

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Příprava a studium biologické aktivity uhlíkových kvantových teček  
Kristina Zavřelová

Bakalářská práce  
2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristina Zavřelová**  
Osobní číslo: **C16304**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Příprava a studium biologické aktivity uhlíkových kvantových teček**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Na základě literární rešerše popište současný stav poznání o možnostech přípravy, vlastnostech a biologické aktivitě kvantových teček.

Standardizujte metodu přípravy uhlíkových kvantových teček pomocí pyrolýzy kyseliny citrónové.

Připravené uhlíkové tečky charakterizujte pomocí dostupných analytických metod.

Osvojte si techniky práce s buněčnou linií MOLT-4 a proveďte stanovení cytotoxicity teček pomocí WST-1 testu.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.**

Katedra obecné a anorganické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Aneta Machálková**

Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek

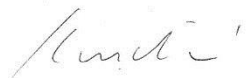
Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 26. 6. 2019

Kristina Zavřelová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Jaromíru Vinclárkovi, Dr. za jeho odborné vedení, cenné rady, trpělivost a celkovou pomoc při vypracování bakalářské práce, Ing. Anetě Machálkové za ochotu a poskytnutou pomoc s prací v laboratoři na Katedře obecné a anorganické chemie Univerzity Pardubice. Dále Ing. Ondřeji Mrózkovi za provedená měření infračervených spekter, Mgr. Lucii Melounkové za pomoc s prací v laboratoři v Ústavu lékařské biochemie Karlovy univerzity v Hradci Králové.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také mé rodině a přátelům za nepostradatelnou pomoc a podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá využitím kvantových teček jako nosičů cytostaticky aktivních sloučenin. V rámci experimentální části byly připraveny metodou „bottom up“ dva typy uhlíkových kvantových teček. První typ kvantových teček byl připraven pyrolýzou kyseliny citrónové, druhý typ byl připraven pyrolýzou kyseliny citrónové spolu s glycinem. Dále byly připraveny kvantové tečky obsahující biologicky aktivní látku komplex chlorid chloro(diethylentriamino)měďnatý. K charakterizaci byly využity metody EPR spektroskopie, infračervené spektroskopie, optické emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou a také elementární analýza. Testování cytotoxicity vybraných sloučenin bylo provedeno na buněčné linii odvozené od akutní T-lymfoblastické leukemie MOLT-4 pomocí WST-1 testu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kvantové tečky, kyselina citrónová, glycin, měďnatý komplex, MOLT-4

## **TITLE**

Synthesis and study of biological activity of carbon quantum dots.

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the use of quantum dots as a carrier of cytostatically active compounds. In the experimental part were prepared two types of carbon quantum dots by „bottom up“ method. First type of quantum dots was prepared by pyrolysis of citric acid and second type was prepared by pyrolysis of citric acid together with glycine. Furthermore, there were prepared carbon quantum dots which contain biological active compound chloro(diethylentriamine)copper(II) chloride (CuDETA). For characterization was used methods of EPR spectroscopy, infrared spectroscopy, optical emission spectrometry with inductively coupled plasma and elementary analysis. Cytotoxicity testing was performed on a cell line derived from acute T-lymphoblastic leukemia called MOLT-4 by use the WST-1 assay.

## **KEYWORDS**

quantum dots, citric acid, glycine, copper complex, MOLT-4.

# OBSAH

<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>9</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>10</b>
<b>Seznam grafů</b> .....	<b>10</b>
<b>Seznam Schémat</b> .....	<b>10</b>
<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>11</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>1 Teoretická část</b> .....	<b>13</b>
1.1 Nanomateriály .....	13
1.2 Příprava uhlíkových materiálů .....	13
1.3 Uhlíkové kvantové tečky (CQD) .....	13
1.3.1 Vlastnosti CQD .....	14
1.3.2 Využití .....	15
1.4 Biologická aktivita sloučenin mědi .....	18
<b>2 Experimentální část</b> .....	<b>19</b>
2.1 Použité chemikálie, laboratorní materiál a přístroje .....	19
2.2 Použité instrumentální metody .....	20
2.2.1 EPR spektroskopie .....	20
2.2.2 ICP OES .....	20
2.2.3 Elementární analýza (EA) .....	20
2.2.4 Infračervená spektroskopie (IR) .....	21
2.2.5 WST-1 metoda .....	21
2.3 Příprava uhlíkových kvantových teček (CQD) .....	22
2.4 Příprava uhlíkových kvantových teček s glycinem v poměru 1:1 (CQDGly(1:1)) .....	22
2.5 Příprava uhlíkových kvantových teček s glycinem v poměru 1:4 (CQDGly(1:4)) .....	23
2.6 Příprava měďnatého komplexu (CuDETA) .....	23
2.7 Příprava uhlíkových kvantových teček s měďnatým komplexem (CQD – CuDETA) .....	24

2.8	Interakce uhlíkových kvantových teček s glycinem 1:1 a měďnatým komplexem (CQDGly(1:1) – CuDETA) .....	24
2.9	Intrakce uhlíkových kvantových teček s glycinem 1:4 a měďnatým komplexem (CQDGly(1:4) – CuDETA) .....	25
2.10	Stanovení cytotoxicity pomocí WST-1.....	25
2.10.1	Tabulky výsledků.....	26
<b>3</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>28</b>
	Studium cytotoxicity .....	32
	<b>Závěr .....</b>	<b>34</b>
	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>35</b>



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> Syntéza CQD a GO pyrolýzou kyseliny citrónové [4].....	14
<b>Obrázek 2</b> Komplex CuDETA.....	17
<b>Obrázek 3</b> Štěpení tetrazoliové soli na formazan pomocí buněčné dehydrogenázy; NADH: nikotinamidadeninukleotid [27].....	21
<b>Obrázek 4</b> Modrá luminiscence CQD.....	28
<b>Obrázek 5</b> Modrá luminiscence CQDGly(1:1).....	28
<b>Obrázek 6</b> Modrá luminiscence CQDGly(1:4).....	29
<b>Obrázek 7</b> EPR spektrum komplexu CuDETA a jeho první derivace.....	29
<b>Obrázek 8</b> Luminiscence; zleva: demineralizovaná voda, CQD – CuDETA, CQDGly(1:1) – CuDETA, CQDGly(1:4) – CuDETA a komplex CuDETA.....	30
<b>Obrázek 10</b> EPR spektrum CQDGly(1:1) – CuDETA.....	30
<b>Obrázek 9</b> EPR spektrum CQD – CuDETA.....	30
<b>Obrázek 11</b> EPR spektrum CQDGly(1:4) – CuDETA.....	31
<b>Obrázek 12</b> Infračervená spektra všech připravených produktů.....	31

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1</b> Průměrné hodnoty viability spolu se směrodatnou odchylkou buněk MOLT-4 při aplikaci různých koncentrací CQD a CQD – CuDETA získané testem WST-1.....	26
<b>Tabulka 2</b> Průměrné hodnoty viability buněk MOLT-4 při různé koncentraci komplexu CuDETA získané testem WST-1.....	27
<b>Tabulka 3</b> Stanovení koncentrace mědi metodou ICP OES .....	32
<b>Tabulka 4</b> Přepočet $IC_{50}$ na množství navázané mědi z komplexu CuDETA .....	33

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1</b> Testování cytotoxicity CQD na buněčné linii MOLT-4 .....	32
<b>Graf 3</b> Závislost životaschopnosti buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu CuDETA...	33
<b>Graf 2</b> Závislost životaschopnosti buněk MOLT-4 na koncentraci CQD – CuDETA .....	33

## SEZNAM SCHÉMAT

<b>Schéma 1</b> Příprava komplexu CuDETA reakcí chloridu měďnatého s diethylentriaminem .....	29
---	----

## SEZNAM ZKRATEK

CQD	uhlíkové kvantové tečky
CQDGly(1:1)	uhlíkové kvantové tečky s glycinem v molárním poměru 1:1
CQDGly(1:4)	uhlíkové kvantové tečky s glycinem v molárním poměru 1:4
CuDETA	chlorid chloro(diethylentriamino)měďnatý
CQD – CuDETA	uhlíkové kvantové tečky s komplexem CuDETA
CQDGly(1:1) – CuDETA	uhlíkové kvantové tečky s glycinem v molárním poměru 1:1 s komplexem CuDETA
CQDGly(1:4) – CuDETA	uhlíkové kvantové tečky s glycinem v molárním poměru 1:4 s komplexem CuDETA
(L)	ligand
EPR	elektronová paramagnetická resonance
IR	infračervená spektrometrie
ICP OES	optický emisní spektrometr s indukčně vázanou plazmou
EA	elementární analýza
GO	grafenoxid
IC <sub>50</sub>	poloviční inhibiční koncentrace
MOLT-4	buněčná linie odvozená od akutní T-lymfoblastické leukémie

## ÚVOD

Studium nanomateriálů je jednou ze stále se rozvíjejících a intenzivně zkoumaných vědních disciplín. Díky svým unikátním vlastnostem mají širokou škálu uplatnění. Lze je využít nejen v elektrotechnickém, textilním a chemickém průmyslu, ale také ve zdravotnictví, kde nanočástice hrají důležitou roli při vývoji cílené dopravy léčiv. Uhlíkové kvantové tečky jsou nanočástice, které jsou tvořeny z biogenních prvků, především z uhlíku. V medicíně se mohou uplatnit díky své schopnosti pronikat do cílových orgánů a tkání při cíleném transportu léčiv a díky svým fluorescenčním vlastnostem se mohou uplatnit také jako kontrastní látky v lékařské diagnostice či jako nosiče pro biologicky aktivní látky.

Tato bakalářská práce se zabývá možným využitím kvantových teček jako nosiče anti-tumorových léčiv. V rámci této práce byly připraveny různé druhy uhlíkových kvantových teček, cytostaticky aktivní měďnatý komplex a následně látky vzniklé jejich kombinací. Kvantové tečky, měďnatý komplex i sloučenina vzniklá jejich interakcí byly testovány na buněčné linii odvozené od akutní T-lymfoblastické leukemie s názvem MOLT-4.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Nanomateriály

Nanomateriály lze v základě popsat jako materiály, jejichž velikost se minimálně v jednom rozměru pohybuje v rozmezí 1–100 nm [1]. Obor, který se zabývá studiem, syntézou, charakterizací a aplikací nanomateriálů se nazývá nanotechnologie. Nanotechnologie se rychle šíří a rozvíjí, jejím cílem je řídit jednotlivé atomy a molekuly při vytváření cílových struktur, a proto už v dnešní době existuje velký počet výrobků obsahující nanomateriály. Nanomateriály mají širokou škálu využití. Lze je využít v elektrotechnickém, textilním a chemickém průmyslu, ale také ve zdravotnictví. Nanomateriály, které jsou založeny na luminiscenci, přitahují pozornost skrze jejich unikátní vlastnosti a jejich využití. Do této kategorie nanomateriálů patří např. uhlíkové nanotrubky, nanodiamanty [2] spolu s uhlíkovými kvantovými tečkami [3]. Vyznačují se nízkou toxicitou, vysokou luminiscencí, vysokou chemickou stálostí a především snadnou přípravou [4]. Mnoho nanomateriálů můžeme nalézt také volně v přírodě. Mezi jejich největší přírodní zdroje patří především vulkanická aktivita, eroze či lesní požáry. Dále mohou vznikat také biologickými procesy, především mikrobiální aktivitou [5].

## 1.2 Příprava uhlíkových materiálů

Při přípravě uhlíkových nanomateriálů se používají dvě metody přípravy. Metoda „top-down“ a metoda „bottom-up“. U metody top-down se cílený produkt získává z větších, makroskopických materiálů, které se postupně, pomocí různých metod, mezi které patří např. mletí, zmenšují až na samotný produkt. Principem přípravy nanomateriálů metodou bottom-up je, že se výsledné nanomateriály tvoří z výchozího materiálu pomocí tzv. samospořádání. Princip této metody lze přirovnat ke stavbě budovy z cihel [6]. Do této metody lze zařadit i pyrolýzu, která byla využita v experimentální části této práce při přípravě uhlíkových kvantových teček.

## 1.3 Uhlíkové kvantové tečky (CQD)

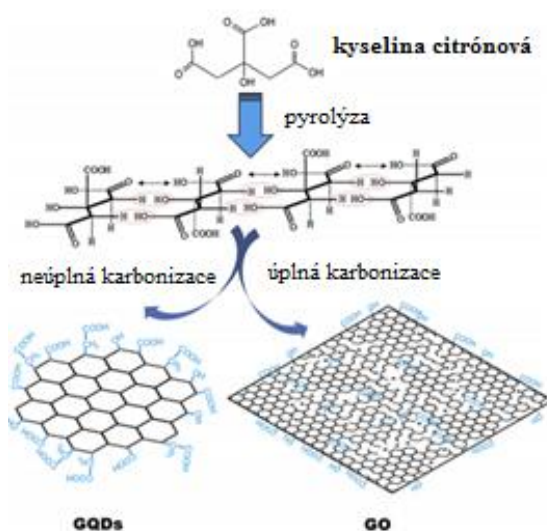
CQD jsou struktury s velikostí v řádech nanometrů. Vyznačují se výbornou schopností fluorescence a emise jediné CQD může být detekována za použití fluorescenčního mikroskopu [4]. Jejich výška se obvykle pohybuje v rozmezí 0,5 – 2 nm a šířka se pohybuje kolem 15 nm.

Jejich velikost lze ovlivnit především složením reakční směsi a teplotou. Složení kvantových teček vychází z metod přípravy a z prekurzorů, ze kterých se CQD připravují [3]. Nejčastějšími prvky tvořící CQD je mimo uhlíku, kyslíku a vodíku také dusík [7].

### 1.3.1 Vlastnosti CQD

CQD jsou unikátní zejména kvůli svým vlastnostem. Kvantové tečky patří mezi fluorofory, což jsou látky schopné absorbovat fotony ze světelného záření a následně emitovat záření o jiné vlnové délce [8]. Pracují na principu excitace elektronů do vyšší energetické hladiny při působení fotonů z vnějšího světelného záření. CQD lze účinně excitovat UV zdrojem, kdy v UV oblasti světla vykazují vysokou absorpenci. Při návratu z vyšší energetické hladiny do své původní, nižší energetické hladiny, dochází k uvolňování energie emisí elektromagnetického záření. Toto emisní záření má obvykle delší vlnovou délku, než je vlnová délka záření potřebná k jejich excitaci. Rozdíl mezi emisní a excitační vlnovou délkou může být v řádu až stovek nm. Menší CQD emitují na kratší vlnové délce, jako je například modrá (430 až 500 nm), a velikostně větší tečky emitují na delší vlnové délce, jako je například červená (625 až 740 nm).

Velikost CQD a spolu s tím tedy i emisní vlnovou délku lze ovlivnit složením reakční směsi a také délkou zahřívání. Při intenzivnějším nebo delším zahřívání dochází ke vzniku větších CQD. Při jejich úplné karbonizaci pak vzniká černý grafenoxid (GO) (obr. 1). CQD jsou vlastně grafenové pláty o velikosti menší než 100 nm. [9], ale obecně mají mnohem menší velikost a vykazují mnohem silnější fotoluminiscenční aktivitu než GO.



**Obrázek 1** Syntéza CQD a GO pyrolýzou kyseliny citrónové [4]

V poslední době byl u CQD zaznamenán také proces fotodegradace. Fotodegradace je zničení fluoroforu, který znemožňuje pozorování značek pod mikroskopem. Mezi další zajímavou vlastnost CQD patří blikání. Blikání je proces, při kterém se opakovaně aktivuje a inaktivuje fluorescence, a tím jsou pak pozorovatelné světlé a temné periody [10].

Tyto vlastnosti umožňují novou generaci experimentů s fluorescenčním zobrazením v biologii, což by mohlo pomoci rozpoznat biologickou funkci proteinů na molekulární úrovni.

### 1.3.2 Využití

Kvantové tečky vykazují vysoký potenciál pro použití v mnoha biologických a klinických aplikacích. Nacházejí uplatnění ve fluorescenční mikroskopii či při imunochemických stanovenech, kdy je možné stanovit současně i několik analytů v jednom kroku. Řádově lze více analytů stanovit pomocí fluorescenčních mikročastic, které zahrnují kvantové tečky emitující na různých vlnových délkách [11]. U fluorescenčního značení buněk je mnohem snadněji proveditelná metoda vnějšího fluorescenčního značení na rozdíl od vnitřního fluorescenčního značení. U vnitřního značení je problémem především dopravení CQD do cytoplazmy, pro dopravení se používá metoda dopravy pomocí mikroinjekcí či metoda nespecifické pinocytózy. Při značení proteinů CQD musí zůstat zachována jejich enzymová aktivita [12].

V biologii je možné CQD použít také ke značení jednotlivých malých molekul, jako jsou např. aminokyseliny, glukosa či dopamin. Při sledování jednotlivých molekul jsou cílové molekuly, které jsou předmětem zájmu, označeny kvantovou tečkou. Jednotlivé změny se sledují optickým fluorescenčním mikroskopem. Kvantové tečky mohou nacházet uplatnění při využití jako biosenzory pro monitorování dynamických procesů, mezi které patří změny pH a teploty, koncentrace jednotlivých iontů či k monitorování apoptózy. Kvantové tečky poskytují přímý přístup k vlivu intracelulární mikrostruktury nebo extracelulární stimulace na pohyb cílového proteinu [13].

Kvantové tečky nacházejí uplatnění také ve farmacii při cíleném transportu léčiv. Při nedostatečně zacílené dopravě léků k postiženým tkáním, jako tomu bývá např. u chemoterapie, může docházet ke vzniku nepříjemných vedlejších účinků u pacienta, jako je např. snížená imunita či kognitivní dysfunkce. Proto lze tuto metodu využít k potenciálním aplikacím v protinádorové léčbě, která přitahuje velký zájem o výzkum. Ideální systém pro transport léčiv by měl vykazovat stabilitu před fyziologickými vlivy, měl by být rozpustný a dispergo-

vatelny ve vaskulárním systému proto, aby se zajistila interakce s místy postiženými tumorem. Také by měl být specifický a selektivní vzhledem k rakovinným buňkám.

Rakovina je výsledkem nekontrolovatelného množení maligních buněk, které mají schopnost metastazovat, a tím se rozšířit i do dalších částí lidského těla. Každý rok přibude více než 10 miliónů nových případů, ale v posledních pěti letech byla zaznamenána menší úmrtnost vzhledem k lepšímu porozumění této problematiky a také díky vylepšení diagnostických zařízení a léčby. V dnešní době se rakovina léčí především chirurgickým zákrokem, chemoterapií či radioterapií, nebo také jejich kombinací. Konvenční chemoterapie pracuje na základě zásahu do syntézy DNA a mitózy, což vede ke smrti rakovinných buněk. Vznik nanotechnologií měl hluboký dopad na rakovinnou terapii obecně. Srovnáním s konvenčními chemoterapeutiky, nosiče z nanomateriálů prokazují potenciál především pro zlepšení léčby při současném zabránění toxicity v normálních buňkách v důsledku vlastností, jako je např. vysoká selektivní akumulace v nádorech prostřednictvím zlepšené permeability.

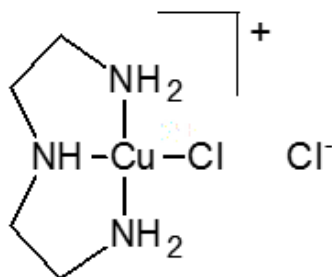
Nanomedicína je rapidně rozvíjející se oblastí medicíny. Nanočástice mají unikátní biologické vlastnosti jako je malá velikost a velký povrch vzhledem k jejich objemu, což umožňuje vázat, absorbovat a nést látky např. léky, DNA, RNA či proteiny. Nanočástice používané při chemoterapii se mohou rozdělit do dvou skupin, které jsou upravené pro cílený a necílený transport léčiv. Fluorescenční nanočástice, jako jsou kvantové tečky, jsou slibné pro cílení a sledování dopravy léků skrze jejich fyzikálně chemické vlastnosti, jako je např. jednotná velikost, biokompatibilita a schopnost fotoluminiscence. Hlavní výzvou při použití CQD v biologických aplikacích je ale jejich vyšší tendence agregovat a jejich nespecifická adsorpce [14], [15]. Povrch CQD je obvykle obalen polárními skupinami, které umožňují rozpustnost ve vodě, a také tyto skupiny zvyšují biologickou aktivitu [16]. CQD jako nosič biologicky aktivní látky.

Vzhledem k potenciálním aplikacím kvantových teček při léčbě rakoviny, komplex přechodného kovu, který je schopen zprostředkovat štěpení DNA, přitahuje velký zájem o výzkum [17]. Prostřednictvím různých spektroskopických metod bylo zjištěno, že CQD podporují redukci iontů mědi a urychlují tak jejich reakci s  $O_2$ , přičemž se tvoří superoxidové anionty a také radikály s mědí. Tyto reaktivní formy kyslíku následně oxidují molekuly DNA. Zlepšení redukce měďnatých komplexů lze přičíst koordinaci CQD s měďnatým centrem komplexu, což vede k účinnému přenosu elektronů z elektrony bohatého CQD na přítomný komplex mědi. Porozuměním role CQD při štěpení DNA by mohlo být slibné pro protinádorovou terapii. Unikátní trojrozměrné struktury komplexů kovů umožňují přípravu vysoce aktivních štěpných činidel DNA s vysokou selektivitou pro sekvence a struktury DNA [18].



Nicméně zlepšení nukleázové aktivity a specificity komplexu přechodného kovu pro DNA sekvence a struktury zůstává i nadále výzvou [19].

Chlorid chloro(diethylenetriamino)měďnatý (komplex CuDETA) (obr. 2), který byl studován v rámci této bakalářské práce, je již v literatuře popsán. Je známa jeho příprava i struktura. Jedná se o komplex s centrálním atomem Cu(II), jež je obklopen třemi atomy dusíku a jednoho chloru.



Obrázek 2 Komplex CuDETA

Bylo zjištěno, že na mechanismu štěpení DNA se podílejí reaktivní formy kyslíku. V experimentu [18], ve kterém vědci zkoumali, které reaktivní formy kyslíku se zapojují do mechanismu štěpení DNA bylo odhaleno, že se během reakce může zapojit superoxidový anion i hydroxylový radikál [20][21].

Výsledky výzkumů naznačují, že radikál asociovaný s kovem se pravděpodobně podílí na štěpení DNA spolu s měďnatými komplexy v přítomnosti CQD. Při provedení toho samého experimentu za anaerobních podmínek nebylo pozorováno žádné štěpení DNA v přítomnosti CQD, což naznačuje, že by mohlo docházet ke štěpení DNA za přítomnosti kyslíku jako oxidačního činidla.

Obecně se předpokládá, že komplexy mědi, které mohou štěpit molekuly DNA pomocí oxidace, jsou nejprve redukovány z  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (L) na  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (L), a pak následně atakovány kyslíkem, generují superoxidové anionty a radikály s mědí v jejich centru [22], [23]. Tyto dva typy aktivních forem kyslíku jsou odpovědné za následné oxidace molekul DNA. Pokud jsou přítomné CQD, je produkováno více radikálů. To lze připisovat reakci komplexu mědi s  $\text{O}_2$ , nebo redukcí měďnatého centra. Je zřejmé, že musí docházet ke vzájemné interakci mezi komplexy a CQD. CQD interagují s komplexy a urychlují redukcí  $\text{Cu}^{\text{II}}$ (L) na  $\text{Cu}^{\text{I}}$ (L). Bez CQD samotný komplex není dostatečně aktivní k produkci radikálů, a není schopen oxidovat DNA molekulu.

Funkční mechanismus CQD při štěpení DNA komplexem mědi spočívá zřejmě ve zvýšení afinity komplexu k DNA, nebo ve zvýšení procesu redukce kovového centra vedoucí k vytvoření reaktivních skupin kyslíku [18].

#### 1.4 Biologická aktivita sloučenin mědi

Komplexní sloučeniny obsahující měď na sebe v poslední době přitahují pozornost skrze jejich vlastnosti, které je možné potenciálně využít při léčbě rakoviny. Bylo prokázáno, že některé komplexní sloučeniny mědi ve spojení s  $\text{Cu}^{2+}$  vykazují mnohem vyšší účinnost než doposud využívaná cisplatina, jejíž zásadní problém spočívá v silné toxicitě. Bylo zjištěno, že tyto aktivní komplexy zabraňují syntéze DNA v závislosti na jejich koncentraci [24].

Díky tomuto jejich potenciálu se mnoho výzkumů pokouší o vytvoření nových léčivých látek, jejichž součástí je právě měď např. již od roku 1980 probíhá mnoho výzkumů zabývajících se problematikou onemocnění *Diabetes mellitus*, jejichž cílem je vývoj nových léčiv na bázi mědi, které by nahradily doposud používané inzulínové injekce [25].

Je prokázáno, že měďnaté sloučeniny vykazují silný antimikrobiální účinek, díky kterému působí na plísňe, bakterie, houby a viry. Mechanismus, jakým tyto patogeny ničí, zatím není přesně znám, ale probíhající studie naznačují, že při inaktivaci viru dochází k interakci atomu mědi s důležitou proteinovou složkou viru, např. s virovým fágem, při které dochází k jejímu oxidativnímu zničení, nebo může způsobit inhibici životně důležité bílkoviny viru (např. HIV-1 proteázy, která je nezbytná pro replikaci viru HIV). Mechanismus ničení bakterií zatím také není dobře známý, ale probíhající studie naznačují, že by měďnaté ionty mohly narušovat osmotickou rovnováhu buňky a způsobit tak unikání glutamátu a draslíku skrze vnější bakteriální membránu [29].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie, laboratorní materiál a přístroje

- Kyselina citrónová mohohydrát p.a (Penta, Chrudim)
- Glycin p.a. (Lach-Ner, Neratovice)
- Demineralizovaná voda čistá (Ze zásob KALCH)
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  p.a. (Lach-Ner, Neratovice)
- Isopropanol  $\geq 99,7\%$  (Lach-Ner, Neratovice)
- Diethylentriamin 99% (Sigma-Aldrich)
- Aceton p.a. (Lach-Ner, Neratovice)
- Diethylether p.a. (Penta s.r.o.)
- Médium pro buněčnou linii MOLT-4 – IMDM (PAA Laboratories GmbH, Rakousko) s 10 ml fetálního séra (Sigma-Aldrich, USA), glutamin 2 mmol/l v objemu 0,5 ml (Sigma-Aldrich, USA), streptomycin/penicilin 0,5 ml (Sigma-Aldrich, USA) a 39 ml IMDM
- Činidlo WST-1 (Roche Applied Science, Švýcarsko)
- DMSO (Sigma-Aldrich, USA)
- PBS (sterilní fosfátový pufr, pH 7,4) (PAA Laboratories GmbH, Rakousko)
- Ultrazvuková čistička Elma Elmasonic S30H (Elma Schmidbauer, Singen, Německo)
- Sušárna Memmert UNB 500 (Memmert, Schwabach, Německo)
- Analytická váha KERN ABJ-NM (KERN & SOHN, Balingen, Německo)
- Laboratorní váha KERN 1200-2N (KERN & SOHN, Balingen, Německo)
- Digitální konduktometr GLF100 (GHM-Greisinger, Praha, ČR)
- Magnetické míchadlo Heidolph MR Hei-Standard (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Dialysis tubing Membra-Cel(TM), 77mm (Carl Roth GmbH & Co. KG)
- Laminární box Jouan MSC 12 (Trigon-Plus, ČR)
- Inkubátor Thermo Forma Direct Heat (Trigon-Plus, ČR)
- Dávkovací pipetor Dispenser Multiflo (BioTek, ČR)
- Spektrofotometr Infinity 200 (Tecan, Švýcarsko)
- Hlubokomrazicí box (Sanyo, Japonsko)
- Třepačka Vortex 3 (IKA, Sigma-Aldrich, USA)
- Mikroskop (Carl Zeiss Jena, Německo)

- Bürkerova komůra (Meopta)
- Sada pipet (Eppendorf AG, Německo)
- Mikrotitrační destička Corning 384 Flat Transparent (PPT)
- Plynový kahan Fuego SCS basic (Trigon-Plus, ČR)

## **2.2 Použité instrumentální metody**

### **2.2.1 EPR spektroskopie**

EPR spektra látek obsahující paramagnetické centrum byla měřena pomocí EPR spektrometru Miniscope MS 300 (Magnetech GmbH) v X-pásmu zdroje mikrovlnného záření při mikrovlnné frekvenci kolem 9,5 GHz ve skleněných mikrokapilárách za laboratorní teploty a v kapalně fázi.

Kalibrace přístroje byla provedena na *N,N*-difenyl-*N'*-pikrylhydrazyl s přesností na 3 desetinná místa.

### **2.2.2 ICP OES**

Měření obsahu mědi bylo provedeno optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP OES) pomocí přístroje Integra XL 2, která k atomizaci, ionizaci vzorku a následné excitaci atomů a iontů využívá indukčně vázanou plazmu. Rozsah kalibrací pro měření bylo v rozmezí 0,1 – 10 ppm. K měření obsahu mědi byl využit standard Plasma CAL (SCP Science) o koncentraci 1 g/l. Atomové spektrální čáry pro měď se nachází v rozsahu vlnových délek 324,754 nm a 327,396 nm s detekčním limitem 0,005 mg/l.

### **2.2.3 Elementární analýza (EA)**

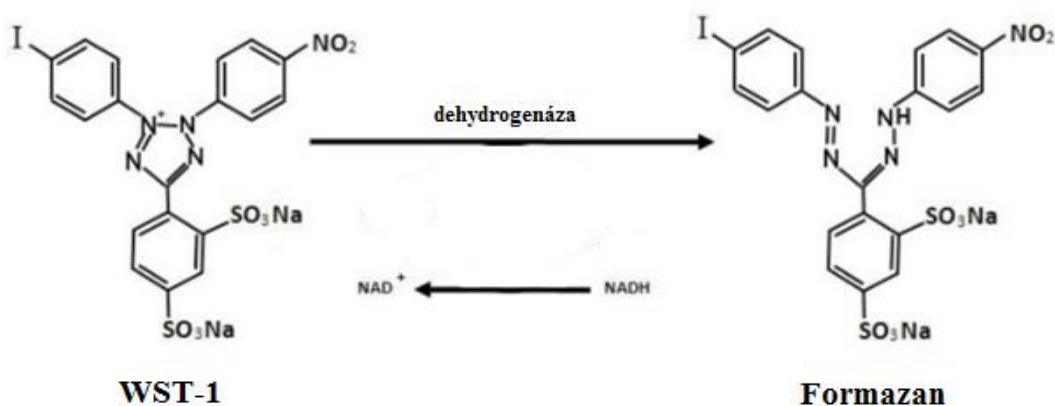
Kvantové tečky byly měřeny na přístroji EA 1108 Fisons. EA je metoda sloužící k průkazu přítomnosti jednotlivých prvků ve vzorku. Vzorek pro analýzu musí být homogenní a suchý. Výstupem je zastoupení jednotlivých prvků v absolutních procentech vztažených na navážku vzorku.

## 2.2.4 Infračervená spektroskopie (IR)

Metoda, která slouží k identifikaci, ověření čistoty a studiu funkčních skupin organických i anorganických látek a to v plynné, pevné i kapalně fázi. K měření byl využit infračervený spektroskop Nicolet Impact 400D (SpectraLab Scientific, Milpitas, USA). Využívá interakce infračerveného záření (vlnčet 12500 až 20  $\text{cm}^{-1}$ , vlnová délka 800 až 0,5 nm) se studovaným vzorkem, kdy po absorbování energie dochází k vazebným vibracím, na základě kterých, dochází ke tvorbě charakteristických pásů ve spektrech. Výsledná spektra znázorňují závislost transmitance nebo absorpance na vlnčetu absorbovaného záření.

## 2.2.5 WST-1 metoda

Jedná se o přesnou a jednoduchou metodu, při které se používá reakční činidlo tetrazoliová sůl 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium sodná sůl neboli WST-1 pro spektrofotometrické kvantifikace jejich životaschopnosti. Tato metoda je založena na štěpení tetrazoliové soli, která je v živých buňkách redukována mitochondriálními dehydrogenázami na stabilní formazan (viz obr. 3), který je ukazatelem počtu živých buněk. Měří se absorpance vzniklého formazanu na spektrofotometru při vlnové délce 440 nm [26].



**Obrázek 3** Štěpení tetrazoliové soli na formazan pomocí buněčné dehydrogenázy; NADH: nikotinamidadeninukleotid [27]

Tato metoda byla provedena na buněčné linii MOLT-4. Jedná se o buňky odvozené od akutní T-lymfoblastické leukemie s expresí znaků CD1, CD2, CD3 A, B, C, CD4, CD5, CD6 a CD7. Další jejich vlastností je přítomnost proteinu p53 a také vysoká produkce deoxynukleotidyl transferázy, která připojuje deoxynukleotidy ke 3' koncům v molekulách DNA, přičemž nevyžaduje žádnou matrici ani primer [28].

### 2.3 Příprava uhlíkových kvantových teček (CQD)

Do 250ml baňky bylo naváženo množství 60 g kyseliny citrónové (0,3123 mol) a vloženo na elektromagnetickou míchačku do hliníkového bloku. Toto množství bylo za stálého míchání pyrolyzováno 1,5 hod při teplotě 200 °C. O pár minut později byla kyselina citrónová zkapalněná a bylo možné pozorovat změnu barvy z bledě žluté do oranžové. Po pyrolýze byla přidána do horkého roztoku demineralizovaná voda v množství cca 30 ml. V dalším kroku byla směs neutralizována pomocí malých přídavek pecičkového NaOH na hodnotu pH = 7,00. Získaný roztok byl převeden do dialyzační membrány o průměru 77 mm. Následná dialýza probíhala ve třech cyklech ve třech litrech demineralizované vody. Průběžně byla kontrolována její hodnota vodivosti (I – 450  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , II – 136  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , III – 7  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ ). Získaný roztok byl zkoncentrován na vakuové odparce na objem cca 120 ml, zfiltrován pomocí Büchnerovy nálevky a převeden do uzavíratelné nádoby. Sušina 2,8 mg/ml; EA nalezeno (C 41,30 %, H 3,78 %); IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3400w, 2966vw, 1690s, 1577vs, 1403m; EPR ( $\text{H}_2\text{O}$ )  $A_{\text{iso}} = 74.2 \text{ G}$ ,  $g_{\text{iso}} = 2.107$ .

### 2.4 Příprava uhlíkových kvantových teček s glycinem v poměru 1:1 (CQDGly(1:1))

Do 250ml baňky bylo naváženo množství 40,05 g (0,2084 mol) kyseliny citrónové a 14,29 g (0,1903 mol) glycinu a vloženo do hliníkového bloku na elektromagnetickou míchačku. Tato směs byla za stálého míchání pyrolyzována 1,5 hod při teplotě 200 °C. Směs měla na začátku pyrolýzy barvu do červena, ale postupem času tmavla na tmavě hnědou barvu. Po pyrolýze byla přidána do horkého roztoku demineralizovaná voda v množství cca 30 ml. V dalším kroku byla směs neutralizována pomocí malých přídavek pecičkového NaOH z původní hodnoty pH 0,06 na hodnotu pH = 7,00. Získaný roztok byl převeden do dialyzační membrány o průměru 77 mm. Následná dialýza probíhala ve čtyřech cyklech s použitím tří litrů demineralizované vody. Průběžně byla kontrolována její hodnota vodivosti (I – 780  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , II – 328  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , III – 157  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , IV - 12  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ ). Získaný roztok byl zkoncentrován na vakuové odparce na objem cca 150 ml, zfiltrován pomocí Büchnerovy nálevky a převeden do uzavíratelné nádoby. Sušina 2,5 mg/ml; EA nalezeno (C 34,81 %, H 3,08 % a N 4,71 %); IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3400m, 1699s, 1602vs, 1508vw, 1422m, 1389m, 1337vw, 1313vw, 1085vw; EPR ( $\text{H}_2\text{O}$ )  $A_{\text{iso}} = 75.1 \text{ G}$ ,  $g_{\text{iso}} = 2.105$ .

## 2.5 Příprava uhlíkových kvantových teček s glycinem v poměru 1:4 (CQDGly(1:4))

Množství 40 g kyseliny citrónové (0,2081 mol) a 57,16 g glycinu (0,7614 mol) bylo naváženo do 250 ml baňky a vloženo na elektromagnetickou míchačku do hliníkového bloku. Tato směs byla pyrolyzována za stálého míchání po dobu 1,5 hod při teplotě 200 °C. Směs měla na začátku pyrolýzy barvu do červena, ale postupem času pyrolýzy tmavla až na velmi tmavě hnědou barvu. Po pyrolýze bylo přidáno k horkému roztoku cca 30 ml demineralizované vody a vzniklá sraženina byla rozdispergována pomocí ultrazvuku. V dalším kroku byla směs neutralizována pomocí malých přídavek pecičkového NaOH z původní hodnoty pH 1,96 na hodnotu pH = 7,00. Získaný roztok byl převeden do dialyzační membrány o průměru 77 mm. Následná dialýza probíhala v osmi cyklech s použitím tří litrů demineralizované vody. Její hodnota vodivosti byla průběžně kontrolována (I – 1527  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , II – 1020  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , III – 922  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , IV – 727  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , V – 561  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , VI – 269  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , VII – 98  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , VIII – 2,4  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ ). Získaný roztok byl zkoncentrován na vakuové odparce na objem cca 150 ml, zfiltrován pomocí Büchnerovy nálevky a převeden do uzavíratelné nádoby. Sušina 2,1 mg/ml; EA nalezeno (C 37,81 %, H 4,04 % a N 12,21 %); IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3280m, 3090vw, 2944vw, 1696s, 1644 vs, 1606w, 1564m, 1541m, 1420m, 1256w, 1183w, 1029w; EPR ( $\text{H}_2\text{O}$ ) $A_{\text{iso}} = 73.1 \text{ G}$ ,  $g_{\text{iso}} = 2.108$ .

## 2.6 Příprava měďnatého komplexu (CuDETA)

Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo množství 9 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (0,0528 mol) a rozpuštěno za nepřetržitého míchání ve 150 ml isopropanolu. Následně bylo pomocí injekční stříkačky přikapáváno 9 ml diethylentriaminu (DETA) (0,0837 mol). Postupně došlo ke změně barvy roztoku z původně zelené do modré barvy. Později byl pozorován i vznik sraženiny. Vzniklá suspenze byla zfiltrována přes fritu S3. Odfiltrovaná modrá sraženina byla třikrát promyta acetonem a jednou etherem. Zfiltrovaný roztok byl odpařen na vakuové rotační odparce na minimální objem. Vzniklá suspenze byla zpracována obdobným způsobem jako při předchozí izolaci prvního podílu produktu. Získané podíly byly sloučeny, vysušeny v exsikátoru a následně převedeny do Schlenkovy baňky z důvodu jejich hygroskopicity. Komplex je dobře rozpustný v polárních rozpouštědlech (voda, methanol, dimethylsulfoxid) a nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech (dichlormethan, hexan, acetonitril, diethylether).

EPR (H<sub>2</sub>O)<sub>A<sub>iso</sub></sub> = 71.9 G,  $g_{iso}$  = 2.110, IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 3395vs, 3242vs, 3145s, 2952vw, 2887 vw, 2116vw, 1594w, 1473vw, 1464vw, 1453vw, 1145vw, 1093w, 1029w

## **2.7 Příprava uhlíkových kvantových teček s měďnatým komplexem (CQD – CuDETA)**

Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 2,53 g komplexu CuDETA (0,0106 mol) a smícháno se 100 ml CQD. Následně byla baňka uzavřena a umístěna na elektromagnetickou míchačku na cca 15 hod. Po této době byl roztok CuDETA a CQD převeden do dialyzační membrány o průměru 77 mm. Následná dialýza probíhala v pěti cyklech s použitím tří litrů demineralizované vody, jejíž hodnota vodivosti byla průběžně kontrolována (I – 850 μS/cm<sup>-1</sup>, II – 535 μS/cm<sup>-1</sup>, III – 272 μS/cm<sup>-1</sup>, IV – 124 μS/cm<sup>-1</sup>, V – 8,4 μS/cm<sup>-1</sup>). Následně byl roztok umístěn na vakuovou odparku, zkoncentrován na cca 130 ml, zfiltrován pomocí Büchnerovy nálevky a převeden do uzavíratelné nádoby. Sušina 2,9 mg/ml; ICP (Cu) 281,2 μg/ml; IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 3403w, 3313w, 3260m, 3174w, 2944vw, 2890vw, 1700s, 1561s, 1395m, 1093w, 1030w, 738m, 610vs.

## **2.8 Interakce uhlíkových kvantových teček s glycinem 1:1 a měďnatým komplexem (CQDGly(1:1) – CuDETA)**

Bylo naváženo 2,53 g komplexu CuDETA (0,0106 mol) a smícháno se 100 ml CQD-Gly(1:1) v Erlenmayerově baňce. Následně byla baňka uzavřena a umístěna na elektromagnetickou míchačku na cca 15 hod. Po této době byl roztok převeden do dialyzační membrány o průměru 77 mm. Následná dialýza probíhala v pěti cyklech s použitím tří litrů demineralizované vody, jejíž hodnota vodivosti byla průběžně kontrolována (I – 737 μS/cm<sup>-1</sup>, II – 547 μS/cm<sup>-1</sup>, III – 338 μS/cm<sup>-1</sup>, IV – 126 μS/cm<sup>-1</sup>, V – 10 μS/cm<sup>-1</sup>). Následně byl roztok zkoncentrován na cca 200 ml na vakuové odparce, zfiltrován pomocí Büchnerovy nálevky a převeden do uzavíratelné nádoby. Sušina 3,4 mg/ml; ICP (Cu) 352,7 μg/ml; IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 3270m, 2945w, 2891vw, 1767vw, 1694s, 1597vs, 1459vw, 1383m, 1335vw, 1305w, 12,61vw, 1180vw, 1156vw, 1093vw, 1030vw, 1000vw.



## **2.9 Intrakce uhlíkových kvantových teček s glycinem 1:4 a měďnatým komplexem (CQDGly(1:4) – CuDETA)**

Bylo naváženo 2,53 g komplexu CuDETA (0,0106 mol) a smícháno se 100 ml CQD-Gly(1:4) v Erlenmayerově baňce. Následně byla baňka uzavřena a umístěna na elektromagnetickou míchačku na cca 15 hod. Po této době byl roztok převeden do dialyzační membrány o průměru 77 mm. Následná dialýza probíhala v pěti cyklech s použitím tří litrů demineralizované vody. Její hodnota vodivosti byla průběžně kontrolována (I – 797  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , II – 584  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , III – 310  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , IV – 118  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , V – 11  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ ). Následně byl roztok zkoncentrován na cca 200 ml na vakuové odparce, zfiltrován pomocí Büchnerovy nálevky a převeden do uzavíratelné nádoby. Sušina 2,9 mg/ml; IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3280s, 3091w, 2944vw, 1692s, 1646vs, 1561m, 1421w, 1389w, 1258vw, 1180vw, 1094vw, 1028vw, 901vw, 738vw, 610w, 568vw.

## **2.10 Stanovení cytotoxicity pomocí WST-1**

Pro buněčnou linii MOLT-4 bylo použito kultivační médium IMDM (Iskova modifikace Dulbeccova média) s 20% fetálním telecím sérem, L-glutaminem a penicilinem/streptomycinem. Jejich kultivace byla prováděna pasážováním, kdy k 50  $\mu\text{l}$  suspenzi buněk bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  trypanové modři. Po promíchání následovalo počítání buněk v Bürkerově komůrce, kde bylo v 50 středních čtvercích spočítáno množství buněk, jejichž množství bylo vyjádřeno jako počet buněk  $\cdot 10^4$  v 1 ml kultivačního média. Každý den byla tato kultura upravena na koncentraci  $2 \cdot 10^5$  buněk v 1 ml kultivačního média.

Z roztoku testovaných CQD byly připraveny tři zásobní roztoky o koncentraci 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Tyto roztoky byly spolu s kultivačním médiem přemístěny do 96 jamkové mikrotitrační destičky tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 22, 33, a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (30 000 buněk na jednu jamku). Dále byla do mikrotitrační destičky napietována kontrola, která se skládala pouze z neovlivněných buněk, a dále také pouze čisté kultivační médium, které nám posloužilo jako blank. Následně byla mikrotitrační destička umístěna na 24 h do termostatu při 37 °C a 5%  $\text{CO}_2$ . Po této době bylo přidáno do každé jamky 10  $\mu\text{l}$  roztoku WST-1, které bylo připraveno smícháním WST-1 a PBS v poměru 1:4 a následně byla mikrotitrační destička znovu umístěna na 3 hodiny do termostatu za stejných podmínek (37 °C a 5%  $\text{CO}_2$ ). Po skončení této inkubační doby byla změřena absorbance při vlnové délce 440 nm. Každá koncentrace byla měřena v tetraplikátu a byla vypočítána jejich

průměrná hodnota absorbance i s odpovídající směrodatnou odchylkou ze třech na sobě nezávislých měřeních.

### 2.10.1 Tabulky výsledků

**Tabulka 1** Průměrné hodnoty viability spolu se směrodatnou odchylkou buněk MOLT-4 při aplikaci různých koncentrací CQD a CQD – CuDETA získané testem WST-1.

<b>Koncentrace (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>CQD</b>		<b>CQD – CuDETA</b>	
	<b>Viabilita (%)</b>	<b>Směr. odchylka (%)</b>	<b>Viabilita (%)</b>	<b>Směr. odchylka (%)</b>
0,1	103,1	1,1	99,8	5,1
0,5	97,9	1,5	83,2	3,2
1,0	102,3	2,1	70,3	5,2
2,0	101,1	2,7	52,8	1,8
5,0	100,8	2,9	29,2	3,1
10,0	99,2	1,7	10,7	3,9
15,0	98,3	3,6	5,3	4,2
22,0	101,1	2,7	3,1	2,3
33,0	100,4	0,9	1,9	2,3
50,0	98,2	0,4	1,2	1,1

**Tabulka 2** Průměrné hodnoty viability buněk MOLT-4 při různé koncentraci komplexu CuDETA získané testem WST-1.

<b>Koncentrace (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>CuDETA</b>	
	<b>Viabilita (%)</b>	<b>Směr. odchylka (%)</b>
0,1	103,8	5,2
0,5	101,2	3,3
1,0	105,1	5,1
2,0	101,2	1,8
5,0	96,3	3,2
10,0	73,6	3,8
15,0	52,3	4,2
22,0	40,3	2,3
33,0	25,1	2,3
50,0	12,4	1

### 3 DISKUSE

Studium nanomateriálů je jednou ze stále se rozvíjejících a intenzivně zkoumaných vědních disciplín. Díky svým malým rozměrům nanomateriály disponují unikátními vlastnostmi, díky kterým nacházejí uplatnění nejen v chemickém a potravinářském průmyslu, ale také ve zdravotnictví, kde se očekává, že nanomateriály jako jsou např. CQD přinesou doslova revoluci, a to skrze jejich unikátní fyzikálně chemické vlastnosti. Díky svým vlastnostem mohou nanomateriály vstupovat do buněk v cílových orgánech a tkáních, mohou se uplatnit jako nosič kontrastní látky v lékařské diagnostice či jako nosič léčiv.

Na základě provedené literární rešerše spojené s možnostmi pracoviště, byla pozornost zaměřena na přípravu uhlíkových kvantových teček, jejich využití jako nosiče cytostaticky aktivní sloučeniny a stanovení jejich biologické aktivity na buněčné linii MOLT-4.

Uhlíkové kvantové tečky (CQD) byly připraveny jednoduchou metodou bottom-up pyrolýzou kyseliny citrónové při teplotě 200 °C, následnou neutralizací získaného roztoku pomocí NaOH a několikanásobnou dialýzou v demineralizované vodě. Při dialýze byla průběžně kontrolována hodnota vodivosti. Dialýza byla ukončena, když vodivost roztoku klesla pod hodnotu 12  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ . Úspěšnost přípravy CQD byla prokázána jednoduchým testem, kdy byl roztok osvětlen UV světlem o vlnové délce 365 nm a následně došlo k emitaci výrazné modré luminiscence (obr. 4). Na základě srovnání s literaturou můžeme odhadovat, že velikost připravených CQD je menší než 15 nm [4]. CQD připravené z kyseliny citronové obsahují karboxylové skupiny. Jednoznačný důkaz o těchto funkčních skupinách podávají naměřená IR spektra, která obsahují charakteristické vibrace  $\nu(\text{C}=\text{O})$  pro CQD 1706  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu(\text{C}=\text{O})$  pro CQD – CuDETA 1700  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu(\text{C}=\text{O})$  pro CQDGly(1:1) 1699  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu(\text{C}=\text{O})$  pro CQDGly(1:1) – CuDETA 1694  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O})$  pro CQDGly(1:4) – CuDETA 1692  $\text{cm}^{-1}$ .

Jak vyplývá z provedené literární rešerše, přítomnost funkčních skupin pro použití kvantových teček jako nosiče léčiva je důležitá. Pro zavedení aminové funkční skupiny byla uskutečněna příprava řízenou pyrolýzou ekvimolární směsi kyseliny citrónové s glycinem (CQDGly(1:1)). Postup experimentu byl shodný jako v případě přípravy CQD. Přítomnost dusíku ve struktuře kvantových teček byla potvrzena elementární



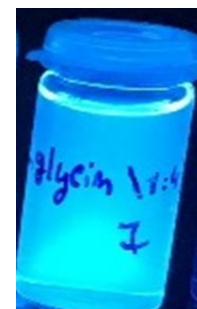
Obrázek 4 Modrá luminiscence CQD



Obrázek 5 Modrá luminiscence CQDGly(1:1)

analýzou (34,81 % C, 3,08 % H a 4,71 % N). Roztok osvětlený UV světlem poskytuje, obdobně jako v případě CQD, modrou luminiscenci (obr. 5).

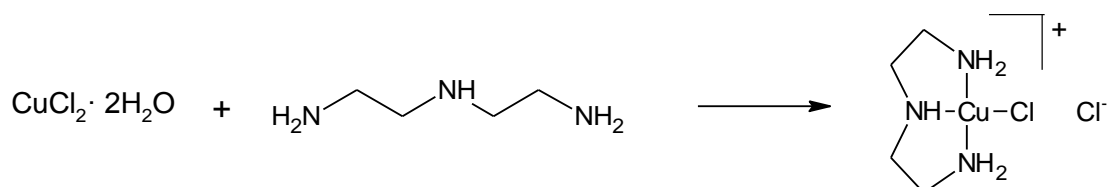
V dalším kroku bylo zkušeno zvýšení množství glycinu při přípravě kvantových teček. Obdobnou technikou byl připraven vzorek s čtyřnásobným molárním přebytkem glycinu oproti kyselině citronové (CQD-Gly(1:4)). Zvýšení množství přítomného dusíku bylo potvrzeno elementární analýzou (37,81 % C, 4,04 % H a 12,21 % N). I tento osvětlený vzorek pod UV světlem vykazoval modrou luminiscenci (obr. 6).



**Obrázek 6** Modrá luminiscence CQD-Gly(1:4)

Pokus s větším molárním přebytkem glycinu nebyl úspěšný z důvodu karbonizace taveniny.

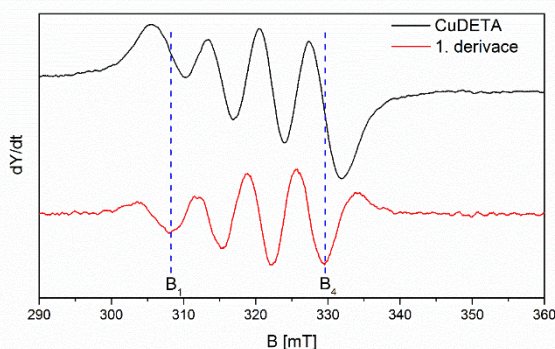
Komplex mědi byl připraven podle postupu uvedeného v literatuře [30] reakcí chloridu měďnatého s diethylenetriaminem (DETA) podle následující rovnice (viz schéma 1).



**Schéma 1** Příprava komplexu CuDETA reakcí chloridu měďnatého s diethylenetriaminem

Identita komplexu CuDETA byla jednoznačně potvrzena EPR spektroskopií. EPR spektroskopie (elektronová paramagnetická rezonance) patří do skupiny magnetických rezonančních metod. Jedná se o nejpoužívanější spektrální metodu pro studium sloučenin s nepárovým elektronem.

Experimentální izotropní spektrum obsahuje 4 linie v souladu s předpokládanou interakcí nepárového elektronu s centrálním atomem Cu s jaderným spinem 3/2. S využitím přesnějšího odečtu, pomocí derivace původního spektra (obr. 7), byly získány magnetické parametry pro komplex CuDETA ve vodném roztoku  $A_{\text{iso}} = 71.9 \text{ G}$  a  $g_{\text{iso}} = 2.110$ .



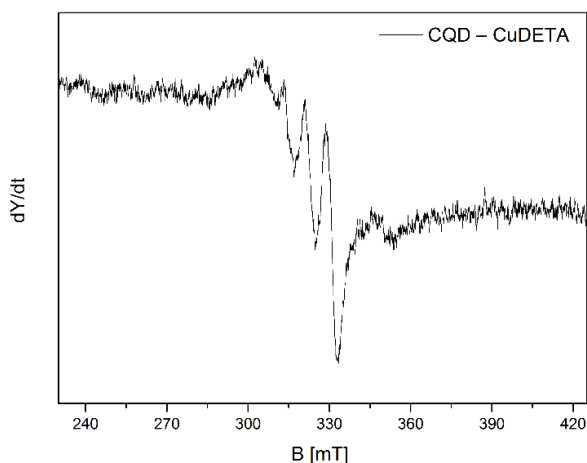
**Obrázek 7** EPR spektrum komplexu CuDETA a jeho první derivace

Dále byla studována možnost využít kvantové tečky jako nosič měďnatého komplexu. Byl vytvořen vodný roztok CuDETA a CQD (resp. CQDGly(1:1), CQDGly(1:4)). Směs byla míchána 15 h a pak dialyzována v demineralizované vodě. Dialýza byla ukončena, když hodnota vodivosti klesla pod hodnotu  $12 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ . I tyto vzorky byly osvětleny UV světlem a poskytují, obdobně jako v případě samotných kvantových teček, modrou luminiscenci (obr. 8).

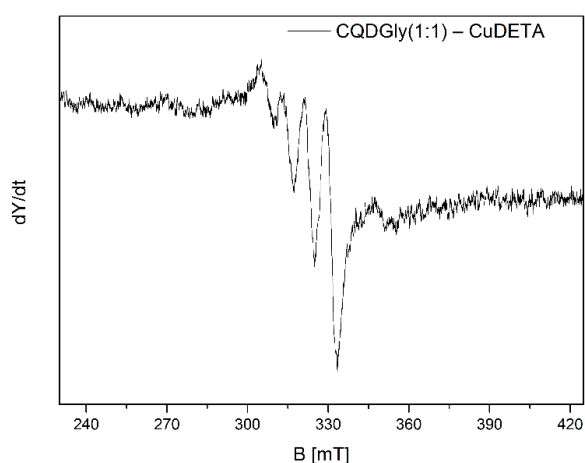


**Obrázek 8** Luminiscence; zleva: demineralizovaná voda, CQD – CuDETA, CQDGly(1:1) – CuDETA, CQDGly(1:4) – CuDETA a komplex CuDETA

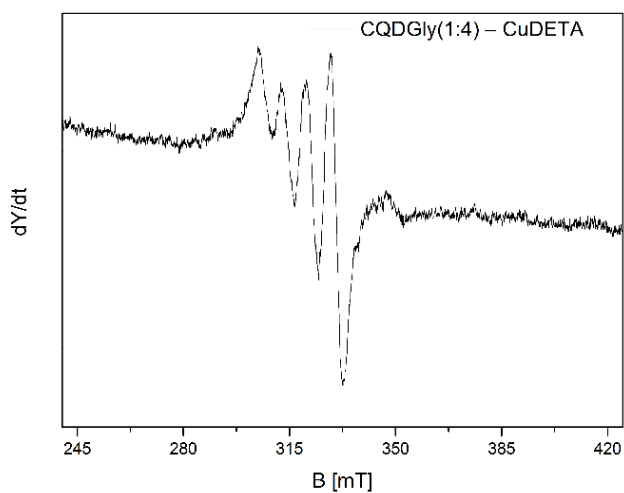
Přítomnost mědi byla ve všech případech prokázána EPR spektroskopií. Z uvedených spekter (obr. 9 až 11) je patrné, že se ve všech třech případech jedná o stejný charakter spektra obsahujícího čtyři pásy. Byly nalezeny magnetické parametry  $A_{\text{iso}} = 74,2 \text{ G}$  a  $g_{\text{iso}} = 2,107$  pro CQD – CuDETA,  $A_{\text{iso}} = 75,1 \text{ G}$  a  $g_{\text{iso}} = 2,105$  pro CQDGly(1:1) – CuDETA a  $A_{\text{iso}} = 73,1 \text{ G}$ ,  $g_{\text{iso}} = 2,108$  pro CQDGly(1:4) – CuDETA, které odpovídají parametrům nalezených pro komplex CuDETA. Z toho je patrné, že integrita měďnatého komplexu zůstala zachována.



**Obrázek 10** EPR spektrum CQD – CuDETA

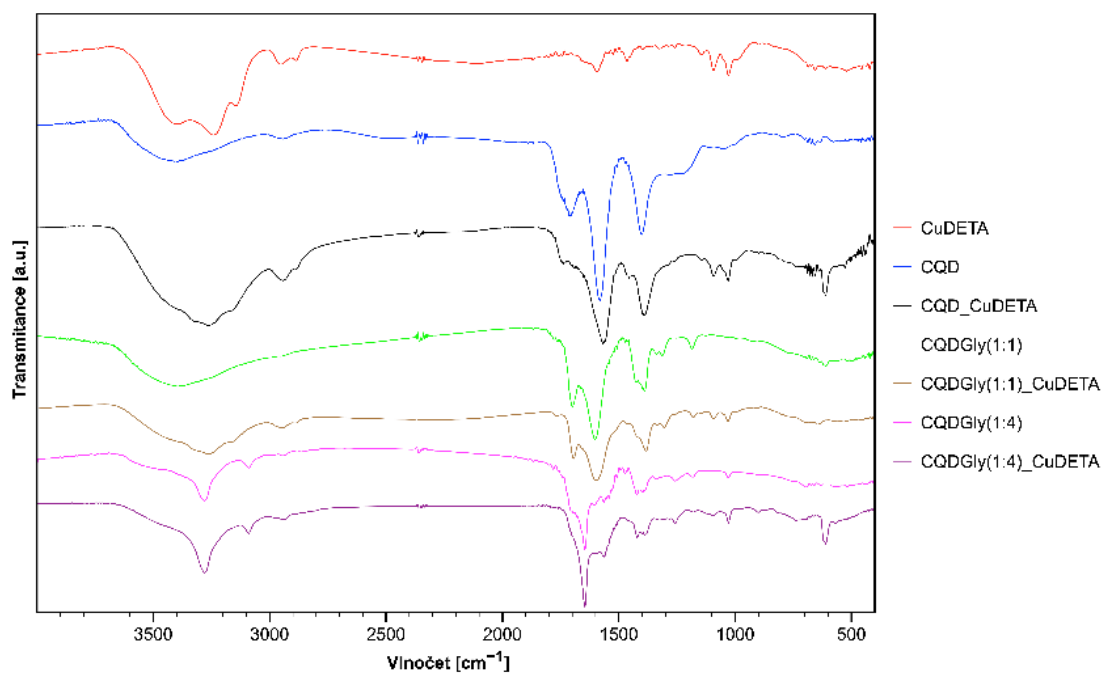


**Obrázek 9** EPR spektrum CQDGly(1:1) – CuDETA



**Obrázek 11** EPR spektrum CQDGly(1:4) – CuDETA

Obdobně i v infračervených spektrech byly nalezeny pásy pocházející, jak z měďnatého komplexu CuDETA, tak i z odpovídajících kvantových teček CQD, CQDGly(1:1) a CQD-Gly(1:4) (obr. 12).



**Obrázek 12** Infračervená spektra všech připravených produktů

Metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem bylo stanoveno množství mědi ve vzorcích CQD – CuDETA, CQDGly(1:1) – CuDETA a CQDGly(1:4) – CuDETA (tabulka 3).

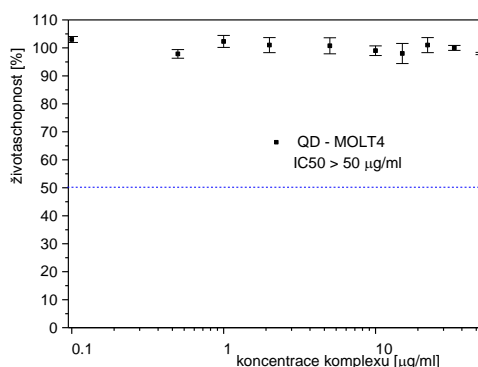
**Tabulka 3** Stanovení koncentrace mědi metodou ICP OES

	Cu ( $\mu\text{g/ml}$ )
CQD – CuDETA	281,2
CQDGly(1:1) – CuDETA	352,7
CQDGly(1:4) – CuDETA	98,31

### Studium cytotoxicity

Pro zjištění možnosti využití uhlíkových teček jako potencionální nosiče byla jako modelová sloučenina zvolena CQD – CuDETA. Dále byly testovány i jednotlivé součásti tzn., CQD a komplex CuDETA. Biologická aktivita byla stanovena pomocí WST-1 testu na buněčné linii MOLT-4, odvozené od buněčné linie T-lymfoblastické leukémie. Pro přípravu roztoků a následné vyhodnocení bylo nutné stanovit sušinu v případě vzorků CQD a CQD – CuDETA. Byly stanoveny hodnoty sušiny 2,8 mg/l pro CQD a 2,9 mg/l pro CQD – CuDETA. Každá koncentrace byla provedena v tetraplikátu a byla vypočítána jejich průměrná hodnota spolu se směrodatnou odchylkou. Získaná data byla zpracovaná do grafů v programu Origin Pro 9 v modulu „Analysis“ (graf 1-3). Grafy vyjadřují závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci testovaného komplexu.

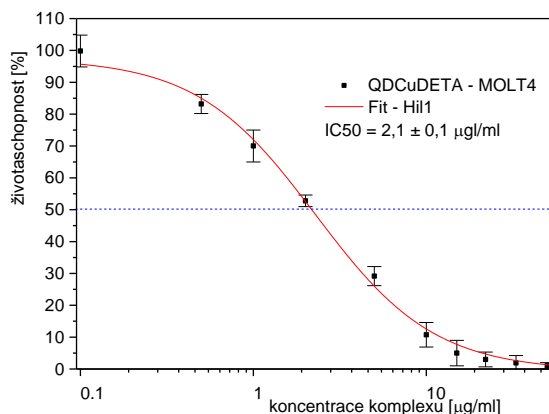
V případě CQD nebyl v měřeném rozsahu zaznamenán pokles životaschopnosti buněk (graf 1). Což znamená, že případná poloviční inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) je větší než 50  $\mu\text{g/ml}$ .



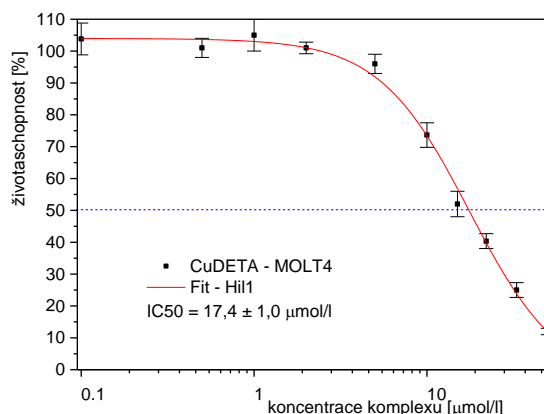
**Graf 1** Testování cytotoxicity CQD na buněčné linii MOLT-4



V případě sloučenin CuDETA a CQD – CuDETA byl nalezen předpokládaný průběh klesající viability s rostoucí koncentrací měřené látky. Data byla proložena předdefinovanou sigmoidní funkcí „Hill1“. Z těchto grafů (graf 2 a 3) byly odečteny hodnoty poloviční inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ). Pro sloučeninu CuDETA byla nalezena hodnota  $IC_{50}$   $17 \pm 1,0 \mu\text{mol/ml}$  a pro CQD – CuDETA byla nalezena hodnota  $IC_{50}$   $2,1 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ .



**Graf 3** Závislost životaschopnosti buněk MOLT-4 na koncentraci CQD – CuDETA



**Graf 2** Závislost životaschopnosti buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu CuDETA

Získané hodnoty jsou však z důvodu rozdílných vstupních jednotek g a mol těžko porovnatelné. Proto byly hodnoty  $IC_{50}$  přepočítány na  $\mu\text{g}$  respektive na  $\mu\text{mol}$  mědi (tabulka 4).

**Tabulka 4** Přepočet  $IC_{50}$  na množství navázané mědi z komplexu CuDETA

	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g Cu/ml}$ )	$IC_{50}$ ( $\text{mol Cu/ml}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol Cu/l}$ )
CuDETA	1,1057	0,0173	17,4
CQD – CuDETA	0,2036	$3,20 \cdot 10^{-3}$	3,2

Z tohoto porovnání plyne zajímavý výsledek. Sloučenina CQD – CuDETA vykazuje téměř 6krát větší cytostatickou aktivitu než samotný komplex CuDETA, což naznačuje, že potenciální nosič zvyšuje biologickou aktivitu tohoto typu cytostatického léčiva.

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu a studium biologických vlastností uhlíkových kvantových teček a jejich využití v medicíně jako nosiče léčiv. Experimentální část je věnována přípravě dvou typů kvantových teček. Oba typy byly připraveny řízenou pyrolýzou kyseliny citrónové. Vzhledem k tomu, že přítomnost funkčních skupin je pro použití CQD jako nosiče léčiva velmi důležitá, byly připraveny i CQD se zavedenou aminovou funkční skupinou pyrolýzou kyseliny citrónové a glycinu (CQDGly(1:1)). Bylo vyzkoušeno také zvýšení molárního zastoupení glycinu při přípravě (CQDGly(1:4)). Jako biologicky aktivní látka byl připraven chlorid chloro(diethylenetriamino)měďnatý (komplex CuDETA). Dalším krokem byla interakce kvantových teček s komplexem CuDETA.

Úspěšná příprava byla ověřena osvětlením produktů UV světlem za současné emise modré luminescence. Charakterizace jednotlivých kvantových teček pomocí infračervené spektroskopie ukázala, že se na všech měřených spektrech nachází pás charakteristických vibrací  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , což ukazuje na přítomnost karboxylových skupin. Elementární analýzou se potvrdilo, že zvýšením množství glycinu při přípravě se také zvýší zastoupení dusíku ve struktuře kvantových teček. EPR spektroskopii bylo možné pozorovat ve všech třech případech (CQD – CuDETA, CQDGly(1:1) – CuDETA, CQDGly(1:4) – CuDETA) stejný charakter spektra obsahujícího čtyři pásy, které jsou charakteristické pro přítomnost mědi.

V dalším kroku se sledovala biologická aktivita kvantových teček na buněčné linii odvozené od akutní T-lymfoblastické leukémie s názvem MOLT-4 pomocí WST-1 testu. V případě samotných CQD nebyl v měřeném rozsahu koncentrací zaznamenán pokles životaschopnosti buněk, což znamená, že případná poloviční inhibiční koncentrace ( $\text{IC}_{50}$ ) by mohla být větší než 50  $\mu\text{g/ml}$ . Pro komplex CuDETA byla nalezena hodnota  $\text{IC}_{50} = 17 \pm 1,0 \mu\text{mol/ml}$  a pro CQD – CuDETA byla nalezena hodnota  $\text{IC}_{50} = 2,1 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ . Po přepočtu na stejné jednotky vztažené k obsahu mědi bylo zjištěno, že sloučenina CQD – CuDETA vykazuje až 6krát větší cytostatickou aktivitu než samotný komplex CuDETA. Z toho vyplývá, že CQD může sloužit nejen jako nosič léčiva, ale může i zvyšovat účinnost tohoto typu cytostatického léčiva.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] DA SILVA, Paulo Sergio Rangel Cruz, IULIANELLI, Gisele Cristina Valle a TAVARES, Maria Inês Bruno. Spin-Spin Relaxation Time to Evaluate Degradation of HIPS/Organoclaynano Composites by Aging. *Materials Sciences and Applications*. 2017, **08**(05), 342-350. ISSN 2153-117X.
- [2] YU, Shu-Jung, KANG, Ming-Wei, CHANG, Huan-Cheng, CHEN, Kuan-Ming a YU, Yueh-Chung. Bright Fluorescent Nanodiamonds: No Photobleaching and Low Cytotoxicity. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, **127**(50), 17604-17605. ISSN 0002-7863
- [3] BAKER, Sheila N. a BAKER, Gary A. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010, **49**(38), 6726-6744. ISSN 14337851.
- [4] DONG, Yongqiang, SHAO, Jingwei, CHEN, Congqiang, WANG, Ruixue, CHI, Yuwu, LIN, Xiaomei a CHEN, Guonan. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid. *Carbon*. 2012, **50**(12), 4738-4743. ISSN 00086223.
- [5] BHATT, Indu a TRIPATHI, Bhumi Nath. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere*. 2011, **82**(3), 308-317. ISSN 00456535
- [6] VAJTAI, Robert. *Springer handbook of nanomaterials*. New York: Springer, 2013. ISBN 978-3-642-20595-1.
- [7] WANG, Wei, CHENG, Lu a LIU, WenGuang. Biological applications of carbon dots. *Science China Chemistry*. 2014, **57**(4), 522-539. ISSN 1674-7291.
- [8] LOH, Kian Ping, BAO, Qiaoliang, EDA, Goki a CHHOWALLA, Manish. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nature Chemistry*. 2010, **2**(12), 1015-1024. ISSN 1755-4330.

- [9] LI, X., WANG, X., ZHANG, L., LEE, S. a DAI, H. Chemically Derived, Ultrasooth Graphene Nanoribbon Semiconductors. *Science*. 2008, **319**(5867), 1229-1232. ISSN 0036-8075.
- [10] SHI, Xingbo, TU, Yang, LIU, Xiaojun, YEUNG, Edward S. a GAI, Hongwei. Photo-bleaching of quantum dots by non-resonant light. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013, **15**(9). ISSN 1463-9076.
- [11] FOURNIER-BIDOZ, Sébastien, JENNINGS, Travis L., KLOSTRANEC, Jesse M., FUNG, Winnie, RHEE, Alex, LI, David a CHAN, Warren C. W. Facile and Rapid One-Step Mass Preparation of Quantum-Dot Barcodes. *Angewandte Chemie International Edition*. 2008, **47**(30), 5577-5581. ISSN 14337851.
- [12] JAMIESON, Timothy, BAKHSHI, Raheleh, PETROVA, Daniela, POCOCK, Rachael, IMANI, Mo a SEIFALIAN, Alexander M. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*. 2007, **28**(31), 4717-4732. ISSN 01429612.
- [13] ROSENTHAL, Sandra J., CHANG, Jerry C., KOVTUN, Oleg, MCBRIDE, James R. a TOMLINSON, Ian D. Biocompatible Quantum Dots for Biological Applications. *Chemistry Biology*. 2011, **18**(1), 10-24. ISSN 10745521.
- [14] MURRAY, C. B., NORRIS, D. J. a BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society*. 1993, **115**(19), 8706-8715. ISSN 0002-7863.
- [15] BILAN, Regina, NABIEV, Igor a SUKHANOVA, Alyona. Quantum Dot-Based Nanotools for Bioimaging, Diagnostics, and Drug Delivery. *ChemBioChem*. 2016, **17**(22), 2103-2114. ISSN 14394227.
- [16] DUBERTRET, Benoit, SKOURIDES, Paris, NORRIS, David J., NOIREAUX, Vincent, BRINVALOU, Ali H. a LIBCHABER, Albert. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. *Science*. 2002. **298**(5599), 1759-1762. ISSN 00368075.

- [17] HAAS, Kathryn L. a FRANZ Katherine J. Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology. *Chemical Reviews*. 2009, **109**(10), 4921-4960. ISSN 0009-2665.
- [18] ZHENG, Bin, WANG, Chong, XIN, Xiaozhen, LIU, Fei, ZHOU, Xuejiao, ZHANG, Jingyan a GUO Shouwu. Electron Transfer from Graphene Quantum Dots to the Copper Complex Enhances Its Nuclease Activity. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2014, **118**(14), 7637-7642. ISSN 1932-7447.
- [19] JIANG, Qin, XIAO, Nan, SHI, Pengfei, ZHU, Yangguang a GUO, Zijian. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. *Coordination Chemistry Reviews*. 2007, **251**(15-16), 1951-1972. ISSN 00108545.
- [20] SASMAL, Pijus K., PATRA, Ashis K., NETHAJI, Munirathinam a CHAKRAVARTY, Akhil R. DNA Cleavage by New Oxovanadium(IV) Complexes of N-Salicylidene  $\alpha$ -Amino Acids and Phenanthroline Bases in the Photodynamic Therapy Window. *Inorganic Chemistry*. 2007, **46**(26), 11112-11121. ISSN 0020-1669.
- [21] SUN, Yi, HOU, Yuan-Jun, ZHOU, Qian-Xiong, LEI, Wan-Hua, CHEN, Jing-Rong, WANG, Xue-Song a ZHANG, Bao-Wen. Dinuclear Cu(II) Hypocrellin B Complexes with Enhanced Photocleavage Activity. *Inorganic Chemistry*. 2010, **49**(21), 10108-10116. ISSN 0020-1669.
- [22] JIANG, Qin, XIAO, Nan, SHI, Pengfei, ZHU, Yangguang a GUO, Zijian. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. *Coordination Chemistry Reviews*. 2007, **251**(15-16), 1951-1972. ISSN 00108545.
- [23] JIN, Yan a COWAN, J. A. DNA Cleavage by Copper – ATCUN Complexes. Factors Influencing Cleavage Mechanism and Linearization of dsDNA. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, **127**(23), 8408-8415. ISSN 0002-7863.
- [24] DEVEREUX, Michael, O SHEA, Denis, KELLETT, Andrew, et al. Synthesis, X-ray crystal structures and biomimetic and anticancer activities of novel copper(II)benzoate complexes incorporating 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole (thiabenzimidazole), 2-(2-pyridyl)benzimidazole and 1,10-phenanthroline as chelating nitrogen donor ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2007, **101**(6), 881-892. ISSN 01620134.

- [25] YASUMATSU, Naoko, YOSHIKAWA, Yutaka, ADACHI, Yusuke a SAKURAI, Hiromu. Antidiabetic copper(II)-picolinate: Impact of the first transition metal in the metallopicolinate complexes. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, **15**(14), 4917-4922. ISSN 09680896.
- [26] SIGMAALDRICH. Cell Proliferation Reagent WST-1. In: *Sigmaldrich.com* [online]. Germany: Roche Diagnostics, 2011 [cit. 2019-06-25]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=en&ion=CZ>
- [27] YIN, Lei-Miao, WEI, Yin, WANG, Yu, XU, Yu-Dong a YANG, Yong-Qing. Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. *International Journal of Medical Sciences.* 2013, **10**(1), 68-72. ISSN 1449-1907.
- [28] ATCC. MOLT-4 (ATCC® CRL-1582TM). In: *ATCC* [online]. Manassas: American Type Culture Collection, 2014 [cit. 2019-06-25]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1582.aspx>.
- [29] BORKOW, Gadi, GABBAY, Jeffrey KELLETT, Andrew, et al. Copper as a Biocidal Tool. *Current Medicinal Chemistry.* 2005, **12**(18), 2163-2175. ISSN 09298673.
- [30] SZILÁGYI, I., LABÁDI, I., HERNADI, K., PÁLINKÓ, I. a KISS, T. Synthesis and IR spectroscopic characterisation of immobilised superoxide dismutase (SOD) mimicking complexes. *Journal of Molecular Structure.* 2005, **744-747**, 495-500. ISSN 00222860.

