 173-178. ISBN 978-84-942134-3-4.

Publikace v recenzovaných sbornících z konference

Kolářova H., Tománková K., Harvanová M., **Horáková J**., Malohlava J., Cenklová V., Bajgar R., Kejlová K., Jírová D. (2015). Cell uptake of titanium dioxide nanoparticles, IICBE Int'l Conference International Conference on Medical Genetics, Cellular & Molecular Biology, Pharmaceutical and Food Sciences, str. 140-142, Istambul, Turecko.

Publikace abstrakt ve sbornících

Jiravová, J., Bartoň Tománková, K., Perlovská Harvanová, M Kolářová, H. (2018). Studium mechanismu účinku nanočástic stříbra a oxidu titaničitého *in vitro*. 41. Dny lékařské biofyziky, str. 32, Martin.

Jiravová, J., Harvanová, M., Bartoň Tománková, K., Kolářová, H. (2017). Vliv nanočástic stříbra na lidské fibroblasty. 40. Dny lékařské biofyziky, str. 38, Praha.

Jiravová, J., Bartoň Tománková, K., Harvanová, M., Panáček, A., Kolářová, H. (2016). Studium mechanismu účinku nanočástic stříbra a stříbrných iontů *in vitro*. 39. Dny lékařské biofyziky, str. 36, Piešťany. Horáková, J., Tománková, K., Harvanová, M., Kolářová, H. (2015). Vliv nanočástic stříbra a stříbrných iontů na nenádorové buněčné linie *in vitro*. 38. Dny lékařské biofyziky, str. 19, Staré Splavy.