

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra obecné a anorganické chemie

PŘÍPRAVA, STUDIUM VLASTNOSTÍ A POTENCIÁLNÍ
VYUŽITÍ VYBRANÝCH NANOKOVŮ
(Au, Ag, Cu)

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor: MUDr. Ing. Zdeněk Bureš

Školitel: prof. Ing. Miroslav Vlček, CSc.

2024

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of General and Inorganic Chemistry

PREPARATION, STUDY OF THE PROPERTIES AND
POTENTIAL APPLICATIONS OF SELECTED NANOMETALS
(Au, Ag, Cu)

DOCTORAL THESIS

Author:	MUDr. Ing. Zdeněk Bureš
Supervisor:	prof. Ing. Miroslav Vlček, CSc.

2024

Prohlášení

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Hradci Králové dne 9. září 2024

Zdeněk Bureš

Poděkování

Velice rád bych na tomto místě poděkoval panu prof. Ing. Miroslavu Vlčkovi, CSc. za jeho odborné vedení, neutuchající podporu během mého kombinovaného studia, vřelý přístup, ochotu a vstřícnost. Téma práce si vyžádalo spolupráci s mnoha jinými pracovišti. Proto velký dík patří paní doc. Ing. Jarmile Vytřasové, CSc. z Katedry biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické a paní Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. ze stejné katedry za možnost realizovat testování antimikrobiálních účinků nanočástic na jejich pracovišti. Dále bych rád poděkoval za spolupráci při měření velikostí částic Ing. Jakubovi Opršalovi, Ph.D., Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph.D. a Ing. Petru Knotkovi, Ph.D. Díky spolupráci s prof. Ing. Miroslavem Pouzarem, Ph.D. a Ing. Jakubem Opršalem, Ph.D. vznikla část zaměřená na testování stability a chování stříbrných nanočástic v různých prostředích. Díky patří také doc. Ing. Mgr. Kateřině Peterek Dědkové z VŠB TU Ostrava za možnost provést některá měření. Velký dík patří Fondu mobility Univerzity Karlovy v Praze a Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze, díky kterým bylo možné absolvovat stáž na Mayo Clinic v Rochesteru, Minnesota, USA na Department of Orthopedic Surgery a Department of Biomedical Engineering. Profesor Michael Yaszemski, M.D., Ph.D. a profesorka Lichun Lu, Ph.D. mě v maximální míře během pobytu v USA podporovali a motivovali, bez nich by část zaměřená na cílení nanočástic zlata nemohla vzniknout. Teddymu Mammo M.D, Ph.D. vděčím za významnou pomoc nejen při experimentech s buněčnými liniemi, ale i za zprostředkování spolupráce s ostatními laboratoři Mayo Clinic a přátelský přístup. Velké díky patří Kristen Shogren a Jamesovi L. Herrickovi za neutuchající péči o zdárný průběh laboratorních experimentů a spolupráci k naplnění cílů mé stáže. Poděkování patří i dalším členům týmu laboratoře a Mayo Clinic, kteří mě podpořili svou ochotou a vždy přátelským přístupem.

Děkuji vedení mého pracoviště prof. MUDr. Vladimíru Blahovi, CSc. a prim. MUDr. Pavlovi Vyroubalovi, Ph.D. za podporu k dokončení mé práce při zaměstnání.

V neposlední řadě patří dík mé rodině za podporu během studia. Především děkuji mé babičce paní Anně Pohorské (†) za péči, starost, poskytovanou oporu a nenahraditelný pocit pohody a dědovi panu Václavu Pohorskému. Především díky jejich pochopení pro mé nadšení pro chemii a medicínu jsem mohl být tím, kým jsem.

Děkuji MUDr. Davidovi Albrechtovi za motivaci k dokončení disertační práce.

Anotace

Kovové nanočástice, jako jsou nanočástice mědi, zlata a stříbra, se stávají předmětem intenzivního výzkumu díky svým antibakteriálním účinkům a široké škále aplikací v medicíně a průmyslu. Do popředí zájmu se dostává testování jejich baktericidity právě pro jejich potenciální uplatnění v boji proti patogenním organismům. Toto téma nabývá na významu v kontextu narůstající antimikrobiální rezistence na antibiotik a vzniku multirezistentních kmenů spojených s nárůstem mortality.

Výzkum provedený v rámci této disertační práce se zaměřuje na přípravu a charakterizaci výše uvedených kovových nanočástic a testování jejich antimikrobiálních účinků standardními metodami využívanými pro testování antibakteriální účinků (diluční a disková difúzní metoda). Důležitým faktorem je stabilita připravených kovových nanočástic, která ovlivňuje jejich chování v biologických systémech a má vliv na jejich potenciální terapeutické aplikace. Vlastnosti nanočástic, jako jsou velikost, tvar a funkcionalizace jejich povrchu, hrají klíčovou roli při zkoumání jejich interakce s biologickými systémy. Testování antimikrobiálních účinků nanočástic klasickými metodami proto naráží na komplexní problém související s chováním nanočástic v testovacím prostředí.

Na tento problém jsme se zaměřili při testování stability stříbrných nanočástic v médiích používaných pro testování ekotoxicity. Byla testována stabilita připravených nanočástic v závislosti na vlastnostech testovacího média. Popis chování kovových nanočástic v různém prostředí je aktuální i pro hodnocení jejich potenciální ekotoxicity.

V kontextu léčby kostních nádorů, resp. osteosarkomu nabývá v současnosti na významu cílená léčba, která může využívat funkcionalizaci nanočástic za účelem optimalizace jejich distribučních a efektorových vlastností. Proces uptake nanočástic v cílových buňkách je zásadní pro jejich terapeutický účinek a vyžaduje podrobné pochopení mechanismů interakce mezi nanočásticemi a biologickými strukturami. Pro tento účel byly připraveny nanočásticové systémy zlata různých velikostí (5 nm, 50 nm) a funkcionalizovány signálními peptidy (CPP, NLS) a zkoumán uptake nádorovými buňkami osteosarkomu.

Výsledky práce naznačují, že nanočástice kovů mají potenciál představovat revoluční přístup v různých zdravotnických aplikacích včetně onkologické léčby, avšak vyžadují další zkoumání zaměřená na jejich bezpečnost a efektivitu.

Klíčová slova

Kovové nanočástice, nanočástice mědi, nanočástice zlata, nanočástice stříbra, antibakteriální účinky kovových nanočástic, testování baktericidity, stabilita kovových nanočástic, vlastnosti nanočástic, kostní nádory, cílená léčba, funkcionalizace nanočástic, buněčné linie, osteosarkom, uptake nanočástic.

Annotation

Metallic nanoparticles, such as copper, gold, and silver nanoparticles, are becoming the subject of intensive research due to their antibacterial effects and a wide range of applications in medicine and industry. The testing of their bactericidal properties is coming to the forefront of interest precisely because of their potential use in combating pathogenic organisms. This topic is gaining importance in the context of increasing antimicrobial resistance to antibiotics and the emergence of multi-resistant strains associated with increased mortality.

The research conducted within this dissertation focuses on the preparation and characterization of the aforementioned metallic nanoparticles and the testing of their antimicrobial effects using standard methods employed for testing antibacterial effects (dilution and disk diffusion methods). An important factor is the stability of the prepared metallic nanoparticles, which affects their behavior in biological systems and influences their potential therapeutic applications. The properties of nanoparticles, such as size, shape, and surface functionalization, play a key role in examining their interaction with biological systems. Testing the antimicrobial effects of nanoparticles using classical methods thus encounters a complex problem related to the behavior of nanoparticles in the test environment.

We focused on this problem when testing the stability of silver nanoparticles in media used for ecotoxicity testing. The stability of the prepared nanoparticles was tested depending on the properties of the test medium. Describing the behavior of metallic nanoparticles in different environments is also relevant for assessing their potential ecotoxicity.

In the context of bone tumor treatment, specifically osteosarcoma, targeted therapy is currently gaining importance, which can utilize the functionalization of nanoparticles to optimize their distribution and effector properties. The uptake process of nanoparticles in target cells is crucial for their therapeutic effect and requires a detailed understanding of the mechanisms of interaction between nanoparticles and biological structures. For this purpose, gold nanoparticle systems of different sizes (5 nm, 50 nm) were prepared and functionalized with signaling peptides (CPP, NLS) and the uptake by osteosarcoma tumor cells was examined.

The results of the work suggest that metallic nanoparticles have the potential to represent a revolutionary approach in various medical applications, including cancer treatment, but require further research focused on their safety and efficacy.

Keywords

Metallic nanoparticles, copper nanoparticles, gold nanoparticles, silver nanoparticles, antibacterial effects of metallic nanoparticles, bactericidal testing, stability of metallic nanoparticles, properties of nanoparticles, bone tumors, targeted therapy, functionalization of nanoparticles, cell lines, osteosarcoma, nanoparticles uptake.

Obsah

1	Seznam zkratk	12
2	Úvod	13
3	Teoretická část	14
3.1	Nanotechnologie a nanomateriály	14
3.2	Nanočástice	15
3.3	Metody syntézy nanočástic	17
3.3.1	Fyzikální metody	18
3.3.2	Fyzikálně – chemické metody	18
3.3.3	Chemické metody	19
3.3.4	Biologické metody	24
3.4	Vlastnosti koloidů kovových nanočástic	26
3.4.1	Elektrická dvojvrstva a stabilita koloidních systémů kovových nanočástic	28
3.4.2	Potenciál ζ	31
3.4.3	Elektrostatické interakce a elektrostatická stabilizace kovových nanočástic	34
3.4.4	DLVO teorie – koagulace koloidních částic	35
3.4.5	Stérická stabilizace kovových nanočástic	36
3.4.6	Elektrostérická stabilizace kovových nanočástic	38
3.4.7	Optické vlastnosti kovových koloidů	40
3.5	Charakterizace kovových nanočástic	43
3.5.1	Velikost nanočástic	45
3.5.2	Tvar nanočástic	47
3.5.3	ζ potenciál koloidů nanočástic	48
3.5.4	Transmisní elektronová mikroskopie	50
3.5.5	Skenovací elektronová mikroskopie	52
3.5.6	Mikroskopie atomárních sil	52
3.5.7	Rentgenová difrakce	54
3.5.8	Dynamický rozptyl světla	55
3.6	Antimikrobiální vlastnosti kovových nanočástic a jejich potenciál v době narůstající antibiotické rezistence	56
3.6.1	Historie infekčních onemocnění a hrozba antibiotické rezistence	56
3.6.2	Nanočástice jako potenciální antibakteriální prostředky	58
3.6.3	Mechanismy antibakteriálního působení kovových nanočástic	59
3.6.4	Bakterie a jejich stavba	63
3.6.5	Testované mikroorganismy	66
3.6.6	Metody testování antibakteriálních účinků	67
3.7	Nanočástice zlata	70

3.7.1	Příprava nanočástic zlata	70
3.7.2	Biologické aplikace a antimikrobiální účinky nanočástic zlata.....	70
3.7.3	Toxicita nanočástic zlata.....	72
3.8	Nanočástice stříbra	72
3.8.1	Příprava nanočástic stříbra.....	73
3.8.2	Biologické aplikace a antimikrobiální účinky nanočástic stříbra	74
3.8.3	Toxicita nanočástic stříbra	75
3.9	Nanočástice mědi	76
3.9.1	Příprava nanočástic mědi	77
3.9.2	Biologické aplikace a antimikrobiální účinky nanočástic mědi	77
3.9.3	Toxicita nanočástic mědi	78
3.10	Cílený transport zlatých nanočástic do osteosarkomových buněk pro potenciální využití v radioterapii a cílené léčbě nádorů.	79
3.11	Osteosarkom – zhoubný nádor kostí	89
3.12	Osteosarkomové buněčné linie 143B.....	90
3.13	Stanovení buněčné toxicity zlatých nanočástic.....	90
4	Experimentální část	92
4.1	Příprava a charakterizace nanočástic Au, Ag, Cu	92
4.1.1	Použité chemikálie	92
4.1.2	Použité zařízení a pomůcky	92
4.1.1	Příprava kovových nanočástic Au, Ag, Cu.....	93
4.1.2	Měření velikosti nanočástic a ζ potenciálu	96
4.1.3	Měření absorpčních spekter	96
4.1.4	Mikroskopie atomárních sil – AFM.....	97
4.1.5	Skenovací elektronová mikroskopie – SEM.....	97
4.1.6	Rentgenová difrakční analýza – XRD	97
4.2	Testování antibakteriálních účinků připravených nanočástic Au, Ag, Cu.....	98
4.2.1	Testované kmeny bakterií a kvasinek	98
4.2.2	Použité zařízení a pomůcky	98
4.2.3	Příprava pracovních roztoků a kultivačních médií	98
4.2.4	Difúzní diskový test.....	99
4.2.5	Diluční metoda.....	100
4.3	Studium chování stříbrných nanočástic v tekutém médiu pro testování ekotoxicity	101
4.3.1	Příprava média 203 dle OECD	102
4.3.2	Měření hydrodynamického průměru, ζ potenciálu a iontové měrné vodivosti	102
4.4	Cílený transport zlatých nanočástic do osteosarkomových buněk pro potenciální využití v radioterapii a cílené léčbě nádorů.	103

4.4.1	Použité chemikálie	103
4.4.2	Použité zařízení a pomůcky	103
4.4.3	Příprava zlatých nanočástic	103
4.4.4	Měření velikosti částic připravených nanočástic zlata pomocí DLS	105
4.4.5	Stabilizace zlatých nanočástic – PEG-ylace	105
4.4.6	Konjugace zlatých nanočástic se signálními peptidy	106
4.4.7	Příprava Dulbeccova modifikovaného Eaglova média (DMEM).....	106
4.4.8	Kultivace osteosarkomových buněk 143B	107
4.4.9	Testování toxicity <i>in vitro</i>	107
4.4.10	Uptake zlatých nanočástic nefunkcionalizovaných signálními peptidy	108
4.4.11	Uptake zlatých nanočástic funkcionalizovaných signálními peptidy	108
4.4.12	Transmisní elektronová mikroskopie.....	109
5	Výsledky a diskuse	110
5.1	Příprava a charakterizace nanočástic Au, Ag, Cu	110
5.1.1	Nanočástice zlata (Au).....	110
5.1.2	Nanočástice stříbra.....	114
5.1.3	Nanočástice mědi	120
5.2	Testování antibakteriálních účinků připravených nanočástic Au, Ag, Cu.....	121
5.2.1	Difúzní diskový test	121
5.2.2	Makrodiluční metoda	123
5.3	Studium chování stříbrných nanočástic v tekutém médiu pro testování ekotoxicity 127	
5.4	Cílený transport zlatých nanočástic do osteosarkomových buněk pro potenciální využití v radioterapii a cílené léčbě nádorů	133
6	Závěry	143
7	Seznam literatury	147
8	Seznam obrázků.....	160
9	Seznam tabulek.....	164
10	Přílohy.....	165

1 Seznam zkratek

A	absorbance
AFM	mikroskopie atomárních sil
c	molární koncentrace
CPP	Cell Penetrating Peptide
E	lineární absorbní koeficient
HIV	virus způsobující ztrátu obranyschopnosti
I, I ₀	intenzita záření
l	tloušťka vrstvy
LSPR	lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance
MHA	Meuller – Hintonův agar
MHB	Mueller – Hintonův bujón
MTS	tetrazoliová sůl
NIR	blízká infračervená oblast
NADH	Nikotinamiddinukleotid
NADPH	Nikotinamiddinukleotidfosfát
Na-Citr.	citronan sodný
NLS	Nuclear Localisation Signal
NP	nanočástice
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PEG	polyethylenglykol
PES	Fenazin ethosulfát
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SERS	spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu
SPR	povrchová plasmonová rezonance
T	transmittance
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
UV-VIS	týkající se ultrafialové a viditelné oblasti
XFS	rentgenová fluorescenční spektrometrie
λ	vlnová délka

2 Úvod

Nanočástice kovů vykazují vysoce specifické vlastnosti, které je odlišují od jejich makroskopických forem. Kovové nanočástice mají vzhledem ke své velikosti, která se pohybuje v rozmezí jednotek až desítek nanometrů, unikátní fyzikální a chemické vlastnosti. Porozumění těmto vlastnostem je klíčové jak pro další rozvoj nanotechnologií, tak i pro možné aplikace v oblastech jako jsou biomedicína, elektronika, optika, katalýza, senzorika nebo environmentální technologie a další.

V době narůstající antibiotické rezistence, spojené se vznikem multirezistentních bakterií a s hrozbou narůstající úmrtnosti na infekční onemocnění s nimi spojených, jsou kovové nanočástice testovány jako potenciální antimikrobiální látky. Kovové nanočástice při interakci s bakteriální buňkou nabízejí odlišný mechanismus působení než dosud používaná antibiotika a mohly by tak být vhodným kandidátem pro léčbu infekcí. Pro testování antimikrobiálních účinků nanočástic však neexistuje jednotný standardizovaný postup. Samotné aplikační využití kovových nanočástic v léčbě infekcí předpokládá porozumět chování nanočástic v testovacím prostředí, resp. interakcím se samotnými bakteriálními buňkami či jejich interakcím v celém organismu.

S masivně narůstající produkcí a aplikačním využitím nanočástic se otevírá otázka jejich bezpečnosti ať už na úrovni interakce s lidským organismem, tak i v případě jejich úniku do životního prostředí. Testování cytotoxicity a ekotoxicity nejen kovových nanočástic jsou stále aktuálním tématem a výzkumnou výzvou, kdy je třeba brát v úvahu stabilitu a chování nanočásticových systémů při daných testovacích podmínkách.

Díky velkému poměru povrchu kovových nanočástic k jejich objemu nabízejí kovové nanočástice unikátní možnosti funkcionalizovat jejich povrch různými molekulami. Zlaté nanočástice tak díky své relativně malé toxicitě a vynikající afinitě k např. thiolovým skupinám nabízejí skvělý substrát pro funkcionalizaci jejich povrchu nejrůznějšími signálními molekulami či chemoterapeutiky. Takové nanočástice lze využít např. pro cílenou léčbu nádorů. Výhodou oproti standardní chemoterapii a radioterapii by mohla být radiosenzitizační léčba s využitím zlatých nanočástic pro pacienta šetrnější a snížit tak celkovou aplikovanou radiační dávku.

3 Teoretická část

3.1 Nanotechnologie a nanomateriály

Nanotechnologie označuje odvětví vědy a inženýrství věnované materiálům, které mají rozměry v řádu 100 nm nebo méně. Nanomateriály jsou definovány jako materiály, které se skládají z nanočástic, z nichž alespoň 50 % má jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí 1 až 100 nm.^{1–3}

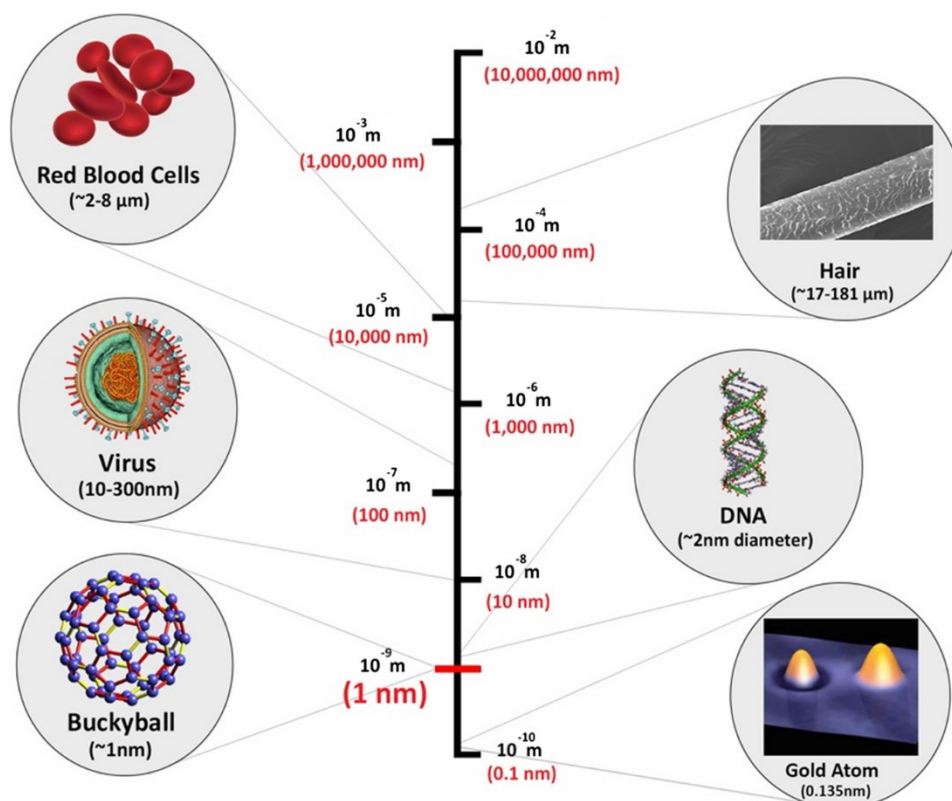
Již roku 1959 fyzik Richard P. Feynman z Cal Tech, předpověděl příchod nanomateriálů. Při jedné z přednášek řekl: „There is plenty of room at the bottom“ a předurčil, že klíčem k budoucím technologiím je zmenšení na nanoúroveň.⁴

Tyto nové nanomateriály vykazují odlišné fyzikálně-chemické chování ve srovnání s jejich „makro“ protějšky. Tento rozdíl lze přičíst vysokému poměru povrchu k objemu nanomateriálů. Povrchové atomy a povrchová energie silně souvisí s vlastnostmi nanomateriálů, což vede například ke zmenšení hodnot mřížkových parametrů, či ke snížení hodnot bodů tání. Vysoký počet povrchových atomů a vysoká povrchová energie nanočástic silně ovlivňuje jejich katalytické vlastnosti. Pokud pevná látka obsahuje méně atomů, pak přispívá k tvorbě pásu nižší počet orbitalů. Tento efekt vede v nanočásticích ke změnám vodivostních pásů a tyto změny jsou podobné změnám velikosti zakázaného pásu v polovodičích a závisí na rozměrech nanomateriálu.¹

Nanočástice byly před deseti lety studovány především pro jejich speciální fyzikální a chemické vlastnosti závislé na jejich velikosti, umožňující větší funkcionalitu povrchu, čímž nanočástice nabývají speciálních fyzikálních, elektronických, optických a magnetických vlastností². V současné době nanočástice vstoupily do komerčního výzkumu³ a v posledních letech se nanotechnologie rozšířily do mnoha průmyslových odvětví. Aplicační využití nacházejí v mnoha oblastech: elektronické úložné systémy, fotovoltaika, uložení plynů, katalýza, elektrická a optická zařízení, magnetická separace a prekoncentrace cílových analytů, biotechnologie, diagnostika, ale také v oblastech cíleného dodávání léků a genů^{3,5–9}. S ohledem na širokou škálu možností využití mají takové nanosystémy potenciál zásadně ovlivnit naši společnost.²

Díky shora uvedeným vlastnostem jsou také nanočástice vynikajícím kandidátem pro biomedicínské aplikace, i právě pro to, že různé biologické procesy probíhají v nanometrových měřítcích. Živé organismy jsou tvořeny buňkami, jejichž obvyklé rozměry jsou přibližně 10 μm . Části buněk jsou však mnohem menší a pohybují se v oblasti

submikronových rozměrů. Ještě menší jsou proteiny s typickou velikostí pouhých 5 nm, což je srovnatelné s rozměry nejmenších člověkem vyrobených nanočástic³. Toto jednoduché srovnání velikostí (Obrázek 1) dává představu o využití nanočástic jako velmi malých sond, které by nám umožnily studovat buněčné mechanismy, aniž by samy vnášely příliš mnoho rušivých vlivů¹⁰. Pochopení biologických procesů na úrovni nanorozměrů je silnou hnací silou rozvoje nanotechnologií.



Obrázek 1: Porovnání velikosti nanomateriálů (v logaritmické škále) s biologickými objekty a definice velikostí "nano" a "mikro".¹¹

3.2 Nanočástice

Termín „nanočástice“, resp. předpona „nano“ pochází z řečtiny a znamená „trpaslík nebo malý“. Jde o označení velikosti 10^{-9} metru. První zmínky o nanočásticích pocházejí z 4.-5. století před n. l. z Egypta a Číny. Tehdy bylo objeveno „rozpuštěné zlato“, které bylo používáno pro estetické nebo pro léčivé účely¹². Asi nejznámějším dokladem nanotechnologie je Lykurgův pohár vyrobený v období mezi lety 290 a 325 n. l. v Alexandrii nebo Římě. Sklo poháru je dichroické, což znamená, že v dopadajícím světle vypadá jako jasně zelený s neprůhledným zelenožlutým tónem, ale v procházejícím světle se mění na rubínovou barvu.

Tuto vlastnost sklu propůjčují rozptýlené nanočástice zlata a stříbra.¹³ V roce 1857 Faraday připravil redukcí vodného roztoku tetrachlorozlatitanu koloidní zlato¹⁴. Termín koloid pochází řeckých slov „*kolla*“, což je název pro „lepidlo“, a „*eidōs*“, což znamená „podobný“¹⁵. Poprvé jej použil Thomas Graham v roce 1861¹⁶ k označení směsí, jako je např. škrob a želatina ve vodě¹⁷. Jako koloid obvykle označujeme disperzi s částicemi o velikosti od 1 nm do 1000 nm (resp. 500 nm).

Ve srovnání s většími částicemi mají nanočástice obvykle o 35-45 % vyšší poměr povrchu k objemu.¹⁸ Tato vysoká hodnota poměru ovlivňuje i různé intrinsické vlastnosti nanočástic jako je jejich vysoká povrchová reaktivita.¹⁸

Nanočástice existují v různých chemických složeních od micel po kovy (resp. jejich oxidy), od syntetických polymerů po velké biomolekuly. Za poslední dvě desetiletí byly zavedeny různé klasifikace nanomateriálů. Jedním ze způsobů klasifikace je rozdělení na nanočástice přírodní a syntetické. Další možností je klasifikace dle jejich prostorového uspořádání na 3D, 2D, 1D a 0D. Praktickou klasifikaci navrhnul Tuominen et al.¹⁹, kteří rozdělili nanomateriály do pěti skupin: materiály na bázi kovů, materiály na bázi uhlíku, polymerní nanomateriály, dendrimery a kompozity.

Každý z těchto materiálů má zcela odlišnou chemii. Již při přípravě vlastních nanočástic je třeba uvážit jejich další aplikaci. Nanočástice mohou být připraveny různými metodami a lze tak dosáhnout požadovaných velikostí a tvarů a tím i požadovaných chemických a fyzikálních vlastností^{5,20}. Velikost a tvar ovlivňují kapacitu pro funkcionalizaci nanočástic, tekutinový odpor a difúzi tekutiny, optické vlastnosti a příjem nanočástic buňkami. Povrchový náboj, kromě kontroly stability koloidní suspenze a její tendence k agregaci, hraje hlavní roli při utváření interakcí mezi nanočásticemi a okolním prostředím.¹

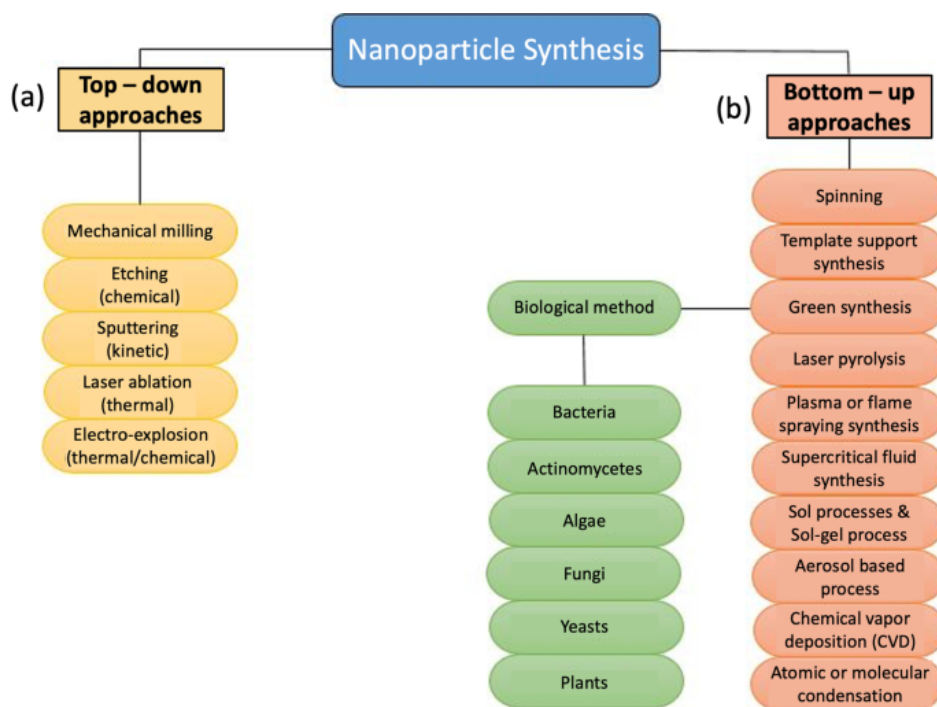
Klíčovým problémem, který brání využití nanočástic v průmyslu je jejich reprodukovatelnost. Tento problém je však nanočásticím částečně vlastní, protože produkt syntézy je vždy náchylný k polydisperzi, někdy se širokou distribucí velikostí, tvarů a defektů¹.

Charakterizace nanočástic je proto zásadním krokem potřebným k úplnému pochopení chování nanočástic a následnému převedení jejich výkonnostních výhod z laboratoří do konkrétních reálných aplikací. Určení fyzikálně-chemických vlastností nanočástic a zkoumání jejich vztahů mezi strukturou a funkcí je výzvou pro dnešní vědu. Toto úsilí je omezeno naší schopností plně prozkoumávat oblast nanoměřítek – různé charakterizační techniky jsou

založeny na různých fyzikálních vlastnostech materiálů, a proto každá z těchto analytických metod nám poskytuje pouze částečnou informaci o daném parametru.¹

3.3 Metody syntézy nanočástic

Nanočástice lze dle způsobů přípravy dělit na přístupy „bottom up“ („zdola nahoru“), které jsou založeny na výstavbě nanočástic „odspodu“ tedy atom po atomu, resp. molekula po molekule – jde o metody kondenzační, oproti tomu metody „top down“ („shora dolů“) jsou založeny na postupném dělení objemových vzorků na menší částice – jde o metody dispergační (broušení, leptání, ablace, řezání, naprašování, tepelný rozklad a další)^{9,11,18,21} (Obrázek 2).



Obrázek 2: Běžně využívané syntetické metody nanočástic „top-down“ a „bottom-up“ přístupy.^{11,21}

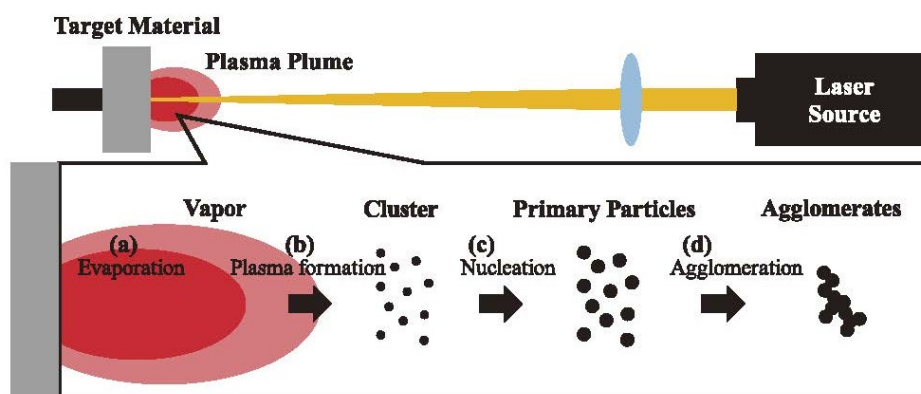
Ačkoliv je příprava nanočástic metodami „top down“ poměrně jednoduchá, tak není příliš vhodná pro přípravu nanočástic nepravidelných tvarů a nanočástic malých velikostí¹⁸. Mezi nevýhody přístupů „top down“ patří i povrchové strukturální defekty vznikající během některých způsobů syntézy. Tyto defekty mají negativní dopad na fyzikální vlastnosti a povrchovou chemii kovových nanočástic¹⁸.

3.3.1 Fyzikální metody

Fyzikální metody obvykle vedou k částicím s velkou variabilitou průměrů. Koloidní částice připravené těmito metodami mají často průměr větší než 10 nm a jejich příprava je hůře reprodukovatelná¹⁸.

Nanočástice lze například připravit mechanickým mletím hrudkových materiálů a stabilizovat je přidáním koloidních ochranných činidel. Vniklé nanočástice jsou obvykle polydispersní a mohou být kontaminovány mlecím materiálem^{9,18}. Tyto metody jsou výhodné pro svou jednoduchost, jde však o metody energeticky náročné a některé metody jsou méně vhodné pro přípravu částic o požadované velikosti.

Jiné techniky zahrnují např. laserovou ablaci (Obrázek 3) – poskytující velmi čisté nanočástice, avšak v malém množství^{22,23}. Velikost nanočástic lze měnit použitou energií laseru²³. Další metody jsou např. naprašování a PVD (depozice z plynné fáze)^{9,18}. Současné požadavky na nanočástice zahrnují dosažení definovaného průměru a složení jejich povrchu, stejně jako požadavek na reprodukovatelnost samotné syntézy, vlastností a snadnou separaci nanočástic.



Obrázek 3: Příprava nanočástic laserovou ablací.²³

3.3.2 Fyzikálně – chemické metody

Jsou metody využívající např. rozklad vhodných organokovových sloučenin, pyrolytické metody, elektrolytické metody, hydrotermální syntézu, zářením asistované redukční reakce – fotochemickou syntézu, radiolýzu, mikrovlnné či ultrazvukové metody, a další^{8,9,18,24}.

3.3.3 Chemické metody

Chemické metody přípravy kovových nanočástic jsou v praxi využívány nejčastěji, protože umožňují snadnou a kontrolovatelnou přípravu nanočástic definované velikosti, krystalinity a složení²². Navíc lze vhodně volenou velikostí nanočástic kontrolovaně nastavovat i plasmonovou absorbanci a fluorescenci k předávání elektronických a fotonových signálů. Nevýhodou může být používání redukčních činidel, která jsou toxická (hydrazin, tetrahydridoboritan, diboran, silany a další).

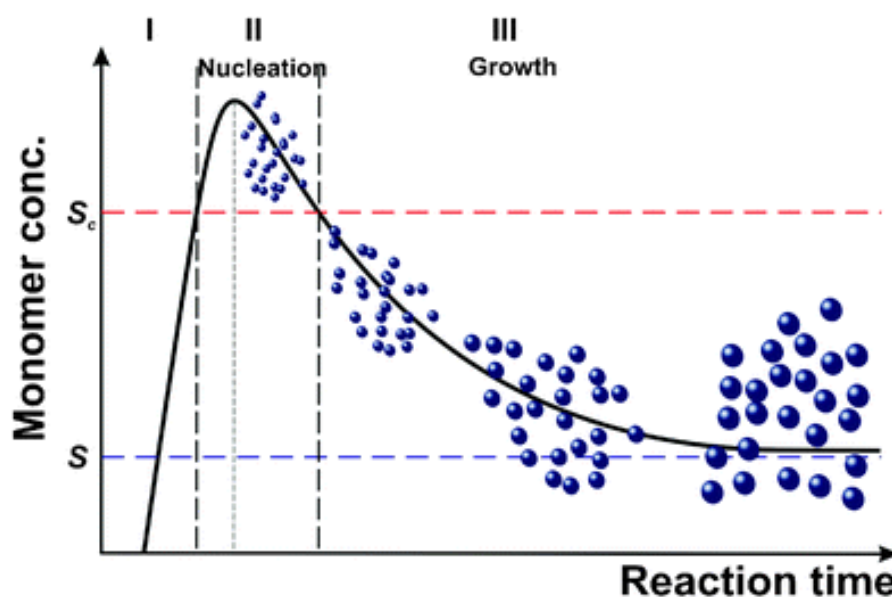
Nejvíce rozšířená a velmi snadno proveditelná metoda pro přípravu koloidních suspenzí kovů spočívá v redukci solí přechodných kovů. Syntéza kovových nanočástic v roztoku vyžaduje kovový prekurzor, nejčastěji ve formě příslušné soli připravovaného nanokovu, redukční činidlo a stabilizační činidlo. Za tímto účelem je používán velký rozsah redukčních činidel, např. hydrazin, hydridy (NaBH_4), redukující cukry např. glukosa, galaktosa, fruktosa (Tollensův způsob^{25,26})⁹, soli organických kyselin – např. citrát sodný (Turkevichova metoda)^{27,28}, kyselina askorbová (vitamin C)²⁹, fenolické látky jako je hydrochinon³⁰, pyrogallol³¹ či kyselina gallová³² a mnoho dalších. Tato metoda umožňuje připravit koloidní kovové nanočástice požadované velikosti s malou odchylkou až v gramových množstvích.

3.3.3.1 Nukleační teorie tvorby nanočástic

První výzkumné snahy spojené s tvorbou monodisperzních koloidních částic byly provedeny již ve 40. letech 20. století. LaMer a spolupracovníci odhalili, že pro výrobu koloidů z monomerů s úzkou distribucí velikostí částic je nezbytné krátké nukleační vzplanutí („burst“) následované pomalým řízeným růstem (bez další nukleace)^{33–35}. Ačkoli byl tento model ve skutečnosti vyvinut pro model koloidní síry (srážením z roztoku thiosíranu sodného), resp. sirné hydrosoly a olejové aerosoly, bývá často tento mechanismus používán i k popisu tvorby nanočástic.

Podle LaMerova modelu lze celý proces nukleace a růstu rozdělit do tří fází (Obrázek 4). V první fázi se koncentrace monomeru postupně zvyšuje, dokud nedosáhne bodu přesycení (S). Pokud nejsou přítomny žádné nečistoty (jako prachové částice nebo malé krystality), které by iniciovaly heterogenní nukleaci, je možná pouze homogenní nukleace. Protože je však energetická bariéra pro iniciaci homogenního nukleačního děje značně

vysoká, může se koncentrace monomeru dále zvyšovat (fáze II). Ve fázi II přesycení konečně dosáhne kritické hodnoty (S_c), což znamená, že systém obsahuje dostatek energie k překonání energetické bariéry. Proto může kdykoli dojít k homogenní nukleaci v celém reakčním roztoku. Nakonec se současně vytvoří velké množství nukleačních jader a v důsledku toho koncentrace monomeru drasticky klesne pod bod, kdy už není možná žádná další nukleace. A konečně, ve fázi III (růst) všechna jádra rostou ve stejnou dobu, a protože jejich historie růstu je identická, nanočástice vznikají s výjimečně úzkou distribucí velikostí.^{34–36}

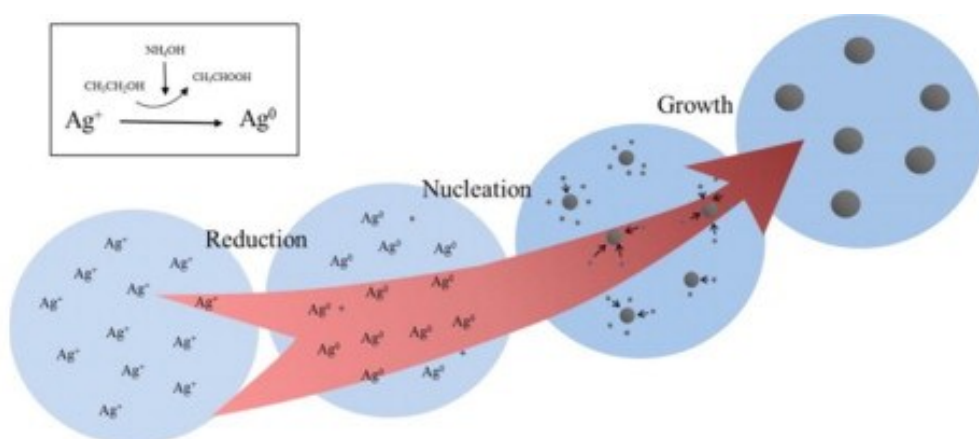


Obrázek 4: LaMerův graf ilustrující oddělenou nukleaci a růst během syntézy monodisperzních nanočástic. S a S_c označují přesycení a kritické přesycení.³⁴

Popis mechanismu syntézy kovové nanočástice podle LaMerovy teorie začíná nukleací, při které se v původně jednofázovém prostředí (roztoku) vytvoří nová fáze zárodku. Redukcí kationtů kovu dochází k nárůstu koncentrace kovových atomů, dokud není dosaženo přesyceného stavu. V této fázi začnou atomy aglomerovat a vytvářet jádra přesných rozměrů – zárodky, které dalším připojováním atomů kovu rostou do krystalitu. Průměr zárodků by měl být menší než 1 nm, v závislosti na síle kovových vazeb, velikosti redoxního potenciálu soli kovu a použitém redukovadle.²² K stabilizaci zárodků se používají stabilizační činidla, jejichž úkolem je zabránit aglomeraci a udržovat velikost krystalizačních jader. Proces růstu jader řízený zárodky je jedním z nejúčinnějších a nejefektivnějších procesů díky nízké aktivační energii potřebné pro redukci kovu na předem vytvořených zárodcích, což umožňuje získat nanočástice s kontrolovanou velikostí a tvarem³⁵. Tvorba nanočástic je spojena s kompetitivními ději, kdy dochází ke zvýšení povrchové energie a snížení objemové energie.

Nárůst povrchové energie napomáhá rozpouštění, snížení objemové energie podporuje proces růstu. Díky vysoké rozpustnosti a povrchové energii menších částic v roztoku se tyto znovu rozpouštějí a umožňují tak větším částicím ještě více růst. Tento fenomén byl poprvé popsán v roce 1900 Ostwaldem a označuje se jako Ostwaldovo zrání³⁵ (Obrázek 5).

Digestivní zrání je opakem Ostwaldova zrání, tento proces tvorby je opět řízen povrchovou energií částice v roztoku, kde se větší částice znovu rozpustí a menší částice naopak rostou³⁵. Tohoto jevu je využíváno i při tvorbě bimetalických nanočástic³⁷.



Obrázek 5: Schematické znázornění Ostwaldova zrání při syntéze nanočástic stříbra redukcí ethanolem v amoniakálním prostředí – rozpouštění menších částic doprovázené růstem větších nanočástic.³⁸

Pokračující přidávání atomů umožňuje zárodku rovnoměrně zvětšovat velikost. Proto jsou roztoky vhodného kovového prekursoru, redukčního činidla a stabilizačního činidla základní nutností pro tvorbu kovových nanočástic metodou chemické redukce.

Na tomto místě je však třeba poznamenat, že LaMerova teorie byla odvozena pro systémy mikročástic, a přestože je možné tyto úvahy aplikovat na modely nanočástic, je třeba postupovat opatrně a uvedená tvrzení je třeba posuzovat kriticky, protože povrchová volná energie je v tomto rozsahu velikostí mnohem vyšší. Ve skutečnosti vysoký poměr povrchových atomů k objemovým atomům u malých nanočástic vede k extrémně vysoké hnací síle těchto částic k minimalizaci jejich povrchové energie, která v důsledku toho vede k nekontrolovanému růstu a aglomeraci nanočástic.³⁴

Turkevich, který zkoumal tvorbu částic $\text{Au}(0)_n$ přibližně ve stejné době, kdy LaMer studoval tvorbu solí $(\text{S})_n$ a tvorbu $(\text{BaSO}_4)_m$ precipitací v roce 1951 zjistil, že jeho graf

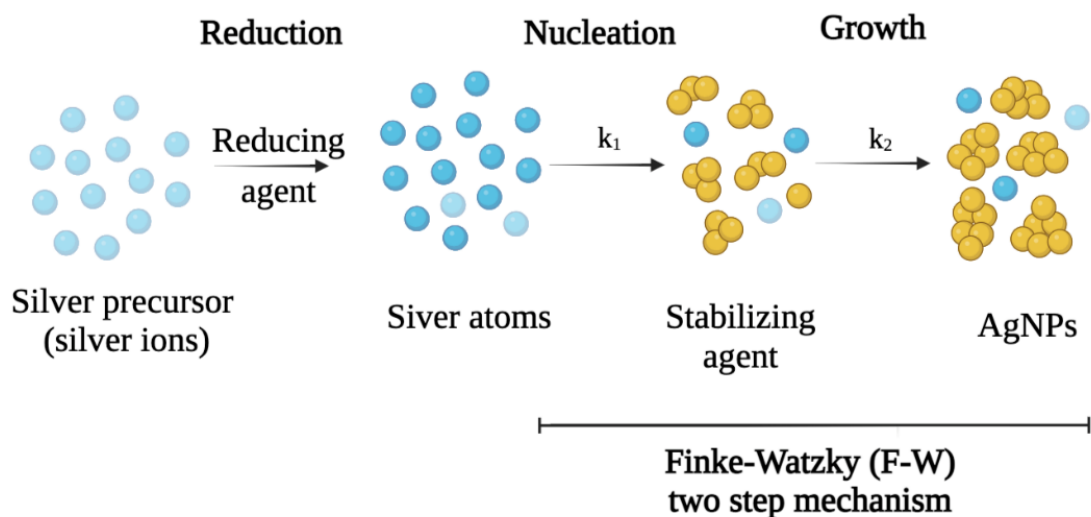
závislosti velikosti částic $\text{Au}(0)_n$ na čase vykazuje exponenciální (sigmoidální) růst, který se následně ustálil²⁷. Je zřejmé, že Turkevich věřil, že LaMerův model z roku 1950 není aplikovatelný na jeho systém tvorby $\text{Au}(0)_n$.³³

Po dalších studiích se Turkevich²⁸ v roce 1953 pokusil vysvětlit nukleaci solí zlata u $\text{Au}(0)_n$ postulováním své vlastní „organizační“ cesty, resp. „organizátoru“ přičemž uvedl, že: „Nukleační agens postupně vytvářejí chemický komplex mezi sebou a ionty zlata, organizující tyto ionty do makromolekuly (prekurzoru jádra). Když je velikost makromolekulárního anorganicko-organického polymeru dostatečně velká, dojde k molekulární přestavbě, která vytvoří kovové jádro a oxidační produkty organizátoru.“²⁸ Turkevich postuloval svůj „organizační mechanismus“ protože s klasickou flukтуаční teorií nukleace a tím i klasickou nukleační teorií nukleace nesouhlasil. Jako základní problém uvedl, že při vytváření nukleačního jádra je nutné nahromadění dostatečně velké lokální koncentrace atomů, jejichž velikost je větší, než právě vyžaduje stabilita částice. Turkevich argumentoval, že taková akumulace je statisticky nerealná, protože jádra jeho zlatého solu mají průměr asi 30 Å, což by zahrnovalo fluktuaci řádu milionu atomů zlata²⁸. Proto Turkevich navrhl svůj „organizační model“ jako realističtější alternativu pro sestavení atomů nebo molekul potřebných pro nukleaci.

V moderních termínech můžeme Turkevichovu kreativní „organizační“ hypotézu rozpoznat jako analogii – a skutečně první případ – současného populárního konceptu „prenukleačních klastrů“³³. Jde o sestavení reakčních prekurzorů do velkých makrostruktur s uspořádáním na dlouhou vzdálenost, které jsou kineticky životaschopnými jádry schopnými snadného růstu. Koncept prenukleačních klastrů je stále více uplatňován nejen pro popis tvorby nanočástic zlata, ale i krystalizace různých systémů vč. heterogenní krystalizace proteinů a je zajímavou alternativní hypotézou, která zasluhuje další pozornost a rozsáhlejší studium za pomoci přímých metod studia jejich kinetiky.

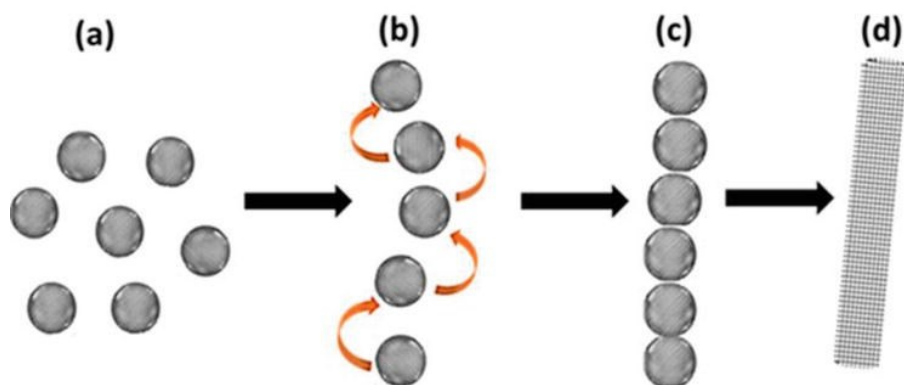
Mechanismy uplatňující se v interpretaci tvorby nanočástic jsou Finke-Watzkyho dvoustupňový mechanismus, koalescence a orientované připojení či vnitročásticový růst.

Finke-Watzkyho dvoustupňový mechanismus je proces nukleace a růstu, kde oba kroky probíhají současně. První je pomalá kontinuální nukleace, druhý krok je autokatalytický povrchový růst, který není řízen difúzí. Ukázalo se, že tento mechanismus se uplatňuje při tvorbě nanočástic Ir, Pt, Ru a Rh.³⁵



Obrázek 6: Tvorba stříbrné nanočástice popsána jednotlivými kroky: redukce stříbrných iontů na stříbrné atomy, nukleace, kde se tvoří nejmenší termodynamicky stabilní shluky a jejich růst za vzniku stříbrných nanočástic – Finke-Watzkyho model.³⁹

Koalescence a orientované připojení jsou velmi podobné. Liší se však orientací krystalové mřížky na hranici zrn. Pro koalescenci neexistuje žádná zvláštní preference pro připojení. Zatímco orientované připojení vede ke spontánní samoorganizaci sousedních nanokrystalů, které sdílejí společnou krystalografickou orientaci.³⁵



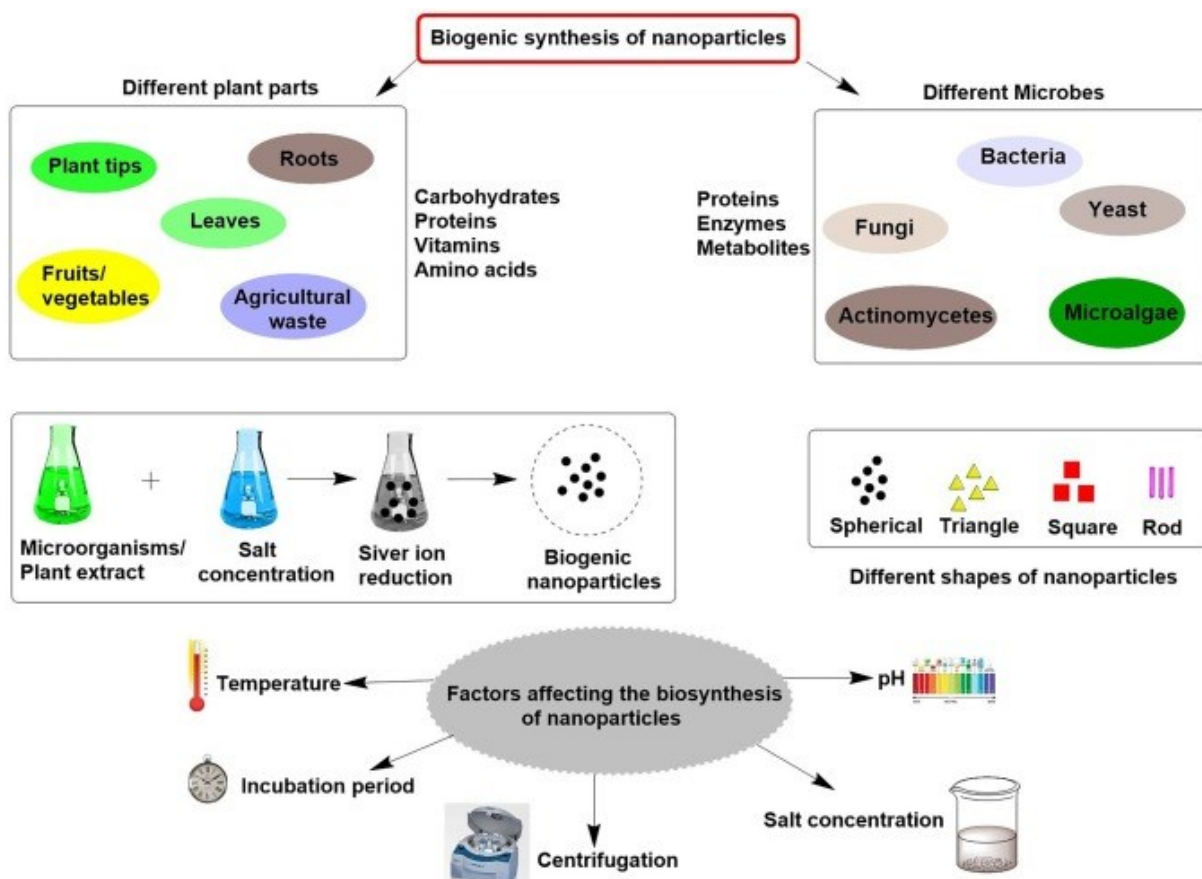
Obrázek 7: Schéma orientovaného připojení – jednotlivé krystality koloidu (a) se vzájemně uspořádávají za účelem správné orientace krystalových faset (b), tak aby mohlo dojít k jejich sloučení (c) za vzniku krystalu (d).⁴⁰

Vnitročásticový růst či intračásticové zrání, je difúze monomerů podél povrchu nanomateriálu vedoucí ke změně tvaru částice v čase. Tento případ nastává za velmi specifických podmínek, kdy energie monomerů v roztoku je nižší než energie krystalových faset nanočástic.

To znamená, že povrchová energie částice je téměř stejná jako energie celého roztoku a v tomto případě by nedocházelo k žádné čisté difúzi (tedy přidávání monomerů na povrch částice). Jedinou nestabilitou v systému je povrchová energie různých faset samotné částice. V tomto případě se vysokoenergetické fasety rozpouštějí a nízkoenergetické rostou, což vede ke zjevné intračásticové difúzi.³⁵

3.3.4 Biologické metody

Biologické či biogenní metody syntézy nanočástic např. z bylinných extraktů a/nebo mikroorganismů se objevily jako alternativní přístupy výše zmíněných metod. Tyto syntetické přístupy mají mnoho výhod. Jde o metody jednoduché, nákladově efektivní, ekologické a snadno škálovatelné pro vysoké výnosy a/nebo produkci^{12,21,29}. Biosyntéza kovových a oxidových nanočástic pomocí biologických činidel, jako jsou bakterie, houby, kvasinky, rostlinné a řasové extrakty, tak získala popularitu v oblasti nanotechnologií. Rostliny a jejich části obsahují četné organické látky. Sacharidy, tuky, bílkoviny, nukleové kyseliny, pigmenty, fenolické látky a sekundární metabolity obsažené v těchto extraktech zastávají při syntéze funkci které redukčního činidla. Metody jsou vhodné pro výrobu nanočástic z kovových solí bez produkce toxických vedlejších produktů (Obrázek 8). Tyto metody jsou ekologicky šetrné, proto se v literatuře označují jako „green synthesis“. Z pohledu produkce požadovaných nanočástic může jít o metody, které mohou být více časově náročné a méně předvídatelné, zvláště pokud jde o velikost a tvar výsledných nanočástic¹⁸. Obecné schéma biosyntézy kovových nanočástic s využitím biologických extraktů (z bakterií, hub, rostlin a jiných) je založeno na redukci příslušné výchozí soli kovu, ke které se získané extrakty přidávají a dochází tak k tvorbě koloidního nanokovu. Velká rozmanitost extraktů má za výsledek, že lze získávat nanočástice specifických vlastností. Látky obsažené v extraktech (fenoly, sacharidy, bílkoviny, enzymy, alkaloidy,...) působí během syntézy jako stabilizační činidla a modifikují i výsledný produkt.¹²

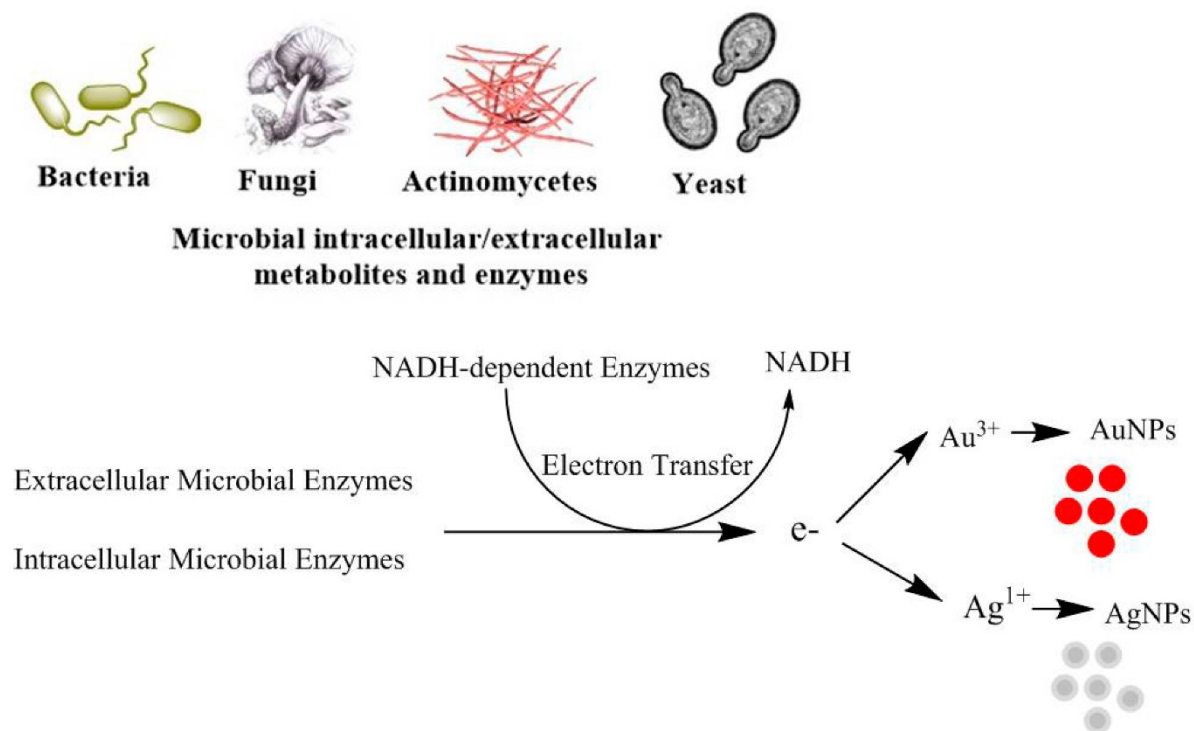


Obrázek 8: Diagram biogenní syntézy kovových nanočástic.⁴¹

Mnoho publikací popisuje syntézu kovových nanočástic stříbra a zlata pomocí různých organismů (bakterie, řasy, houby, rostliny), ale zcela přesný mechanismus biogenního procesu syntézy nanočástice není znám.^{5,12,18,42} Mikroorganismy jako bakterie a houby mohou redukovat kovové ionty na nanočástice prostřednictvím svých metabolických procesů. Biomolekuly, jako jsou enzymy, bílkoviny a biosurfaktanty přítomné v mikroorganismech mají úlohu redukovadla. Syntéza kovových nanočástic s využitím mikroorganismů může probíhat extra- i intracelulárně. Extracelulární syntéza kovových nanočástic zahrnuje zachycení kovových iontů na vnějším povrchu buněk a jejich redukci za přítomnosti enzymů nebo biomolekul, zatímco intracelulární syntéza probíhá uvnitř buněk. Přítomné biosurfaktanty slouží i jako stabilizační činidla kovových nanočástic.

Studie naznačují, že hlavní roli v syntéze nanočástic kovů hrají koenzymy oxidoreduktáz jako je nikotinamidadenin dinukleotid (NADH) a redukováná forma nikotinamidadenin dinukleotidfosfátu (NADPH) resp. na NADPH závislé enzymy, které

fungují jako přenašeče elektronů a umožňují redukci příslušných solí za vzniku kovů a tím i tvorbu nanočástic (Obrázek 9).⁴³



Obrázek 9: Úloha NADH a na NADH dependentních enzymů
v syntéze kovových nanočástic Ag a Au.⁴³

Extracelulární syntéza nanočástic je metoda levná, umožňující velkovýrobu a jednodušší je i následné izolování a zpracování nanočástic. Extracelulární metody syntézy nanočástic jsou proto preferovány ve srovnání s intracelulárními.⁵

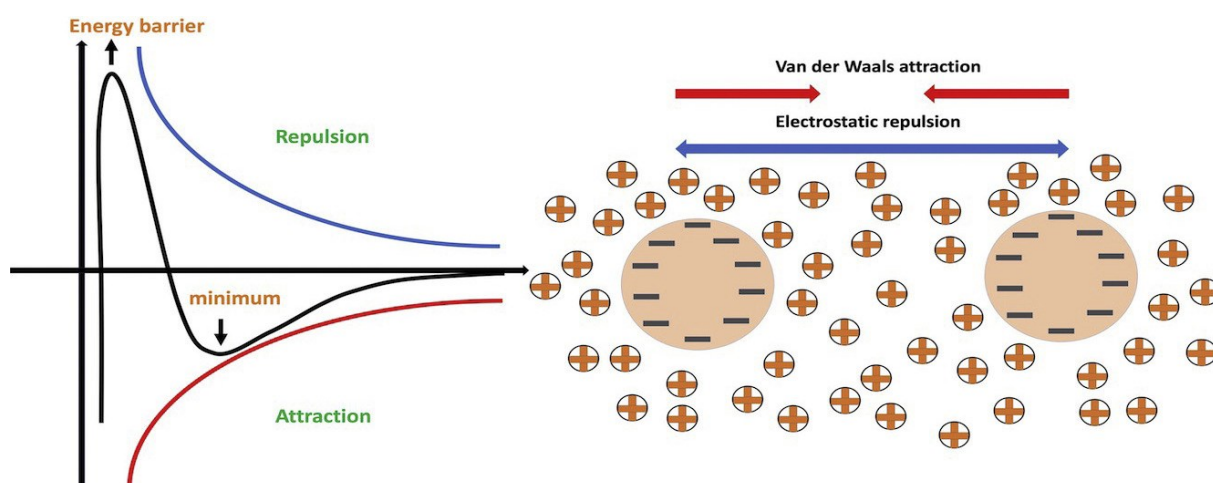
3.4 Vlastnosti koloidů kovových nanočástic

Jedním z nejdůležitějších aspektů v oblasti kovových koloidů je mechanismus stabilizace kovových nanočástic (NP) v disperzním médiu. Nanočástice jsou obecně nestabilní a mají tendenci aglomerovat, protože na krátké vzdálenosti mezi částicemi působí van der Waalsovy, elektrostatické, magnetické a další síly (Tabulka 1). Bez přítomnosti odpuzivých sil se nanočástice agregují, aglomerují nebo podléhají koalescenčním procesům

(Obrázek 10). Příkladně lze těchto odpuzivých sil dosáhnout elektrostatickou nebo sterickou stabilizací.³⁶

Tabulka 1: *Síly ovlivňující stabilitu nanočástic v roztoku.*⁴⁴

Síla	Vliv
Van der Waalsovy interakce	Elektromagnetická síla mezi NP krátkého dosahu, přitažlivá povaha interakce.
Elektrická dvojvrstva	Elektrická interakce mezi NP překryvem elektrické dvojvrstvy, obvykle odpuzivá.
Hydratační síly	Interakce mezi molekulami vody na hydrofilních NP, odpuzivá povaha.
Hydrofobní síly	Přitažlivá interakce mezi hydrofobními NP ve vodě.
Sterické, elektronické a elektrostatické síly	Adsorpce anorganických iontů, surfaktanty, polymery a polyelektrolyty na povrchu NP. Polymery mohou tvořit osmoticky působící můstky a vést k interpenetraci řetězců. Povrchové vrstvy mohou mít přitažlivé nebo odpuzivé účinky.



Obrázek 10: *Schématické znázornění působení Van der Waalsových přitažlivých sil a elektrostatických odpuzivých sil na koloidní částice a jejich vyjádření pomocí průběhu interakčního potenciálu v závislosti na mezičásticové vzdálenosti.*⁴⁴

Částice disperzní fáze, které nesou elektrický náboj, se vlivem indukovaného elektrického pole pohybují vůči disperznímu prostředí. Tento jev je obecně znám jako elektrokinetické jevy. Elektrokinetické jevy lze rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinu tvoří mechanický pohyb způsobený působením vnějšího elektrického pole, což zahrnuje elektroforézu a elektroosmózu.⁴⁵ Druhou skupinu tvoří jevy, kdy mechanický pohyb vyvolává vznik elektrického pole, jako je sedimentační potenciál (tzv. Dornův potenciál – je inverzní k elektroforéze) a potenciál proudění. Tyto jevy jsou způsobeny existencí

elektrického náboje na fázovém rozhraní mezi částicemi disperzní fáze a disperzním prostředím a uspořádáním náboje v blízkosti tohoto rozhraní.⁴⁶

Mezifázové interakce jsou způsobeny jak interakcemi mezi jádry, tak interakcemi mezi ligandy a mezi ligandy a rozpouštědlem. Jejich rozsah tedy závisí na chemických a fyzikálních vlastnostech jak nanočástic (jádra a povrchových ligandů), tak média, ve kterém se nanočástice nacházejí. Kombinace těchto faktorů přispívá k celkové stabilitě nanočástic resp. k jejich schopnosti se agregovat^{36,47,48}.

Zájem o řízení sestavování nanočástic do specifických rozšířených struktur výrazně podpořil vývoj strategií, které umožňují kontrolu a manipulaci interakcí mezi nimi pomocí široké škály vnějších podnětů. Schopnost reverzibilní agregace nanočástic v roztoku závisí na termodynamických a kinetických parametrech. Z hlediska termodynamiky jsou vzájemné interakce nanočástic řízeny celkovým párovým potenciálem, který je celkovou sumou přitažlivých a odpudivých mezifázových sil⁴⁸. Když mezi částicemi převládají odpudivé interakce, jsou nanočástice v roztoku stabilní, zatímco při převaze přitažlivých sil jsou nestabilní a agregují či se mohou vyskytnout v pásmu vratné agregace (Obrázek 11). Znalost těchto fenoménů nabízí pochopení vzájemných interakcí nanočástic a umožnit jejich kontrolovanou syntézu.^{36,48}

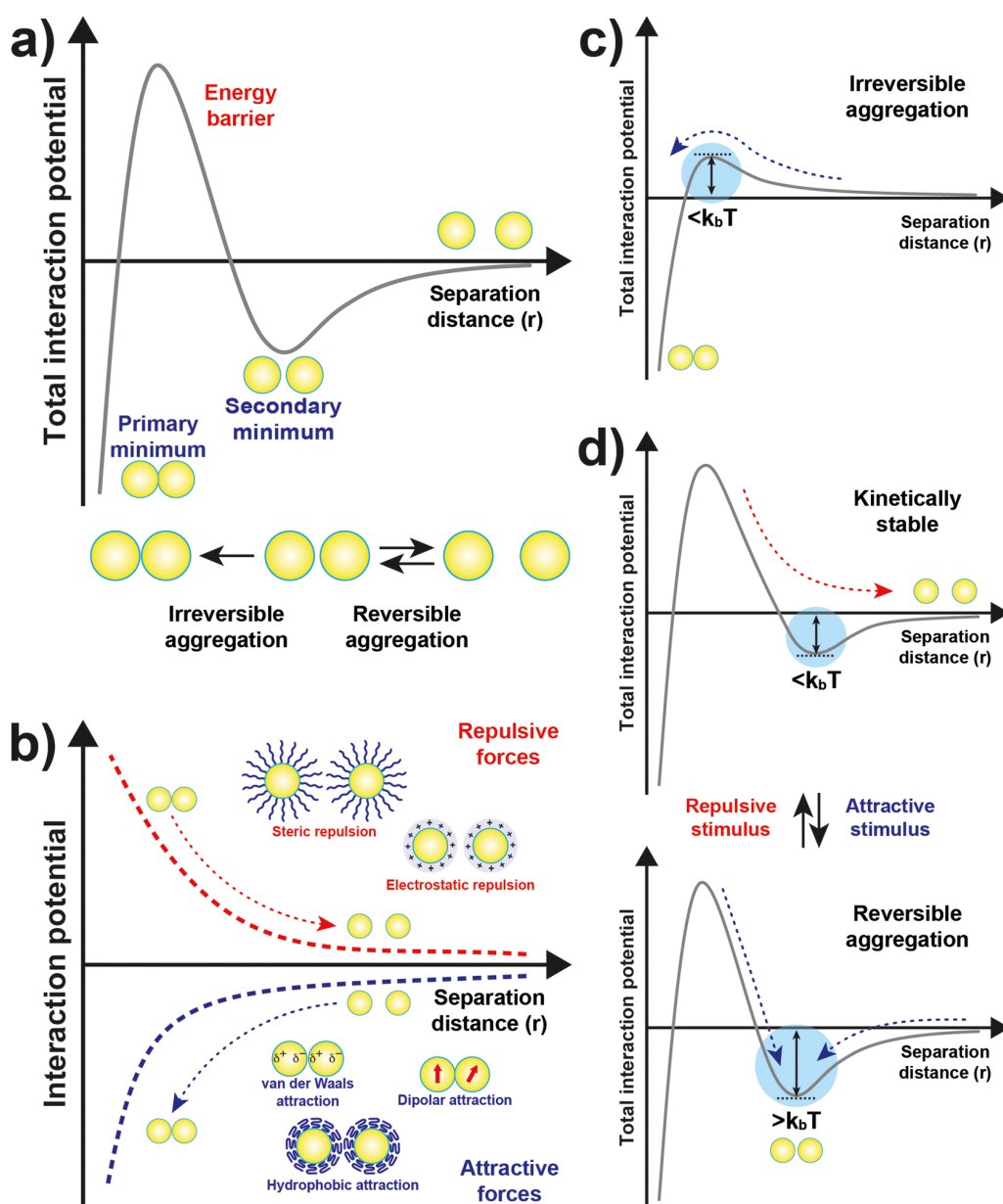
3.4.1 Elektrická dvojvrstva a stabilita koloidních systémů kovových nanočástic

Stabilita disperzních soustav je schopnost disperzí bránit se dějům, které vedou ke změně struktury, stupně disperzity nebo změně velikosti. Koloidní soustava kovových nanočástic má díky velkému povrchu částic disperzní fáze přebytek povrchové energie, zejména pokud jsou interakce mezi molekulami disperzní fáze a disperzního prostředí slabé (lyofobní koloidy). Z hlediska stability se tak koloidní soustavy nacházejí v metastabilním stavu (jde o stav se zvýšenou povrchovou energií), což je dáno zmíněnou existencí fázového rozhraní. Mohou se však dostat do stavu s nižší povrchovou energií, ale k tomu je potřeba překonat určitou energetickou bariéru.

Tato energie je aktivační energií potřebnou ke spojování částic. U koloidních disperzí pak dochází k agregaci, při čemž dochází ke snížení energie systému shlukováním dispergovaných částic do energeticky výhodnějších celků.

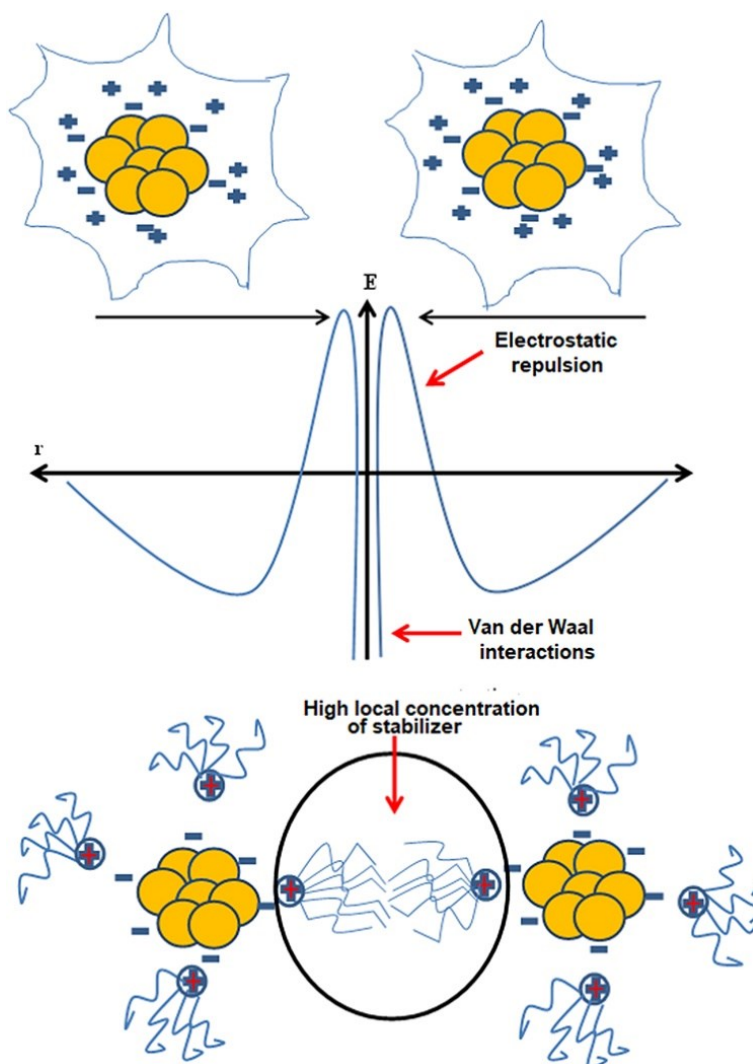
Agregační nestabilita je typická pro velmi malé částice, čím menší částice jsou a čím větší je jejich koncentrace, tím větší tendenci má systém agregovat.⁴⁵

Aby byla koloidní soustava stabilní, musíme tedy vytvořit dostatečnou energetickou bariéru, která zabrání spojování částic a tím i poklesu povrchové energie.



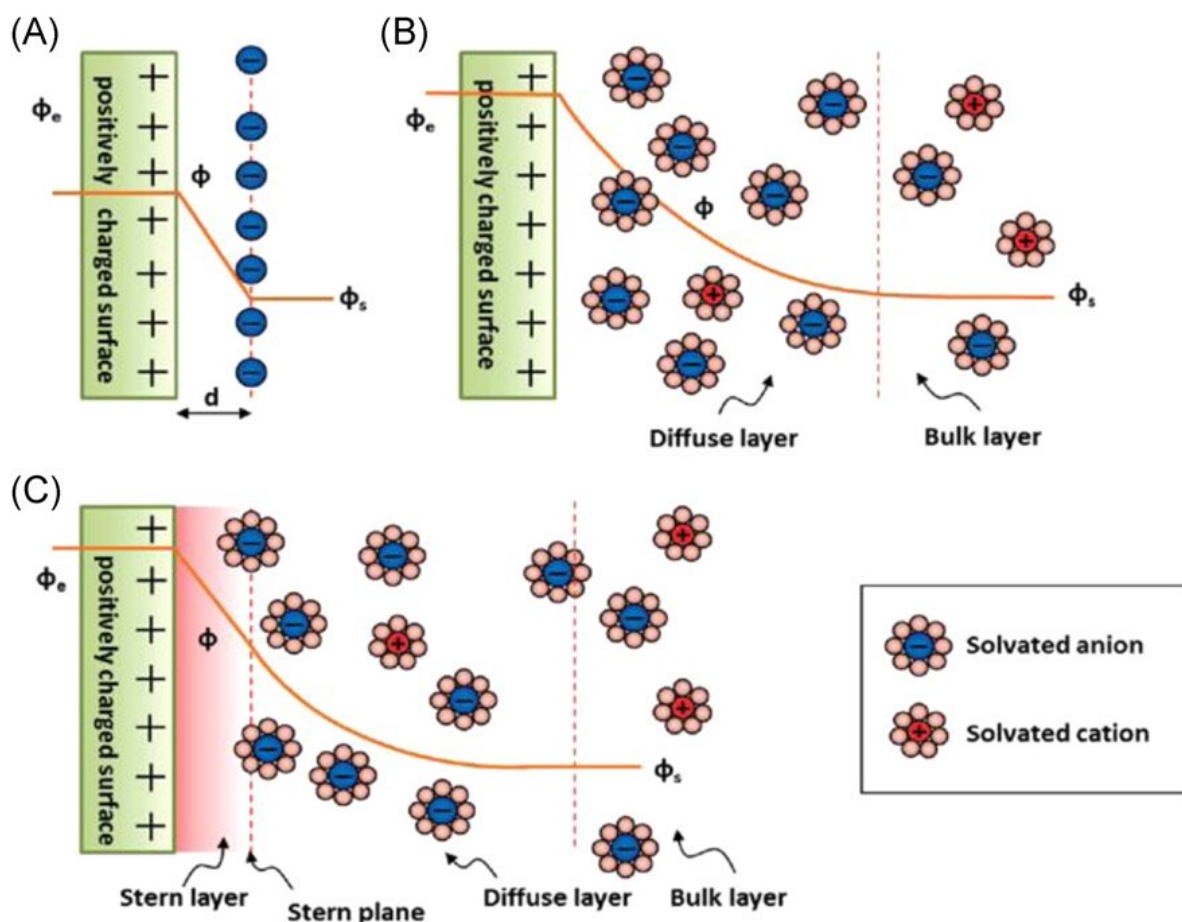
Obrázek 11: Schématické znázornění: (a) celkového interakčního potenciálu mezi částicemi, ukazujícího primární a sekundární minimum a energetickou bariéru; (b) přitažlivých a odpudivých sil a jejich příspěvku k interakčnímu potenciálu; (c) nevratné agregace v primárním minimu; a (d) vratné agregace v sekundárním minimu. Hloubka sekundárního minima je kvalitativně zvýrazněna světle modrým kruhem vzhledem k tepelné energii (vyjádřené jako $k_b T$, kde k_b je Boltzmannova konstanta a T je teplota).⁴⁸

Stabilizace nanočástic kovů se nejčastěji provádí metodami založenými na elektrostatické repulzi, či na stérickém efektu (Obrázek 12).



Obrázek 12: Příklad spojení elektrostatické a sterické stabilizace. Zlaté nanočástice obklopují iontové povrchově aktivní molekuly s polárními konci a prodlouženými postranními řetězci. Oblast s vysokou lokální koncentrací stabilizátoru brání aglomeraci nanočástic.⁴⁹

Nabité molekuly přítomné na povrchu nanočástic přispívají k tvorbě elektrostatického náboje nanočástic, který se vytváří při styku nabitého povrchu tuhé látky s roztokem elektrolytu. Nabité povrch tuhé látky tvoří tzv. vnitřní vrstvu, k níž jsou elektrostatickými a adsorpčními silami přitahovány ionty převážně opačného znaménka, jejichž náboj neutralizuje náboj povrchu – tzv. vnější vrstva. Toto uspořádání lze popsat různými modely elektrické dvojvrstvy (např. *Helmholtzův*, *Gouyův-Chapmanův*, *Sternův*) (Obrázek 13).^{36,45}

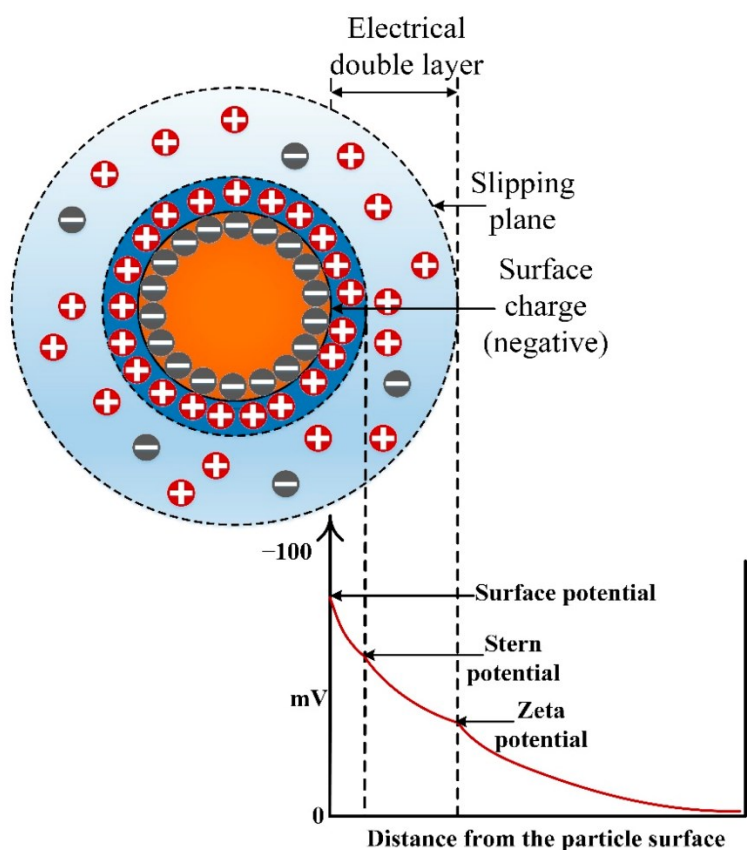


Obrázek 13: (A) *Helmholtzův*, (B) *Gouy–Chapmanův* a (C) *Sternův model elektrické dvojvrstvy vytvořené na kladně nabitě elektrodě ve vodném elektrolytu.*⁵⁰

3.4.2 Potenciál ζ

Pro koloidní nanočástice kovů se nejvíce uplatňuje Sternův model. Právě elektrostatické odpuzování mezi částicemi je klíčovým faktorem ovlivňujícím stabilitu koloidních roztoků. V roztoku elektrolytu může docházet vlivem interakce volných iontů s povrchovým nábojem částice ke stínění elektrostatického potenciálu nanočástice a ve svém výsledku vést k nežádoucí agregaci nanočástic. Rozdíl elektrického potenciálu mezi stacionární vrstvou náboje obklopující částici a potenciálem roztoku se označuje jako potenciál ζ (*zeta*).

Vrstva kapaliny těsně obklopující částici se rozděluje na dvě části; vnitřní oblast, nazývaná Sternova vrstva, kde jsou ionty silně vázané, a vnější, difúzní oblast, kde jsou ionty méně pevně připojené (Obrázek 14). Uvnitř difúzní vrstvy existuje teoretická hranice, uvnitř které ionty a částice tvoří stabilní jednotku.

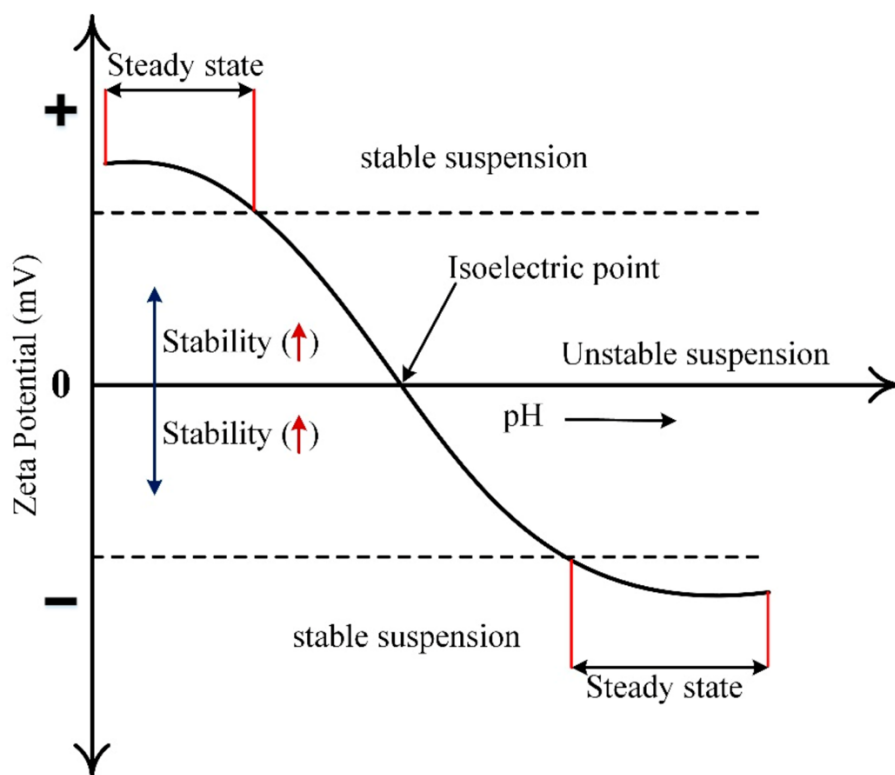


Obrázek 14: Potenciál ζ na povrchu částice – Sternův model. Vnější vrstva elektrické dvojvrstvy se skládá z těsně přiléhající plošné – Sternovy vrstvy, která je tvořena ionty vázanými k vnitřní vrstvě převážně adsorpčními silami (mají oproti elektrostatickým silám krátký dosah) o plošné hustotě náboje menší nežli je plošný náboj vnitřní vrstvy, a z difúzní vrstvy, tvořené ionty vázanými elektrostatickými silami, které neutralizují zbytek náboje vnitřní vrstvy. Potenciál dvojvrstvy klesá nejprve prudce na hodnotu potenciálu Sternovy vrstvy a pak pozvolna k nule.⁵¹

Když se částice pohybuje (např. kvůli gravitaci), ionty uvnitř hranice se pohybují s ní, ale všechny ionty za hranicí s částicí neputují. Tato hranice se nazývá povrch hydrodynamického smyku, nebo rovina skluzu. Potenciál, který existuje na této hranici, je známý jako potenciál ζ .

Velikost potenciálu ζ naznačuje potenciální stabilitu koloidního systému nanočástic. Jestliže všechny částice v suspenzi mají velký záporný nebo kladný potenciál ζ , pak budou inklinovat k odpuzování se navzájem, a neexistuje tendence k tomu, aby se agregovaly. Jestliže však částice mají nízké hodnoty ζ potenciálu, pak neexistuje žádná odpudivá síla zabráňující shlukování nanočástic.

ζ potenciál částic v roztoku ovlivňuje iontová síla rozpouštědla, přítomnost nabitých nebo nenabitých molekul, které se mohou adsorbovat na povrch částic a pH roztoku (Obrázek 15). Zejména při práci s částicemi, které mají (de)protonovatelné skupiny na jejich povrchu je významná hodnota pH v bodě nulového náboje pH(pzc).



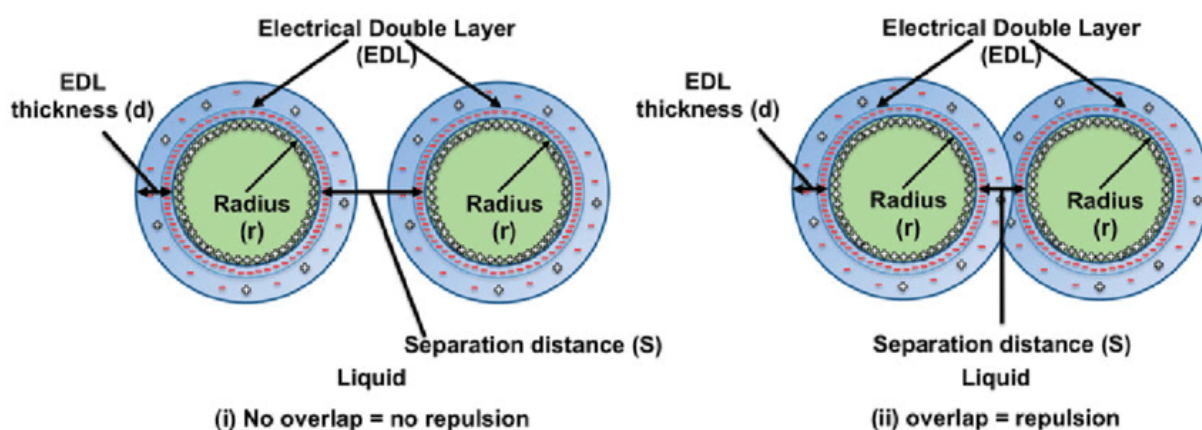
Obrázek 15: Schématické znázornění průběhu křivky potenciálu ζ v závislosti na pH koloidního roztoku nanočástic, znázorňující izoelektrický bod, který určuje míru stability koloidu pH(pzc) – pH v bodě nulového náboje.⁵¹

V izoelektrickém bodě, kdy má ζ potenciál nulovou hodnotu, je mezičásticová přitažlivost maximální. Tyto nanočástice pak mají tendenci k tvorbě agregátů. Proto je třeba nastavit hodnotu pH koloidu mimo pH(pzc) - isoelektrický bod tak, aby hustota elektrického náboje, resp. povrchový potenciál nanočástic (který se odráží v potenciálu ζ) vedl k dosažení vzájemné mezičásticové repulze.

Hodnota pH může být upravena pomocí pufrů, jejich kompatibilitu s koloidní suspenzí je ale třeba předem otestovat. Povrchový náboj nanočástic hraje významnou roli při interakcích s biologickými tekutinami a vzorky. Např. vznik proteinové koróny na povrchu nanočástic se promítá do celkového povrchového náboje nanočástic. Znalost těchto efektů je důležitá např. při formulaci nanoléciv.

3.4.3 Elektrostatické interakce a elektrostatická stabilizace kovových nanočástic

Atraktivní van der Waalsovy interakce souvisejí s existencí fluktuace elektrického náboje a mohou podporovat reverzibilní aglomeraci nebo dokonce nevratnou agregaci suspendovaných částic. Tyto přitažlivé síly klesají s šestou mocninou vzdálenosti částic. Příčinou odpuzivých sil jsou tzv. Bornovy repulze, které klesají s dvanáctou mocninou vzdálenosti částic.⁴⁵



Obrázek 16: Stabilizace pomocí elektrické dvojvrstvy – při překrytí elektrických dvojvrstev stejně nabitých částic dochází k jejich oddálení vlivem odpuzivých elektrostatických sil.⁵²

Z toho je patrné, že odpuzivé síly mají kratší dosah než přitažlivé síly, proto je pro dosažení potřebné energetické bariéry nutné dodatečně zvýšit odpuzivé síly. Příprava stabilních nanočástic proto vyžaduje síly, které budou působit proti van der Waalově přitažlivosti. U kovových nanočástic je to často zajištěno povrchovým nábojem částic, což vede k odpuzivým mezifázovým silám. Odpuzivé interakce, které zabezpečují dostatečnou energetickou bariéru, jsou nejčastěji dány elektrickým nábojem na povrchu částice. Elektrostatické odpuzování dvou elektricky nabitých částic lze pospat Coulombovým zákonem (1) z něhož je patrné, že odpuzivá síla dvou částic klesá s druhou mocninou jejich vzdálenosti.

$$(1) \quad F_e = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{|Q_1| \cdot |Q_2|}{r^2}$$

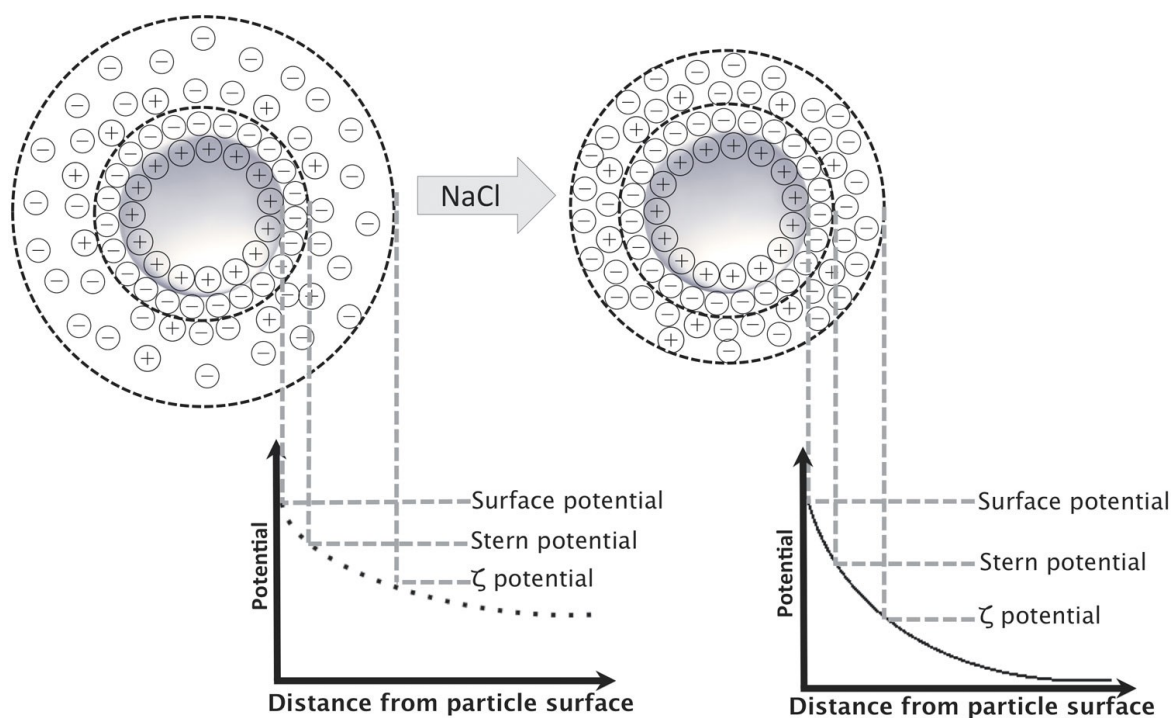
Jelikož je pokles těchto odpuzivých sil s rostoucí vzdáleností částic menší, než u van der Waalsových přitažlivých sil, jsou tyto elektrostatické interakce obvykle dostatečně velké, aby zabránily agregaci částic.⁴⁵

Mnoho z tradičních způsobů přípravy nanočástic ve vodném prostředí využívá elektrostatické stabilizace, a to vytvořením elektrické dvojvrstvy okolo nanočástice tvořené záporně nabitými částicemi, jako jsou halogenidy, karboxyláty nebo polyoxoanionty rozpuštěné v roztoku.

3.4.4 DLVO teorie – koagulace koloidních částic

Před více než 70 lety vyvinuli dva ruští (Derjaguin a Landau) a dva holanďští (Verwey a Overbeek) vědci teorii koloidní stability, která je dodnes považována za jeden z průlomových modelů charakterizace ve fyzice a chemii koloidů – DLVO teorii.

DLVO teorie fyzikálně popisuje koagulaci koloidních částic působením elektrolytů, přičemž zohledňuje přitažlivé mezimolekulové interakce a odpuzivé elektrostatické síly povrchově nabitých koloidních částic (Obrázek 11).



Obrázek 17: Stlačení elektrické dvojvrstvy přidavkem elektrolytu
– vzrůst iontové síly.⁵³

Podle této teorie přidavek elektrolytu do elektrostaticky stabilizované koloidní soustavy způsobuje stlačení elektrické dvojvrstvy a snížení ζ potenciálu (Obrázek 17). To umožňuje částicím se více přiblížit a následně spojit.

Elektrická dvojvrstva představuje energetickou bariéru, kterou je nutné překonat pro destabilizaci koloidních částic. K agregaci dojde pouze tehdy, je-li koncentrace přidaného elektrolytu dostatečná, tedy pokud je překročen tzv. koagulační práh.^{36,45,51}

Dle DLVO teorie jsou popisovány dva druhy koagulace. Neutralizační koagulace je dána adsorpčními jevy. Množství naadsorbovaných iontů na povrchu koloidní částice určuje velikost povrchového náboje, adsorpce protiiontů vede ke snížení elektrického potenciálu a má za následek snížení velikosti odpuzivých sil. Částice se pak mohou spojovat a následně koagulovat. Pomocí Derjaginovy teorie neutralizační koagulace lze spočítat kritickou hodnotu elektrického potenciálu při kterém zmizí energetická bariéra. Ke koncentrační koagulaci dochází zmíněným stlačením elektrické dvojvrstvy přidavkem elektrolytu, kdy dochází k poklesu potenciálu ζ koloidních částic. K tomu je třeba dosáhnout koagulačního prahu.⁴⁵

Koloidní suspenze stabilizované elektrostatickou repulzí jsou velmi citlivé na jakékoliv vnější vlivy, které by mohly porušit elektrostatickou dvojvrstvu. K destabilizaci může dojít změnou iontové síly roztoku nebo jeho teploty, proto je nutné tyto parametry sledovat.

3.4.5 Stérická stabilizace kovových nanočástic

Stérická stabilizace funguje na jiném principu a vyžaduje látky, které se silně adsorbují na povrch koloidních částic a jsou rozpustné v daném disperzním prostředí. Nejvhodnějšími látkami jsou makromolekuly, surfaktanty a tenzidy. Tyto látky mohou být na povrch nanočástic adsorbovány vratně nebo nevratně. V případě reverzibilní adsorpce se kolem koloidní částice vytvoří souvislá a silná vrstva bez chemické vazby, zatímco při ireverzibilní adsorpci je koncová skupina makromolekuly zakotvena na povrchu koloidní částice. Povrchově aktivní látky mohou působit v případě iontových povrchově aktivních látek zvýšením nábojové bariéry a také zvýšením sterické bariéry (iontové i neiontové povrchově aktivní látky).^{45,52}

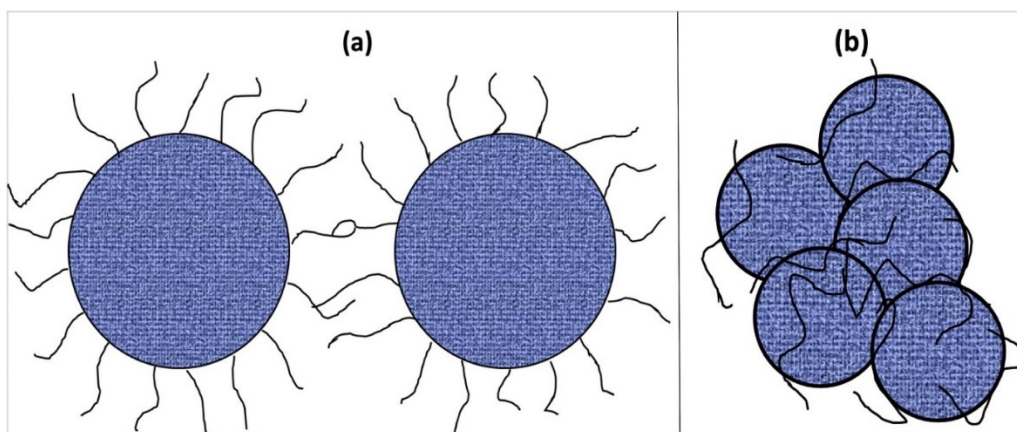
Silné vazby mezi nanomateriálem a polymerem jsou dosaženy chemisorpčními procesy, kde jsou velké amfifilní neiontové adsorpční molekuly donory elektronů nanomateriálům s elektrodeficitním povrchem (např. kovy s volnými valenčními orbitály).

Amfifilní neiontové polymery používané jako sterické stabilizátory se vyznačují kotevním segmentem, který silně interaguje s nanostrukturami, a solvatačním segmentem, který se rozprostírá do disperzního média. Často jde o amfifilní molekuly opatřené na koncích polární a nepolární funkční skupinou. Polární konec směřuje k nanočástici, zatímco nepolární část do roztoku.^{47,52,54}

Když jsou stabilizační polymery zavedeny do koloidní suspenze, adsorbují se na povrch nanočástic prostřednictvím kotevního segmentu a při vzájemném přiblížení dvou nanočástic interagují solvatační části polymeru s molekulami disperzního média a dochází ke sterickému bránění. Disperzní prostředí hraje klíčovou roli, pokud rozpouštědlo umožní vzájemnou interakci a průnik vrstev polymerních molekul, může dojít vlivem stlačení adsorpčních polymerních vrstev ke shlukování nanočástic (Obrázek 18).⁵²

Sterická stabilizace koloidních suspenzí je založena na dvou klíčových parametrech – dobrá solvatace solvatačního segmentu (ocasu) polymeru a dostatečná délka a hustota solvatačního ocasu. Tím je pak zachována sterická bariéra minimalizující Van der Waalsovy přitažlivé síly.

Sterická stabilizace má oproti elektrostatické stabilizaci mnoho výhod – odolnost vůči změnám teplot, stabilitu při změně složení disperzního prostředí způsobené přidávkou elektrolytu a umožňuje použití ve vodném i organickém prostředí.⁵²



Obrázek 18: *Sterická stabilizace polymerními řetězci (a) a přemostění polymerních řetězců vedoucí k agregaci nanočástic (b).*⁴⁴

Nejběžnější techniky k prevenci těchto nežádoucích vlastností využívají molekuly povrchově aktivních látek ke stabilizaci i těch nejmenších nanočástic v roztoku. Tyto

molekuly se obvykle skládají z dlouhého hydrofobního uhlovodíkového řetězce s funkční koncovou skupinou, která se silně váže na povrch nanomateriálu.⁵² Typické funkční koncové skupiny zahrnují fosfiny, aminy, thiole a karboxyláty a v důsledku toho se kolem každé částice vytvoří hydrofobní obal, který poskytuje nejen ochranu proti oxidaci, ale také dlouhodobou stabilitu v nepolárních rozpouštědlech.³⁴

Molekulová hmotnost povrchově aktivních látek je důležitým parametrem, který je třeba brát v úvahu. Povrchově aktivní látky s relativně nízkou molekulovou hmotností mohou způsobovat reverzibilní adsorpci na povrchy nanomateriálů, omezující v čase jejich stabilitu. K překonání problémů plynoucích z potenciální desorpce povrchově aktivních látek z nanočástice se s výhodou používají blokové kopolymery, což jsou organické molekuly podobné povrchově aktivním činidlům sestávající z opakujících se menších monomerních jednotek. Opakující se monomerní úseky se mohou adsorbovat na povrchy nanomateriálů na více místech podél polymerního řetězce, což vede k nevratné adsorpci. Z neiontových blokových kopolymerů používaných při sterické stabilizaci se nejčastěji používají polyethylenoxid (PEO), polyethylenglykol (PEG), polymethakrylová kyselina (PMAA) a polyvinylpyrrolidon (PVP).^{47,52}

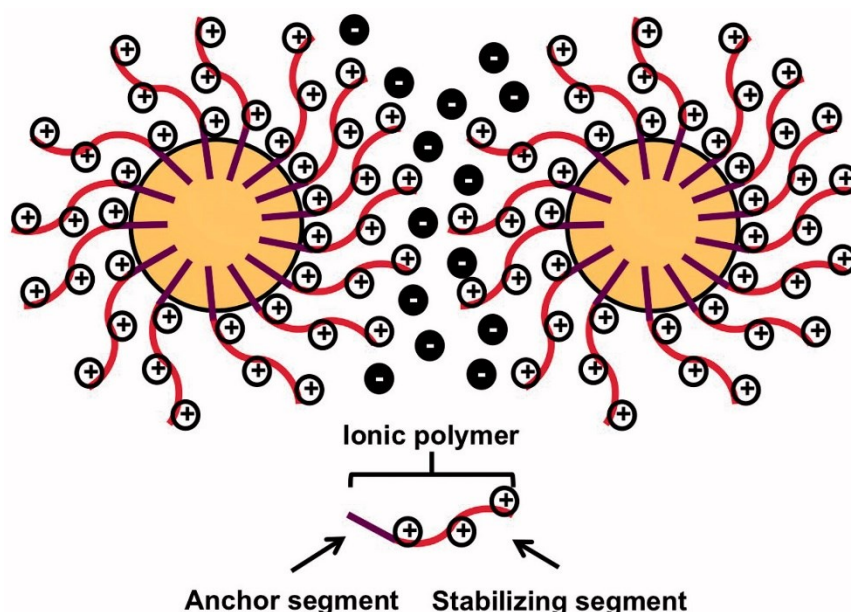
3.4.6 Elektrostérická stabilizace kovových nanočástic

Výsledkem kombinace elektrostatických a sterických stabilizačních mechanismů je elektrostérická stabilizace. V tomto případě brání aglomeraci a agregaci nanočástic v koloidní suspenzi jak elektrostatické, tak sterické odpuzování. Při elektrosterické stabilizaci je iontový polymer adsorbován na nabitý povrch nanomateriálu, což vede k vytvoření jak polymerní vrstvy (sterické odpuzování), tak elektrického potenciálu v blízkosti povrchu nanostruktur (elektrostatické odpuzování) (Obrázek 19).

Nejllepšími elektrosterickými stabilizátory jsou velké a vysoce nabité polymery (polyelektrolyty), které obsahují alespoň jeden typ ionizovatelné skupiny, jako jsou skupiny karboxylové nebo sulfonové kyseliny ($-\text{COO}^-$, $-\text{HSO}_3^-$), a mohou mít různou molekulární architekturu (např. homopolymery, kyselina polyakrylová a blokové kopolymery).⁵²

Polyelektrolyty se vyznačují velkou adsorpční afinitou k nanočásticím, která závisí na chemicko-fyzikálních vlastnostech jak povrchů nanomateriálů, tak i disperzního média. Podobně jako u elektrostatické stabilizace se upřednostňuje silná adsorpce. Stejně jako u

sterické stabilizace, tak i u elektrosterické stabilizace závisí její efekt na množství adsorbovaných molekul polymeru.



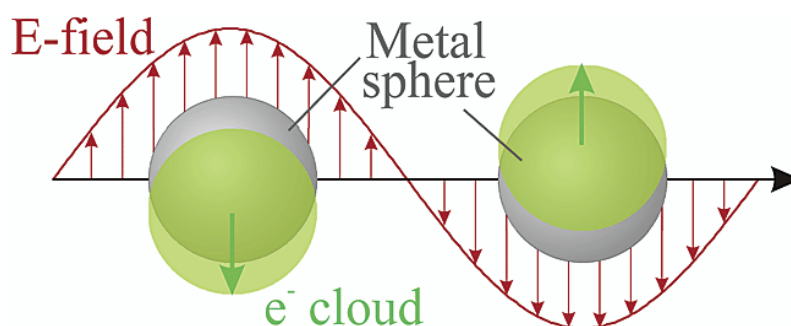
Obrázek 19: Schematické znázornění elektrosterické stabilizace pomocí iontového polymeru.⁵²

Nejběžnějšími polyelektrolyty používanými pro elektrosterickou stabilizaci nanomateriálů v suspenzi jsou kyselina polystyrensulfoňová (PSS), kyselina polyvinylsulfoňová (PVSA), kyselina polyakryloňová (PAA) a kyselina poly(1-vinylpyrrolidon-ko-akryloňová) (PVcA), sloužící jako aniontové blokové kopolymery a polyethylenimin (PEI) jako kationtový polyelektrolyt.^{34,52}

Podobně se iontové povrchově aktivní látky obecně dělí na aniontové povrchově aktivní látky, které se vyznačují záporně nabitou hlavní skupinou (tj. SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , COO^-) a kationtové povrchově aktivní látky, ve kterých jsou hlavní skupiny nabitě kladně (tj. NR_4^+). Oktylsulfát sodný (SOS), dodecylsulfát sodný (SDS) a bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát sodný (AOT) se běžně používají jako aniontové povrchově aktivní látky jako elektrosterické stabilizátory. Oktyltrimethylamoniumbromid (OTABr), dodecyltrimethylamoniumbromid (DTABr), cetyltrimethylamoniumbromid nebo chlorid (CTABr nebo CTAC) a cetyltrimethylpyridiniumchlorid (CPyC) jsou nejpoužívanějšími kationtovými povrchově aktivními látkami pro stabilizaci nanomateriálů.^{34,52}

3.4.7 Optické vlastnosti kovových koloidů

Hlavní odlišnost kovových nanočástic od jejich makrofáze představuje existence tzv. povrchového plasmonu, způsobující, že koloidy těchto nanočástic jsou charakteristicky zabarveny (Au – fialové, Ag – žluté, Cu – hnědé). Interakcí kovových nanočástic s dopadajícím světlem dochází k dominantní kolektivní oscilaci volných elektronů, známé jako plasmon, která generuje povrchovou plasmonovou rezonanci.



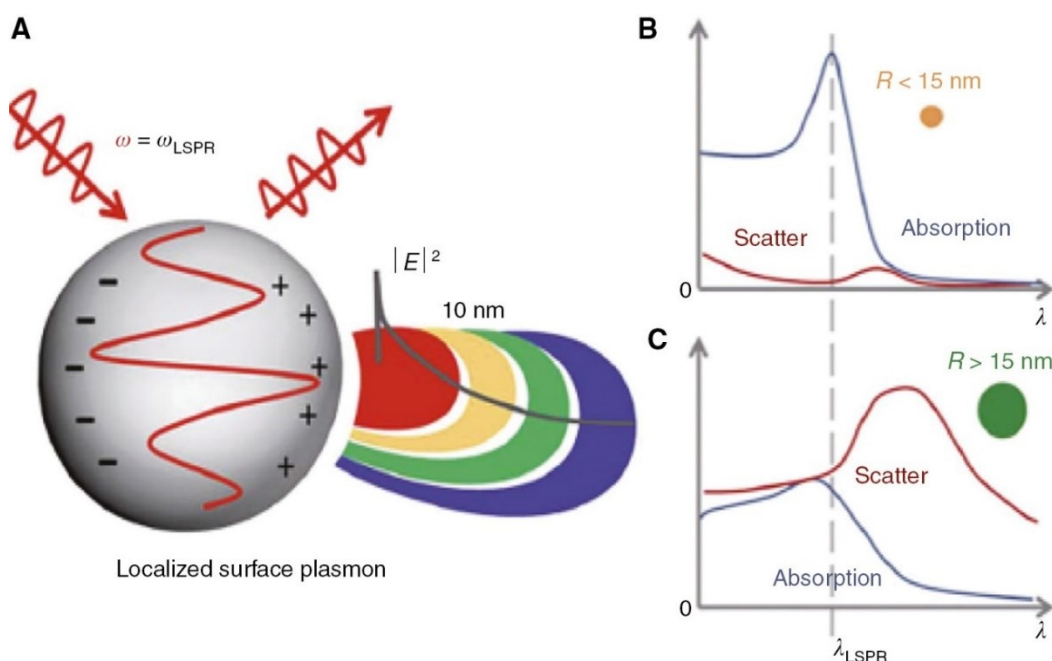
Obrázek 20: Schéma kolektivní oscilace plasmonu (elektronový mrak) pro kulovou částici, znázorňující posun vodivého elektronového náboje vzhledem k jádrům.⁵⁵

Dopadem světla na malou kulovitou kovovou nanočástici způsobí oscilující elektrické pole koherentní oscilaci vodivostních elektronů. Posunutí elektronového mraku vůči jádrům vytváří vratnou sílu díky Coulombově přitažlivosti mezi elektrony a jádry, což vede k oscilaci elektronového mraku vůči jaderné struktuře (Obrázek 20). Frekvence těchto oscilací je určena čtyřmi faktory: hustotou elektronů, efektivní hmotností elektronů, tvarem a velikostí rozložení náboje.⁵⁵ Velké množství těchto elektronů, účastnících se povrchové plasmonové rezonance, způsobuje silnou absorpci a rozptyl (Obrázek 21).

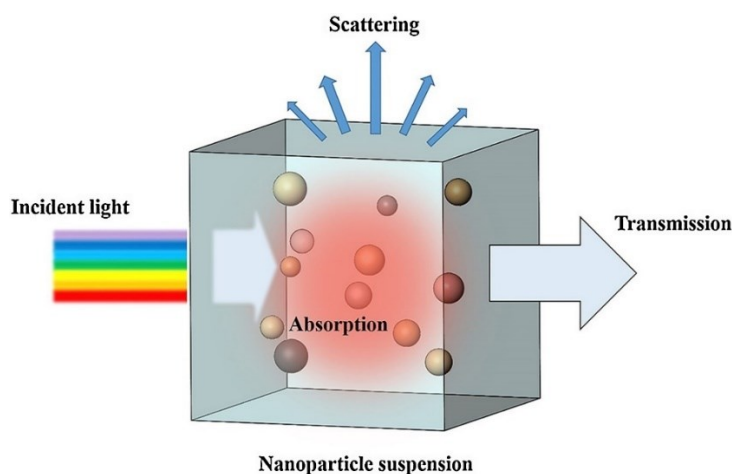
Fenomény lokalizované povrchové plasmonové rezonance (LSPR) u ušlechtilých kovových nanočástic jsou dobře známé. Díky jejich rezonanční frekvenci v oblasti viditelného a blízkého infračerveného záření jsou intenzivně studovány pro využití v biomedicínských, energetických a informačních technologiích (např. bioimaging, biosensing, nanochirurgie, fotokatalýza a ukládání dat).⁵⁶

Při dopadu záření na koloidní soustavu dochází k absorpci a rozptylu záření, přičemž jeden z těchto jevů převládá v závislosti na charakteru soustavy a velikosti částic

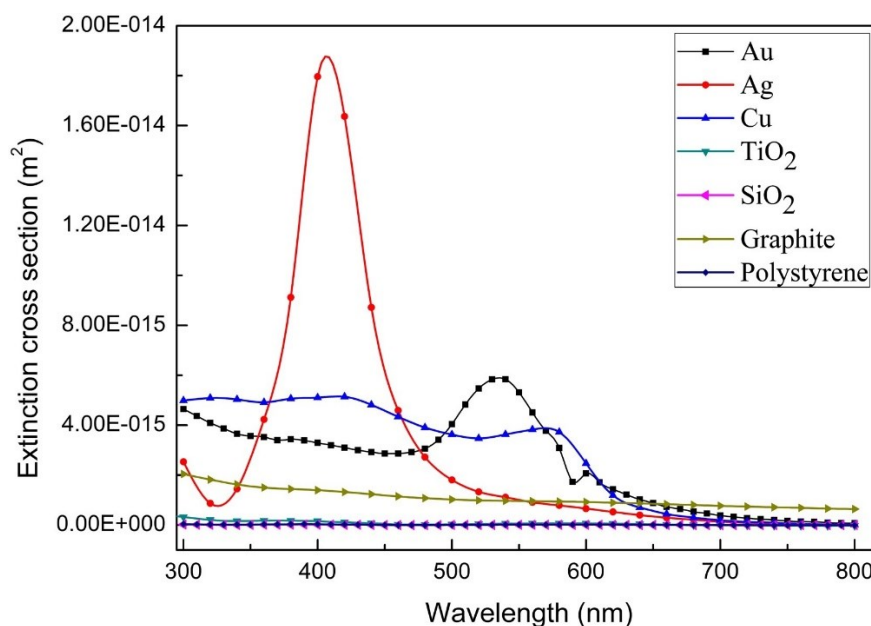
(Obrázek 22). Tyto vlastnosti jsou důsledkem kolektivních oscilací volných elektronů na povrchu kovových nanočástic, které jsou známé jako plasmonová rezonance.



Obrázek 21: (A) LSPR – oscilace elektronů jsou ve fázi s frekvencí dopadajícího světla na nanočástici (menší, než je vlnová délka dopadajícího světla). Kolektivní oscilace vedou k zesílení lokálního elektromagnetického pole a ostré spektrální odezvě (rozptyl a absorpce).
 (B) U nanočástic menších než 15 nm je spektrální odezvou dominantně absorpce.
 (C) U nanočástic větších než 15 nm je spektrální odezvou dominantně rozptyl.⁵⁷



Obrázek 22: Schematické znázornění interakce světla s koloidem kovových nanočástic – rozptyl a absorpce, transmise.⁵⁶



Obrázek 23: UV–VIS spektra různých nanočástic s velikostí částic 50 nm.⁵⁶

Důsledkem absorpce dopadajících fotonů vykazují koloidy kovových nanočástic Ag, Cu a Au vysokou absorbanci při určité vlnové délce záření (Obrázek 23) a jeví se lidskému oku jako barevné.

Poloha absorpčního maxima je charakteristická jak pro daný kov, tak i pro velikost a tvar jeho nanočástic.

Poloha maxima plasmonové absorpce je závislá i na dalších charakteristikách systému, zejména na dielektrických vlastnostech nejbližšího okolí kovové nanočástice. Poloha maxima tak velmi citlivě reaguje jak na změnu rozpouštědla, tak i na stav povrchu částice, snadno ovlivnitelný adsorpcí komponent roztoku, tak na jejich prostorovém uspořádání a vlastnostech prostředí. Při absorpci záření dochází k pohlcení energetického kvanta, což mění energetické stavy elektronů a zvyšuje vnitřní energii molekul, která se přemění na tepelnou energii. Množství absorbovaného záření je popsáno Lambert-Beerovým zákonem.

Poměr intenzity procházejícího světla ku intenzitě počáteční je definován jako transmitance T .

$$(2) \quad T = \frac{I}{I_0}$$

Dekadický logaritmus reciproké hodnoty propustnosti se nazývá absorbance, pro níž platí následující vztah (3).

$$(3) \quad A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T}$$

Pokles intenzity dopadajícího světla je exponenciálně závislý na tloušťce vrstvy a koncentraci roztoku.

$$(4) \quad I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l}$$

Konečný vztah pro absorbanci, známý jako Lambert-Beerův zákon je uveden v rovnici (4), přičemž absorbance je přímo úměrná molární koncentraci, tloušťce absorbující vrstvy a molárnímu absorpčnímu koeficientu ε_λ .

$$(5) \quad A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

Rozptyl světla na koloidních částicích zahrnuje pohlcení a následné vyzáření energie ve všech směrech bez změny vlnové délky. Tento jev zahrnuje odraz, lom, ohyb a interferenci světla a je popsán zákonem podobným Lambert-Beerovu. Rayleighova teorie rozptylu světla platí pro malé kulové částice bez vlastní absorpce světla (předpokládá se, že velikost nanočástic je mnohem menší než vlnová délka dopadajícího světla).⁵⁶

S růstem částic se projevuje i absorpce světla, což ovlivňuje intenzitu rozptýleného záření. Mieho teorie popisuje současný rozptyl a absorpci světla na kovových nanočásticích. Tato teorie předpokládá existenci ideálních částic (velikost, tvar, povrch), což v praxi často není splněno. Její přesnost pro popis chování kovových nanočástic je tedy nízká. Bylo tedy vyvinuto mnoho metod numerické simulace, které řeší řešení nejobecnější Maxwellovy rovnice pro zkoumání optických vlastností nanočástic. Mezi nimi jsou nejběžnější metody diskretní dipólové aproximace (DDA), metoda konečných prvků (FEM) a T-matice, které se vyvíjejí při studiu optických vlastností libovolných nanočástic a také jejich suspenzí.⁵⁶

Rozptyl světla lze využít k charakterizaci koloidních soustav, například měřením koncentrace a velikosti částic. Dynamický rozptyl světla (DLS) využívá laserové záření k měření velikosti částic na základě jejich difúzního pohybu.

3.5 Charakterizace kovových nanočástic

Nanočástice a nanomateriály se v posledních letech těší vysoké pozornosti pro svůj široký aplikační potenciál a jejich speciální vlastnosti. Jde o rychle rostoucí třídu materiálů.

S tím souvisí i potřeba jejich podrobné charakterizace. Charakterizace nanočástic je rozsáhlou a komplexní disciplínou. K charakterizaci velikosti, krystalové struktury, elementárního složení a řady dalších fyzikálních vlastností nanočástic můžeme využít mnoho metod.

V současných vzrušujících časech „*nanověd*“, se však měření a standardizace často opoždějí za rychlým rozvojem nanomateriálů a jejich aplikací. Nároky na reproducibilitu a kontrolu kvality se nicméně nepřetržitě zvyšují s množstvím nově objevovaných materiálů a můžeme očekávat, že tento tlak bude řídit směr inovací v charakterizaci nanočástic.

Čtyři základní vlastnosti, velikost, tvar, povrchový náboj a porozita nanočástic jsou těsně spojeny s jejich funkcionalitou a účinky na zdraví a životní prostředí.

Měření těchto veličin je důležité pro uplatnění potenciálních benefitů nanomateriálů ve specifických aplikacích. Charakterizace je zároveň prvním krokem k zajištění požadovaných vlastností syntetizovaných částic a toho, že požadované vlastnosti jsou reprodukovatelné.

Abychom byli schopni korelovat fyzikálně chemické vlastnosti nanočástic s jejich projevy ve specifických situacích je nutné, aby charakterizace byla přesná. Proto je snahou vyvinout standardizované postupy ke zvýšení míry komparability výsledků mezi rozdílnými materiály a laboratořemi, a to ideálně tak, aby získaná data mohla být srovnána a vyhodnocována smysluplně v kontextu již publikovaných výsledků. To vyžaduje přesvědčivé a harmonizované analytické protokoly globálně aplikovatelné.

Zejména identifikace interakcí mezi ionty či molekulami uvnitř porózní nanočástice v tekutém médiu je zatím velmi neprobádaným tématem. Důležitým poučením z poslední dekády je fakt, že v biologických tekutinách se proteiny shlukují s nanočásticemi, čímž vytvářejí proteinovou korunu, jež nanočásticím propůjčuje „biologickou identitu“. Tím, že je aplikace nanočástic v biologickém kontextu klíčovou technologií, má znalost fyzikálně chemických vlastností nanočástic ve fyziologických podmínkách zásadní důležitost.

Některé z fyzikálních vlastností nanočástic lze často hodnotit hned několika charakterizačními metodami. Každá z nich má však svá omezení a není tedy často možné vybrat pouze metodu jedinou a nejvhodnější. Často je třeba k charakterizaci nanomateriálů využít kombinatorického přístupu a využít metod vícero. Mezi dva hlavní studované parametry nanočástic patří velikost a tvar. Dále můžeme měřit např. distribuci velikosti nanočástic, stupeň agregace, povrchový náboj, plochu povrchu a do určité míry lze hodnotit i chemii povrchu.

Velikost nanočástic, distribuce velikosti a organické ligandy přítomné na povrchu částic významnou měrou ovlivňují vlastnosti a chování nanočástic a tím i jejich možné

aplikace. Proto se nelze se zaměřovat pouze na charakterizaci jádra nanočástice, ale také na jejich povrch a povrchové molekuly (ligandy). Krystalová struktura a chemické složení nanočástic jsou nejčastěji zkoumány po syntéze nanočástic. Doposud pro tento účel neexistují žádné standardizované protokoly. Obtíže přináší analýza nanočástic ve složitých maticích, dalšími výzvami zůstává např. měření koncentrace nanočástic *in situ* a *on-line*.¹

3.5.1 Velikost nanočástic

Velikostí definujeme prostorový rozsah objektu. Pro sférický objekt lze velikost popsat jednoznačně jediným rozměrem. U nekulových objektů však potřebujeme k úplné definici rozměrů několik (Obrázek 24). Při měření velikosti makroobjektů (> 1 mm), kde se velikost měří jako vzdálenost mezi různými konci objektů se může měření jevit jako triviální.

V nanorežimu však „velikost“ nabývá různých významů podle použité měřicí techniky. V případě nanočástice může velikost odkazovat na:

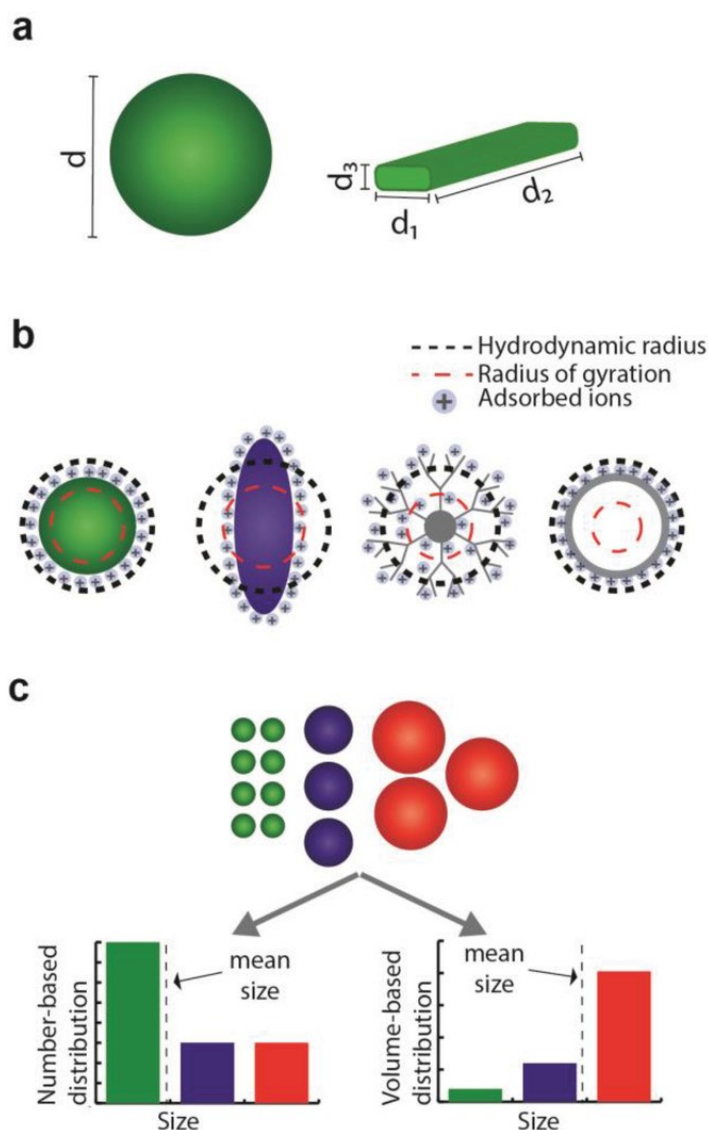
- (i) celkový fyzikální rozměr (rozměry) definovaný atomovou strukturou;
- (ii) efektivní velikost částice v určité matici podle jejího difúzního/sedimentačního chování, případně dle adsorpce složek matrice k povrchu nanočástic, aglomeraci nebo agregaci částic v matici;
- (iii) efektivní velikost nanočástice, vážená jejím hmotnostně-elektronovým rozdělením.¹

Tato rozmanitost definic velikostí odráží širokou škálu fyzikálních přístupů, které lze použít pro charakterizaci nanočástic.

Velikost a morfologii nanočástic lze měřit na úrovni jedné částice v subnanometrovém rozlišení pomocí mikroskopických technik s vysokým rozlišením, jako je elektronová mikroskopie nebo mikroskopie skenovací sondou, které poskytují velmi podrobné informace o tvaru nanočástice.

Tyto metody charakterizace jsou založeny na interakci mezi atomovou strukturou a dopadajícím elektronovým paprskem (TEM, SEM), resp. skenovací sondou (AFM). Jejich nevýhodou je, že nejde o techniky souborové, což vyvolává otázky např. jak reprezentativní a statisticky relevantní získaná data jsou. Měření se provádějí za podmínek vysokého vakua nebo umístěním vzorku na tvrdý substrát. Za těchto podmínek měření může dojít k zanedbávání důležitých jevů, jako je botnání (polymerní nanočástice), nebo agregace nanočástic, které mohou být jinak přítomny v nanočásticové suspenzi.

Metody rozptylu světla, difúzní a sedimentační metody se běžně používají k rutinním analýzám koloidních suspenzí. Tyto metody nám obvykle nedávají přímou informaci o tvaru nanočástice. Získaná hodnota průměru nanočástice je uváděna jako kulový průměr částice, která by za daných podmínek odpovídala chování zkoumaného vzorku. K převedení těchto informací do skutečných rozměrů nanočástic je nutná znalost jejich tvaru. Nepřímo můžeme na tvar nanočástice usuzovat pomocí metod, které nám poskytují informaci o hmotnostním/elektronovém složení nanočástice.



Obrázek 24: Charakterizace velikosti nanočástic. a) Kulovité částice jsou popsány jediným parametrem velikosti. Pro charakterizaci nesférických nanočástic, je k úplnému popisu třeba několika rozměrů; b) hodnota efektivního poloměru nanočástice závisí na vlastnosti nanočástic a použité metodě charakterizace; c) různé střední velikosti nanočástic dle zvolené distribuce – početně a objemově vážená distribuce.¹

Mezi tyto metody patří metody statického rozptylu buď pomocí světla či rentgenového záření. Snahou je syntetizovat nanočástice monodisperzní, reálné vzorky nanočástic však často vykazují určitý stupeň polydisperzity.

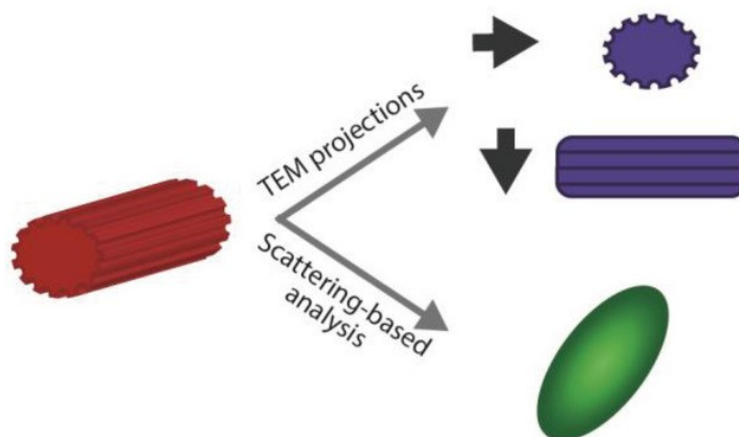
Distribuce velikosti nanočástic je měřítkem kontroly a kvality postupu syntézy nanočástic. V praxi se proto při popisu velikosti používá pojem distribuce velikosti částic. Početní distribuce velikosti částic vyjadřuje procentuální rozložení částic vzhledem k velikosti. Rozložení objemu částic je charakterizováno objemovou distribucí. Techniky založené na jednočásticovém rozlišení, např. mikroskopie s vysokým rozlišením a analýza sledování nanočástic, kde je každé částici přiřazena stejná váha, poskytují početní distribuci velikosti nanočástic. K metodám založeným na objemově váženém odhadu velikosti částic patří metody založené na statickém rozptylu světla.¹

U metod využívajících dynamický rozptyl světla jde o intenzitou vážený průměr (u populace větších částic dochází ke zkreslení). Jednotlivé typy rozdělení lze při znalosti váhových faktorů mezi sebou převádět. Z distribuce velikosti částic lze odvodit mnoho statistických parametrů. Kumulativní distribuce je pro tento účel zvláště vhodná. Mezi nejdůležitější parametry patří percentily. Ty označují velikost x , pod kterou leží určité množství vzorku. Percentily jsou označeny písmenem d následovaným hodnotou %. Hodnota $d50$ se také nazývá „medián“ a rozděluje distribuci velikosti částic na stejné množství „menších“ a „větších“ částic, resp. udává průměr nanočástic pod kterým leží 50 % populace. Obvykle se pro distribuci velikosti částic uvádí ještě $d10$ a $d90$. Díky tomu lze snadno charakterizovat střední bod distribuce, horní a dolní konec distribuce celkem třemi hodnotami. Z těchto metrik pak lze vypočítat odvozené veličiny, jako je variační koeficient, definovaný jako poměr směrodatné odchylky a aritmetického průměru, používaný pro měření statického rozptylu světla a definovaný normou ISO 13320.¹

3.5.2 Tvar nanočástic

Ačkoli nejčastěji uvažujeme nanočástice sférické, obvykle mají velké množství geometrických a nepravidelných tvarů.

Částice stejného složení a s podobnými rozměry mohou mít s ohledem na jejich tvar zcela odlišné chování. Jde např. o *uptake* (schopnost být přijímány) buňkami, resp. jejich uvolňování buňkami, jejich vazebná schopnost k povrchům, optické vlastnosti a vlastnosti související s plasmonovou rezonancí.



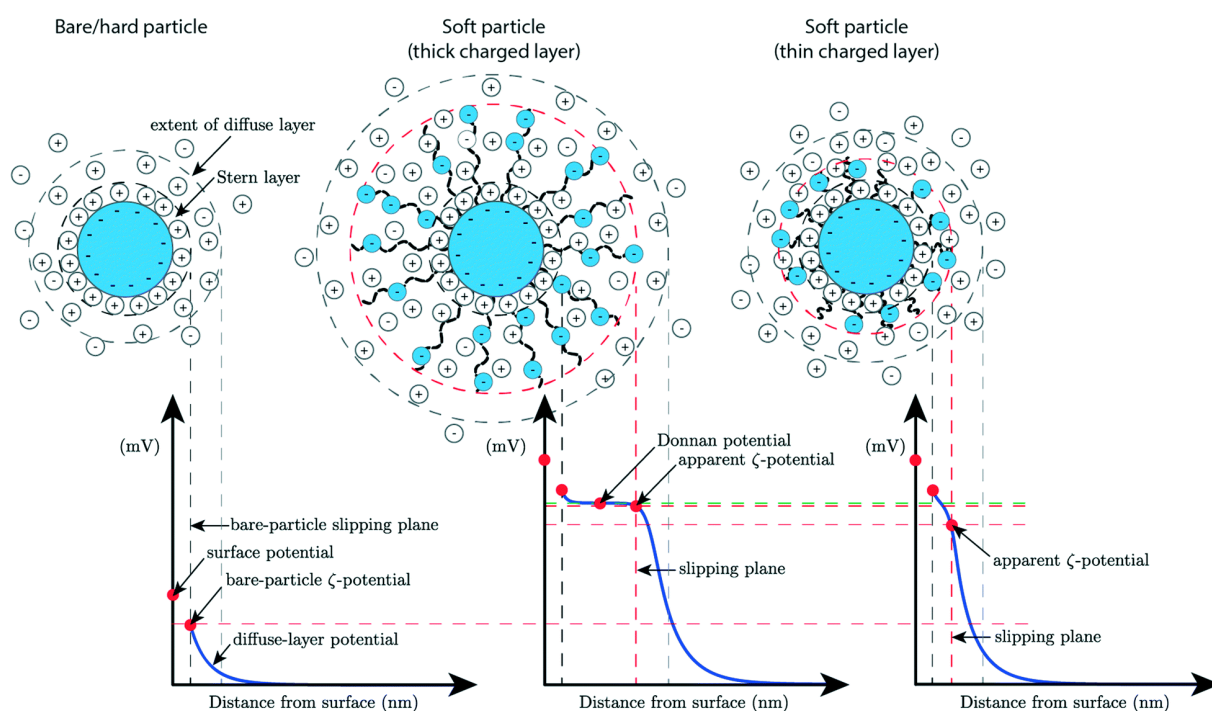
Obrázek 25: Charakterizace tvaru nanočástic. TEM sice poskytuje nanometrové rozlišení, ale měřený tvar je pouhou 2D projekcí morfologie nanočástic závisící na relativní orientaci nanočástice k elektronovému paprsku. Techniky pracující na základě rozptylu poskytují pouze kvalitativní informaci o tvaru nanočástic.¹

Tvar nanočástic je obvykle charakterizován mikroskopickými technikami s vysokou rozlišovací schopností, jako je elektronová mikroskopie či mikroskopie skenovací sondou. Nicméně, elektronová mikroskopie typicky poskytuje projekci nanočástice do 2D rozměrů a pro specifické případy vysoce anizotropních částic, může vést k chybným odhadům morfologie částic (Obrázek 25). Aby se tomuto zkreslení předešlo můžeme rekonstruovat jejich prostorové uspořádání rekonstruovat pořízením projekcí velkého počtu náhodně orientovaných identických částic, či využít elektronové tomografie. Informace o tvaru a anizotropii částic v roztoku lze také získat pomocí technik založených na rozptylu záření např. metodami kombinující metody statického a dynamického rozptylu světla. Uvedené metody analýzy nanočástic v roztoku umožňují pouze odvodit faktor anizotropie částic a podrobná studie morfologie částic zůstává omezena na vysoko-rozlišovací mikroskopické metody. Avšak kvalitativní informace o tvaru nanočástic získané pomocí metod založených na rozptylu světla jsou často nezbytné pro potvrzení výsledků mikroskopie, protože příprava vzorku a výsledek získaný elektronovou mikroskopií může být ovlivněn aglomerací vzorku nebo může během procesu dojít k poškození struktury částic.

3.5.3 ζ potenciál koloidů nanočástic

Měření zeta potenciálu, který byl již diskutován výše, může poskytovat velice cenné informace o chování, osudu a toxicitě nanomateriálů, zvláště ve vztahu k biologickým a environmentálním účelům. Ačkoliv různé regulační agentury (U. S. Environmental Protection

Agency – TSCA, ISO) doporučují měřit ζ potenciál jako nezbytný parametr k charakterizaci nanomateriálů pro vědecké a regulační účely, tak jen několik málo dokumentů (ASTM E2865-12 a ISO 13099-1, -2 a -3) popisuje, jak zeta potenciál nanomateriálů měřit. Tyto standardy však nejsou volně dostupné, nemusí zcela splňovat potřeby regulace nanomateriálů a existuje jen málo standardizovaných metod měření a hlášení.⁵⁸



Obrázek 26: Schéma rozložení elektrického náboje na negativně nabitě holé částici, nabitě částici se silnou negativně nabitou polyelektrolytovou vrstvou a nabitě částici s tenkou negativně nabitou polyelektrolytovou. V klasickém modelu holých částic (vlevo) se náboje v kompaktní Sternově vrstvě uvnitř kluzné roviny pohybují spolu s částicí. Náboje mimo kluznou rovinu zůstávají v objemové kapalině. Elektrostatický potenciál v této idealizované kluzné rovině se označuje jako „zeta potenciál“. U potažené částice, pokud je makromolekulární vrstva negativně nabitá (polyelektrolyt) a silná (schéma uprostřed), dosahuje Donnanův potenciál (Ψ_d) přibližně hodnotě zjevného zeta potenciálu. U tenké polyelektrolytové vrstvy se stejnou negativní hustotou náboje (vpravo) je zjevný zeta potenciál menší než Ψ_d . Je třeba poznamenat, že jsou zobrazeny tři zdroje náboje: negativní náboj pocházející ze samotné částice, negativní náboj odvozený od polyelektrolytu spojený s deprotonovanými skupinami na polymeru a náboj pocházející z roztoku související s rozpuštěnými aniony a kationy (kladné a záporné náboje v bílých kroužcích).⁵⁸

Existuje řada studií, které korelují ζ potenciál s chováním částic v roztoku nebo s biologickým uptake a potenciální toxicitou. Přesné a srovnatelné měření ζ potenciálu by mohlo umožnit vývoj korelací pro predikci chování mezi různými typy nanočástic na základě jejich měřeného zeta potenciálu.⁵⁸ Tyto korelace by pak mohly být použity k předpovědi chování nových nanomateriálů na základě jejich vlastností. Nicméně zeta potenciál je systémově závislá vlastnost, která závisí na vlastnostech částic i systému (složení, fáze, povlak nanočástic, iontová síla, pH a přítomnost organické hmoty) ve kterém se nanočástice nachází. Pro srovnání mezi jednotlivými studiemi je nutné mít konzistentní data o vlastnostech nejen nanočástic, ale i systému.

Je důležité poznamenat, že ζ potenciál není přímým měřítkem povrchového náboje částice, ale teoretickým výpočtem elektrostatického potenciálu na imaginární ploše hydrodynamického smyku. Vztah mezi zeta potenciálem a skutečným povrchovým nábojem je předmětem teorie a předpokladů.

Složitost situace lze demonstrovat na příkladu polymerem nebo polyelektrolytem potažené částice, kde se zdánlivý ζ potenciál vyskytuje v rovině skluzu mimo vrstvu polymeru. Velikost zdánlivého ζ potenciálu závisí na náboji polymerní vrstvy a tloušťce této vrstvy. U silných polymerních vrstev je potenciál částice maskován a výsledný ζ potenciál je v podstatě Donnanův potenciál vrstvy. U tenkých polymerních vrstev je zdánlivý ζ potenciál ovlivněn jak potenciálem částic, tak potenciálem povlaku (Obrázek 26).⁵⁸

Velikost ζ potenciálu dlouho sloužila jako indikátor stability disperze proti agregaci. Za středně stabilní koloidy vůči agregaci byly obvykle považovány hodnoty zeta-potenciálu nad ± 30 mV, s představou, že elektrostatické odpuzivé síly jsou dostatečně vysoké, aby zabránily agregaci. Toto odvození bylo původně popisováno pro chování koloidů o velikostech stovek nm, a pravděpodobně není zcela vhodné pro nanomateriály.⁵⁸

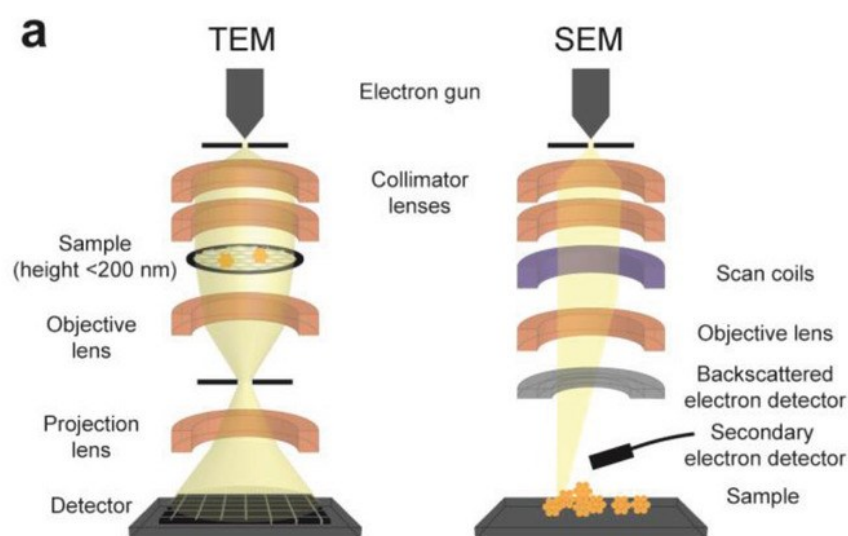
Nedostatek standardů pro měření ζ potenciálu nanočástic brání v současnosti snahám používat ζ potenciál jako veličinu sloužící ke srovnání mezi jednotlivými studiemi.

3.5.4 Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je nepochybně jedna z nejdůležitějších technik charakterizace nanočástic. TEM využívá elektronového paprsku fokusovaného na tenký (obvykle méně než 200 nm) vzorek k tvorbě elektronogramů nanomateriálů s vysokým laterálním prostorovým rozlišením. Současné elektronové mikroskopy dosahují rozlišení

méně než 0,05 – 0,1 nm díky redukci obrazového zkreslení pomocí korekce odchylek, čímž poskytují vysoce kvalitní obraz s atomovým rozlišením. TEM zároveň umožňuje studium krystalové mřížky vybraných mikroskopických oblastí krystalických látek prostorovým vymezením a zaměřením paprsku a detekcí výsledného vzorce elektronové difrakce. Díky tomuto vysokému prostorovému rozlišení a selektivitě umožňuje TEM studovat velikost, tvar a krystalickou strukturu na úrovni jednotlivých částic. Jakmile je získána skupina reprezentativních obrázků vzorku nanočástic, individuální velikosti přibližně 1000 náhodně vybraných nanočástic by měly být změřeny k dosažení kvalitní statistiky k určení distribuce velikosti. Tento proces je možno realizovat buď manuálně (což je neodmyslitelně zatíženo chybou v podobě lidského faktoru), nebo užitím automatizovaných metod analýzy částic.¹

Ačkoliv TEM nabízí vizuální inspekci jednotlivých částic v nanometrickém rozlišení, proces přípravy vzorku, jeho měření a analýzy mohou být velmi náročné. Nanočástice navíc musí být elektron-transparentní a musí být schopné odolat vysokému vakuu a energii elektronového paprsku potřebného k charakterizaci. Zejména kvůli vysoké energii elektronového paprsku je častým problémem, zejména při charakterizaci organických, polymerních a hybridních nanočástic, zničení vzorku. Tato skutečnost může být výzvou pro využití kryoEM, nebo může být vyřešena snížením urychlovacího napětí, avšak za cenu zvýšení náročnosti celého procesu měření a může vést ke snížení dosažitelného rozlišení.¹ A konečně, TEM je metoda velmi náročná jak na pořizovací, tak na udržovací náklady a vyžaduje vysoce kvalifikovaný obsluhující personál.



Obrázek 27: Schematické srovnání transmisní a skenovací elektronové mikroskopie.¹

3.5.5 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie umožňuje získat obraz povrchu pomocí detekce elektronů sekundárně emitovaných při interakci s dopadajícím elektronovým paprskem (Obrázek 27). Ve srovnání s TEM užívá SEM nižší energie paprsku, což vede k nižší penetraci do hloubky, čímž je SEM citlivá výhradně k povrchu vzorku. Tato povrchová interakce nicméně znamená, že SEM je použitelná v analýze „tlustých“ (>100 nm) vzorků, což není možné pomocí TEM. Středně vysoké energie elektronů v SEM limitují analýzu na 2–3 nm, ve srovnání s TEM nicméně dramaticky snižují riziko poškození vzorku paprskem. SEM je navíc uživatelsky mnohem přívětivější a poskytuje rychlejší výsledky měření při nižších pořizovacích a udržovacích nákladech. Nástroje pro SEM umožňují studium složení povrchu pomocí měření množství elasticky rozptýlených elektronů, jež je závislé na interakci mezi fokusovanými elektrony a materiálem vzorku, popř. Pomocí detekce rentgenového záření emitovaného po ionizaci elektronovým paprskem.¹

SEM obvykle vyžaduje vodivé substráty k zobrazení ve vysokém rozlišení, nevodivé materiály mohou být před analýzou potaženy tenkou (5–10 nm silnou) vrstvou metalického filmu. S takovouto modifikací velikosti a struktury povrchu nevodivých nanočástic je nutno počítat při interpretaci elektronogramů ze SEM. „Environmentální“ SEM umožňuje např. zobrazení nevodivých materiálů při nízkém tlaku místo vysokého vakua, kdy je ionizace povrchu redukována přítomností plynu o nízkém tlaku v měřicí komoře. Tato metoda nicméně poskytuje nižší prostorové rozlišení než standardní SEM. Je nutno mít na paměti, že SEM ve srovnání s TEM podává informace pouze o struktuře povrchu vzorku, zatímco TEM interaguje s celým objemem vzorku, čímž dává informace o celé jeho struktuře (např. o tloušťce vrstvy či obalu resp. jádra nanočástice).¹

3.5.6 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil je skenovací mikroskopická technika, již je možno užít ke zkoumání a zobrazení povrchu objektů nanometrických či dokonce atomárních rozměrů (a popisu dalších vlastností vzorku s atomárními silami spojených). Ostrá špička na konci konzole (*cantilever*) rastruje po povrchu vzorku a síly, jímž je konzole vystavena jako následkům interakce špičky a vzorku, jsou zaznamenávány pomocí laserového paprsku odraženého od špičky konzole dopadajícího na fotodiodu.

V závislosti na módu detekce jsou zaznamenávány vertikální či laterální výchylky konzole, popř. změna amplitudy, frekvence nebo fáze oscilace konzole. Obecně lze říci, že mikroskopie atomárních sil využívá tři módy: kontaktní, nekontaktní a poklepávající (tapping).

Během kontaktního módu je špička konzole vždy v kontaktu s povrchem vzorku. Repulse atomů špičky konzole a povrchu vzorku vede k vertikálním výchylkám konzole v závislosti na topografii povrchu. Laterální výchylky konzole je možno využít při mikroskopii laterálních sil (LFM) a měření změn tření, jež se často objevují na rozhraní dvou různých materiálů. Tento mód je obecně vcelku robustní, ale není neinvazivní a může vést ke změnám polohy nano-objektů na povrchu či opotřebování až poškození vzorku či špičky.¹

Během nekontaktního módu je využit piezokrystal, jenž zaznamenává oscilace konzole v jeho rezonanční frekvenci nebo blízko ní. Tyto oscilace jsou přítomny těsně nad povrchem vzorku a špička konzole není nikdy v kontaktu s povrchem vzorku. Změny sil mezi špičkou a povrchem vzorku vedou ke změnám v amplitudě, rezonanční frekvenci a fázi oscilací konzole, z čehož je možno získat informace o vlastnostech povrchu a jeho topografii. Tohoto módu je obvykle užíváno za vysokého vakua a je možno dosáhnout velmi vysokých rozlišení až na atomární úroveň.¹

Poklepový mód je podobný nekontaktnímu módu. Také využívá oscilující konzole, jež však neosciluje přísně pouze nad povrchem vzorku, ale „poklepává“ po povrchu vzorku. Tento mód je mnohem méně invazivní, nežli je mód kontaktní, a je nejčastěji používán za atmosférických podmínek. Je možné jej využít i pro kapaliny. Vedle přitažlivých a odpuzivých sil mezi špičkou a atomy povrchu vzorku, jež se mění v závislosti na vzdálenosti mezi konzolí a atomy povrchu (a tedy topografií povrchu), je mnoho dalších parametrů, jež je možno zkoumat pomocí mikroskopie atomárních sil, např. magnetické síly při MFM, chemické síly při CFM či povrchový náboj při KPM.¹

Nacházejí-li se nanoobjekty přímo na povrchu (ideálně hladkého a plochého) substrátu, není pro měření potřebná žádná specifická příprava.

Částice v suspenzi je nutno umístit na hladký povrch (jako je slída či silikon). Na rozdíl od skenovací tunelové mikroskopie není v případě mikroskopie atomárních sil nutná vodivost vzorku. Skenovaný obrázek přímo zobrazuje velikost a morfologii nanoobjektů.¹

3.5.7 Rentgenová difrakce

Rentgenová difrakce je univerzální technika studia širokého spektra strukturálních vlastností krystalických vzorků. Rozsah dosažitelných informací zahrnuje jak mikroskopické vlastnosti vzorku, jako je např. uspořádání komponent krystalu, tak makroskopické, jako tvar a velikost krystalu. Tyto informace lze získat z analýzy šířky píku v polovině jeho výšky (FWHM), pološířky difrakční linie.

Střední hodnota velikosti krystalu v daném směru krystalové mřížky může být určena pomocí Scherrerovy rovnice (6):

$$(6) \quad \tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta},$$

kde τ je velikost krystalitu; K je konstanta závislá na tvaru krystalitu; λ je vlnová délka rentgenova záření; β je pološířka, resp. FWHM (*full width at half maximum*); θ značí Braggův úhel.

Tato rovnice zohledňuje ideální podmínky dokonale rovnoběžného, nekonečně úzkého a monochromatického rentgenového paprsku, jenž prochází monodisperzním práškem krychlových krystalitů. Ačkoliv tato rovnice dovoluje stanovení střední krystalické velikosti polykrystalického vzorku, uživatel by si měl být vědom některých důležitých problémů.

S rostoucím difrakčním úhlem prudce roste rozšíření difrakčních linií v důsledku mikropnutí, které tak nejvíce postihuje zadní reflexe (u vyšších úhlů θ). Podobný efekt na rozšíření profilů difrakčních linií mají i malé rozměry krystalitů D pod 500 nm. Pomocí Scherrerovy formule lze odhadnout velikost krystalitů D z pološířky difrakční linie. Rozšíření v důsledku nanorozměrů krystalitů také roste s difrakčním úhlem, avšak pomaleji, než v případě mikropnutí a silně rozšiřuje i přední difrakční linie. Protože malý rozměr krystalitů i mikropnutí vedou k rozšíření difrakčních profilů, je obtížné tyto dva efekty oddělit, jakkoliv oba typy rozšíření vykazují odlišnou závislost na difrakčním úhlu. Obecně lze zhruba říci, že nanokrystality rozšiřují reflexe již od malých úhlů, zatímco mikropnutí (tj. rozptyl hodnot mezirovinných vzdáleností) vede k podstatnému rozšíření u vyšších difrakčních úhlů. Informace získané rentgenovou difrakcí vycházejí ze strukturálních vlastností krystalových domén a nevypovídají o krystalu jako o celku. Z toho důvodu je pro získání spolehlivých informací nutné využít i jiných analytických metod, jako TEM či SEM.¹

3.5.8 Dynamický rozptyl světla

Při obecném rozptylu světla je světlo, rozptýlené od různých částic, v náhodné fázi, takže nedochází k jeho interferenci. Při použití laseru je světlo koherentní a po jeho interakci s částicemi k interferenci dochází. Protože se malé částice v kapalině pohybují díky Brownovu pohybu, mění se vzdálenost, kterou musí urazit rozptýlené světlo k detektoru. Rozptýlené vlnění může interferovat v závislosti na vzdálenosti mezi částicí a detektorem. Výsledkem jsou fluktuace intenzity rozptýleného záření okolo průměrné hodnoty intenzity.

Z fluktuací intenzity se získá korelační funkce, která představuje vztah mezi průměrem intenzity v čase $(t + \tau)$ a v čase t . Při velkém τ (zpoždění) jsou $I(t)$ a $I(t+\tau)$ na sobě nezávislé, zatímco při velmi krátkém zpoždění na sobě závislé jsou. V případě kulovitých částic stejných velikostí lze korelační funkci vyjádřit v jednoduchém exponenciálním tvaru (7).

$$(7) \quad g(\tau) = \exp(-\tau/\tau_c)$$

Parametr τ_c je úměrný difúznímu koeficientu D částic (8).

$$(8) \quad \tau_c = 1/2DQ^2,$$

kde Q je vlnový vektor. Vynesením $\ln g(\tau)$ proti τ se získá τ_c . Hydrodynamický poloměr částic R je, za použití Stokes-Einsteinovy rovnice pro difúzní koeficient ($D = kT/6\pi\eta a$), dán vztahem (9)

$$(9) \quad R = (kT/6\pi\eta)Q^2\tau_c$$

V praxi se měří τ_c při různých úhlech rozptylu (různých hodnotách Q) a vynáší se $1/\tau_c$ proti Q^2 , čímž se získává D a odtud R .

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS), nazývaná rovněž jako foton korelační spektroskopie (PCS) je v současné době široce používána pro stanovení velikosti koloidních částic. Obvykle jsou výsledky v přiměřeně dobré shodě s výsledky elektronového mikroskopu.

Určité nesrovnalosti ve výsledcích mohou být přisouzeny buď rozdílu mezi hydrodynamickým poloměrem (který může zahrnovat solvatační obal či naadsorbovanou vrstvu na povrchu částic) a skutečným poloměrem nebo změnám ve velikosti částice vznikajícím při přípravě vzorku pro elektronový mikroskop (vysoušení) či změnám pocházejícím od ozařování elektrony.¹

V případě polydisperzních systémů se musí vzít do úvahy pohyb částic rozdílných velikostí a korelační funkce má poté složitější formu.

Získaná průměrná velikost koloidních částic je vážena podle páté mocniny (tzv. Z-average), takže velké částice jsou v této hodnotě velmi nadhodnoceny, a dokonce se může u některých přístrojů stát, že frakce malých částic se úplně ztratí ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích.

Rozsah metody je oproti sedimentačním metodám výrazně jiný – dolní mez se dnes pohybuje okolo 0,5 nm a maximální pak okolo 3 μm (větší částice již nepodléhají Brownovu pohybu).¹

3.6 Antimikrobiální vlastnosti kovových nanočástic a jejich potenciál v době narůstající antibiotické rezistence

3.6.1 Historie infekčních onemocnění a hrozba antibiotické rezistence

Infekční onemocnění jsou stále příčinou vysoké úmrtnosti obyvatelstva jak ve světě tak u nás. Z historie víme, že ke vzniku a šíření epidemií či pandemií infekčních nemocí docházelo pravidelně. V českých zemích lze uvést např. epidemie moru ve středověku (14. století, pandemie 1713–1715), cholery po prusko – rakouské válce (1866–1867), břišního tyfu (za II. světové války a v poválečných letech), pandemie španělské chřipky chřipky (1918–1920). Dále v nedávné době proběhlé epidemie a pandemie chřipek, SARS-CoV (těžkého akutního respiračního syndromu), MERS-CoV (koronavirus blízkovýchodního respiračního syndromu). Největší pandemií v poslední době byla nepochybně pandemie koronavirové nemoci COVID-19 (SARS-CoV-2). V roce 2024 se v ČR znovu objevila epidemie černého kašle.

Před začátkem 20. století byly infekční nemoci příčinou vysoké nemocnosti a úmrtnosti na celém světě. Průměrná délka života při narození byla 47 let (46 let u mužů a 48 let u žen), a to i v průmyslově vyspělých zemích. Infekční nemoci, jako jsou neštovice, cholera, záškrť, zápal plic, břišní tyfus, nákaza, tuberkulóza, tyfus, syfilis atd. byly rozšířené.⁵⁹

V době, kdy nebyly jiné způsoby, jak se s infekčními chorobami vypořádat (nebyla k dispozici účinná antiinfekční léčba), byla k omezení šíření infekčních onemocnění zaváděna různá protiepidemická opatření jako je izolace, karanténa či kontroly hranic (tato opatření platí dosud a byla využívána i při pandemii COVID-19).

V roce 1921 Alexander Fleming zkoumal tělní tekutiny jako jsou slzy, sliny a další a objevil látky zvané lysozymy, které byly schopné „rozpouštět bakterie“. V roce 1928 zjistil, že určitý druh plísní kontaminující agarové plotny se staršími kulturami bakterií *Staphylococcus aureus*, způsobuje jejich lýzu a inhibuje jejich růst. Tento druh plísně byl později určen jako *Pencillium notatum* a izolovaná látka kterou tato plíseň produkoval byla nazvána „penicilin“.⁶⁰ V roce 1940 se Howard Florey, Norman Heatley a Ernst Chain dopracovali k postupu izolace penicilinu a základům průmyslové výroby penicilinu. Tím byla započata éra antibiotik. Pouze tři (Fleming, Florey a Chain) však byli v roce 1945 oceněni Nobelovou cenou. Ještě před tím, v roce 1935 objevil Gerhard Domagk první synteticky připravené antibiotikum – Prontosil rubrum⁶¹. Šlo o molekulu azobarviva, jejíž metabolismem v těle vzniká účinná molekula sulfanilamidu.⁶² O čtyři roky později obdržel Nobelovu cenu.

Antimikrobiální látky jsou pravděpodobně jednou z nejúspěšnějších léků v historii medicíny. Není nutné zde opakovat, kolik životů zachránily a jak významně přispěly ke kontrole infekčních onemocnění, která byla po většinu lidské existence hlavní příčinou lidské nemoci a úmrtnosti. Na rozdíl od všeobecného přesvědčení, že působení antibiotik je omezeno na moderní "antibiotickou éru", výzkum ukázal, že tomu tak není. Stopy tetracyklinu byly například nalezeny v lidských kosterních pozůstatcích ze starověké súdánské Núbie z let 350-550 n. l. Další příklad expozice antibiotikům ve starověku pochází z histologické studie vzorků odebraných ze stehenních kostí koster z pozdní doby římské z oázy Dakhleh v Egyptě a nalezené vzorky ukazují na přítomnost tetracyklinu v tehdejší stravě.⁶³

Doby, kdy u nás byla infekční onemocnění nejčastější příčinou úmrtnosti obyvatelstva naštěstí již minuly. Neplatí však, že by infekčních onemocnění ubývalo. Infekční nemoci jsou stále jednou z největších zdravotních výzev na celém světě.⁶⁴

Infekcí i v hospodářsky vyspělých zemích výrazně přibývá a objevují se i nové infekce, dříve vzácné nebo neznámé. Na celém světě dochází k rychlému výskytu rezistentních bakterií, což ohrožuje účinnost antibiotik. Krize rezistence vůči antibiotikům je připisována nadměrnému užívání a zneužívání těchto léků a také nedostatečnému vývoji nových léků farmaceutickým průmyslem v důsledku snížené ekonomické motivace a náročných regulačních požadavků.

Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) klasifikovalo řadu bakterií jako naléhavé, závažné a znepokojivé hrozby, z nichž mnohé již nyní představují značnou klinickou a finanční zátěž pro americký systém zdravotní péče, pacienty a jejich rodiny.⁶⁵⁻⁶⁷

Rezistence vzniká v důsledku přirozené rezistence u některých druhů bakterií (přítomné ještě před objevením antibiotik), genetických mutací u mikroobů, tím, že jeden druh získá rezistenci od jiného, a selekčního tlaku v důsledku používání antibiotik, který poskytuje konkurenční výhodu mutovaným kmenům. Suboptimální dávky antibiotik, zejména v důsledku nesprávného používání antibiotik, napomáhají postupné selekci rezistence. Příklady významných rezistentních patogenů ve světě jsou *Streptococcus pneumoniae* rezistentní vůči penicilinu (PRSP), *Staphylococcus aureus* rezistentní vůči methicilinu (MRSA), enterokoky rezistentní vůči vankomycinu (VRE) a gramnegativní bakterie rezistentní vůči více lékům (MDRGNB).⁶⁸

Rezistentní organismy se obtížně léčí, protože vyžadují vyšší dávky nebo alternativní léky, které jsou případně toxičtější a dražší. Podle Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) se nejméně 2 miliony lidí nakazí bakteriemi rezistentními vůči antibiotikům a více než 23 000 lidí ročně v důsledku těchto infekcí zemře.⁶⁸

Naděje se vkládají do nanomateriálů a nanočástic, které by mohly svým působením odlišným od mechanismů antibiotik účinně bojovat s multirezistentními kmeny.^{65,66,69}

3.6.2 Nanočástice jako potenciální antibakteriální prostředky

Nanomateriály se nabízejí jako slibná alternativa, která by mohla do budoucna pomoci v boji s multirezistentními kmeny bakterií. Nanomateriály, včetně kovových nanočástic by mohly být slibnými variantami k současně používaným antibiotikům a antimykotikům.^{3,70–73}

Mezi tyto materiály patří se mohou řadit modifikované nanočástice na bázi uhlíku (fullereny, nanotrubičky, grafen a jeho deriváty, nanodiamanty a další), které samy o sobě mají omezenou antimikrobiální aktivitu, ale vhodnou modifikací jejich povrchu a úpravou fyzikálně-chemických vlastností je možné jejich antimikrobiální aktivitu zvýšit.^{11,74}

Nanočástice samotné umožňují funkcionalizaci antibiotiky, které lze cílit přímo do zamýšlené lokalizace. Další aktivní látky a polymery mohou zvýšit pravděpodobnost kontaktu a sílu interakce s bakteriemi. Nanomateriály mohou fungovat jako antimikrobiální látky samy o sobě, nebo jako nosiče antimikrobiálních látek, čímž zvyšují jejich účinnost a dostupnost.^{65,66}

Mezi antibakteriální nanomateriály, které nevyžadují funkcionalizaci antimikrobiálně působícími molekulami, patří kovy, chitosan a povrchově aktivní látky. U povrchově aktivních kladně nabitých kationtových sloučenin spočívá jejich účinek v navázání na záporně

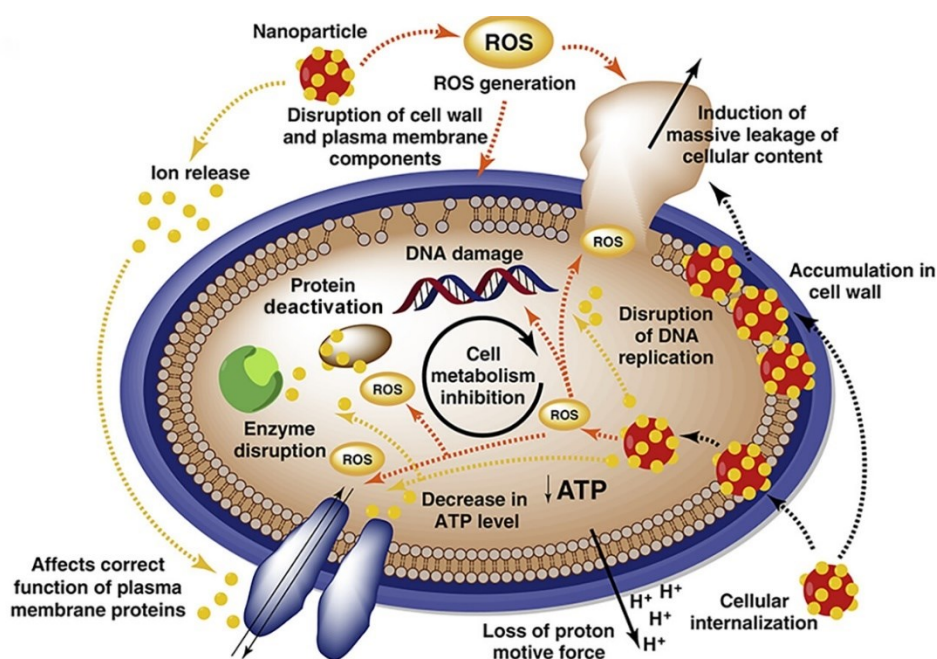
nabíý povrch bakteriálních buněk, amfifilní struktura některých látek způsobuje poškození buněčné membrány a smrt bakterie.⁷⁴

O tyto materiály je velký zájem díky jejich vlastnostem, jako jsou optické vlastnosti včetně povrchové plasmonové rezonance (SPR), možnost modifikace povrchu pro řízení rozpustnosti, stability a interakce s prostředím, a mechanismy účinku odlišné od tradičních antibiotik, bez ohledu na mechanismus rezistence patogenů. Tyto materiály mají syntetickou všestrannost, která umožňuje kontrolu jejich velikosti, tvaru a povrchových vlastností, a mohou být funkcionalizovány pro značení, cílení a konjugaci farmakologických molekul. Jejich syntéza je jednoduchá, nákladově efektivní a snadná.^{2,22,74}

3.6.3 Mechanismy antibakteriálního působení kovových nanočástic

Kovové nanočástice mají antimikrobiální vlastnosti, které spočívají v jejich schopnosti inhibovat enzymy, zvyšovat tvorbu reaktivních forem kyslíku, narušovat buněčné membrány a bránit mikrobům v přijímání důležitých stopových prvků. Některé kovy mohou také přímo způsobovat genotoxicitu.^{22,69,71,72}

Schematické znázornění jednotlivých antibakteriálních mechanismů je na obrázku (Obrázek 28).



Obrázek 28: Interakce kovových nanočástic s bakteriální buňkou.⁷¹

3.6.3.1 Uvolňování kovových iontů

Vlivem elektrochemického potenciálu dochází k rozpouštění nanočástic v roztoku. Bakteriostatický účinek nanočástic je úměrný množství z nich vznikajících iontů. Množství přítomných nanočástic přímo ovlivňuje antibakteriální působení, protože vyšší koncentrace nanočástic uvolňují více iontů a zvyšují jejich koncentraci v čase. Tento mechanismus je v souladu s pozorováním, že delší inkubační doby mikroorganismů s nanočásticemi snižují jejich životaschopnost.^{72,75}

Uvolněné ionty kovů jsou pro bakterie škodlivé a při kontaktu s bakteriálními buňkami v roztoku se rovnoměrně rozptýlí bez specifické lokalizace. Nanočástice, které se vážou na bakteriální buněčné stěny, však vytvářejí koncentrovaný zdroj iontů, který neustále uvolňuje své ionty v místě působení a zvyšuje tak lokální toxicitu. Vysoká koncentrace uvolněných iontů napomáhá pronikání do buněk. Výsledkem je, že lýza buněk způsobená nanočásticemi je omezena na obvod bakteriální buněčné membrány a je určena jejich velikostí a tvarem. Aktivita nanočástic je silně ovlivněna jejich povrchovou strukturou, přičemž hrubší povrch vede k rychlejší lýze. Menší nanočástice se rozpouštějí rychleji, což je dáno jejich velkým poměrem jejich povrchu k objemu.⁷⁵

Uvolňování iontů z nanočástic se zdá být závislé na jejich složení. Například stříbrné nanočástice jsou účinnější než měděné nanočástice, což znamená, že stejné množství Ag^+ vykazuje mnohem vyšší antimikrobiální aktivitu než stejné množství Cu^{2+} , přestože uvolňují podstatně méně iontů (měděné nanočástice uvolňují 253krát více iontů než stříbrné).^{75,76}

3.6.3.2 Tvorba reaktivních forem kyslíku a oxidační stres

ROS (Reactive Oxygen Species) – reaktivní formy kyslíku jsou vysoce aktivní molekuly obsahující kyslík s krátkým poločasem působení. Obvykle se skládají z neradikálů, jako je peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxyl ($\text{OH}^\cdot$) a z nestabilních kyslíkových radikálů, jako jsou hydroxylové radikály ($\cdot\text{OH}$), peroxidové ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a superoxidové ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikály. Buňky vytvářejí a spotřebovávají ROS v normálních homeostatických podmínkách. Oxidační stres může nastat, když tvorba ROS překročí antioxidační kapacitu mikrobiálních buněk. Při překročení antioxidační kapacity dochází k poškození klíčových biomolekul jako jsou proteiny, lipidy, RNA a DNA a dochází k poškození buňky.^{22,74,75}

Kovové nanočástice, či nanočástice oxidů kovů mohou inhibovat a ničit bakteriální biofilmy přímým kontaktem s buněčnými membránami nebo buněčnými stěnami a

generováním ROS ale i reaktivních forem dusíku (RNS) volných radikálů, což vede k denaturaci biomolekul. Poškozením mitochondriální membrány může oxidační stres způsobený ROS a RNS spustit v apoptotických genech programovanou buněčnou smrt.⁷⁵

Střední a vysoké hladiny akumulace ROS podporují maligní bujení a tyto ROS také způsobují buněčnou smrt prostřednictvím apoptózy, nekrózy, autofagie a ferroptózy. Bylo zjištěno, že spolupůsobením H₂O₂ a nanočásticemi dochází k inhibici růstu *Escherichia coli* 2,5 - 5krát, než bez použití peroxidu vodíku.⁷⁷ Expozice CuO nanočásticím přispívá k apoptóze a oxidačnímu stresu.⁷⁸ Za fyziologických podmínek je kontrola dávky a specifické cílení ROS nezbytné pro dobrou antimikrobiální účinnost.

Ve vlhkém prostředí mohou ionty uvolněné z nanočástic generovat ROS. ROS jsou generovány elektrony uvolněnými ze stříbrných nanočástic jak v extracelulárním, tak intracelulárním prostředí. Použitím ROS scavengerů, jako je např. acetylcystein, antimikrobiální účinek nanočástice se významně snížil, což ukazuje, že nadměrná tvorba ROS indukovaná nanočásticemi souvisí s toxickým působením na bakterie.⁷⁹

3.6.3.3 Interakce s buněčnými membránami

Buněčná stěna hraje klíčovou roli v metabolických drahách (jako jsou elektronové transportní řetězce a řízené kanály pro pohyb molekul dovnitř a ven) a v izolaci cytoplazmatických inkluzních tělísek od vnějšího prostředí. Její narušení je tedy pro bakteriální buňky smrtelné. Negativně nabitě buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií jsou výhodné pro elektrostatické interakce s pozitivně nabitými nanočásticemi. Díky své adsorpci a pronikání do buněk způsobují nanočástice poškození membrány bakterií při kontaktu s nimi. Adsorpce nanočástic způsobuje depolarizaci buněčné membrány, což mění negativní náboj stěny a zvyšuje její propustnost. Tím se buněčná stěna poškodí a vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS).⁷⁵

Dalším mechanismem spojeným s fyzikálními interakcemi je buněčné vstřebávání nanočástic, ke kterému dochází, když jsou nanočástice dostatečně malé, aby prošly buněčnou membránou. Mukha⁸⁰ et al. a Dong⁸¹ et al. prokázali, že narušení membrány a pronikání do buněk jsou příčinou antimikrobiálního účinku stříbrných nanočástic menších než 10 nm a dospěli k závěru, že menší nanočástice stříbra jsou účinnější díky své schopnosti procházet buněčnými membránami.

3.6.3.4 Inhibice tvorby a eliminace biofilmu

Přilnavost bakterií k povrchům je první fází tvorby biofilmů. Adhezní proteiny, bičíky a pohyb zprostředkovaný bičíky, které regulují počáteční přichycení bakterií k různým povrchům, jsou tedy terapeutickými cíli pro nanočástice. Uvolňováním iontů mohou některé kovové nanočástice snižovat přilnavost bakterií k povrchům, inhibovat enzymatickou aktivitu proteinů zapojených do syntézy peptidoglykanu a zpomalovat tvorbu biofilmů. Tvorba biofilmů je v případě nanočástic stříbra inhibována produkcí ROS a uvolňováním stříbra.

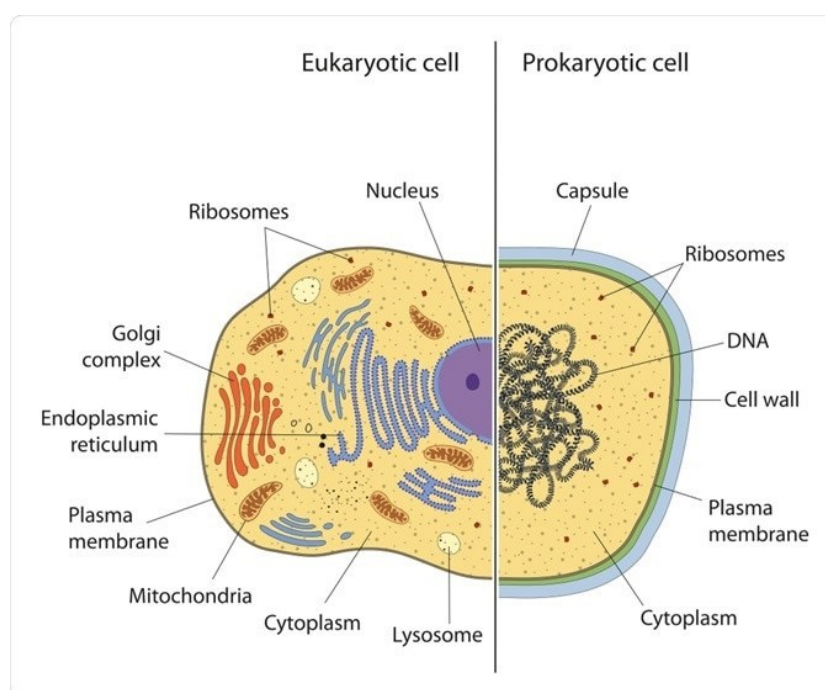
Podobně způsobují zlaté nanočástice mechanické poškození buněčných membrán prostřednictvím elektrostatických interakcí. Navíc uvolňování kovových iontů ze zlatých nanočástic může indukovat tvorbu ROS a poškozovat buněčnou strukturu a funkci a buněčné proteiny. Kromě adheze je dalším základním procesem quorum sensing (QS). QS je proces buněčné komunikace, který umožňuje bakteriím sdílet informace o hustotě buněk a podle toho upravovat genovou expresi. Několik studií ukázalo, že kovové nanočástice mohou narušit produkci QS molekul, zejména autoinduktorů (AI-2). Protože sekrece extracelulární polymerní látky (EPS) je pozitivně korelována s tvorbou biofilmů, inhibice EPS byla také považována za alternativní cíl pro omezení tvorby biofilmů patogenních bakterií. Například Ag a Au nanočástice inhibují produkci alginátu závisle na koncentraci. Alginát je základní složkou EPS matrix. Pomáhá bakteriím přichytit se k povrchům a chrání je před imunitní odpovědí hostitele, čímž je činí odolnými vůči antimikrobiálním látkám. Díky těmto antibiofilmovým vlastnostem jsou AgNPs a AuNPs považovány za velmi slibné pro léčbu multirezistentních bakteriálních infekcí a tvorby biofilmů.^{66,73,75,82}

Podle několika studií je základním mechanismem rozpadu biofilmů vazba Ag a Au nanočástic na extracelulární polysacharidovou matrix. Mechanismus spočívá v narušení peptidoglykanových struktur v bakteriální membráně, uvolňování kovových iontů a tvorbu ROS, což vede k oxidačnímu stresu a poškození DNA. Nanočástice mohou také narušovat kondenzaci cytoplazmatických membrán, metabolické dráhy bakterií a tvorbu extracelulárních polysacharidů, což způsobuje změny ve struktuře biofilmů a nakonec jejich odstranění.⁷⁵

Faktory ovlivňující antimikrobiální působení nanočástic zahrnují: velikost, tvar, povrchovou plochu, chemické vlastnosti, povrchovou chemii a interakce mezi nanočásticemi a proteiny nebo receptory, které způsobují akumulaci v buněčných membránách.⁸³

3.6.4 Bakterie a jejich stavba

Bakteriální buňky řadíme mezi prokaryota. Stavebně mají na rozdíl od eukaryot (kam řadíme rostlinné a živočišné buňky) jednodušší a méně složitou strukturu a vnitřní organizaci. Prokaryotní bakteriální buňka je haploidní a množí se jen nepohlavně. Mezi hlavní součásti bakteriální buňky patří buněčná stěna, cytoplasmatická membrána, cytoplasma s buněčným jádrem a ribosomy (Obrázek 29). Velikostně je buňka bakteriální oproti eukaryotním buňkám řádově menší a odpovídá svou velikostí přibližně velikosti chloroplastu či mitochondrie. (např. bakterie zlatého stafylokokka *Staphylococcus aureus* má tvar kuličky o průměru asi 1 μm a bakterie *Escherichia coli* má tvar tyčinky o délce 2 μm a tloušťce 1 μm).⁸⁴

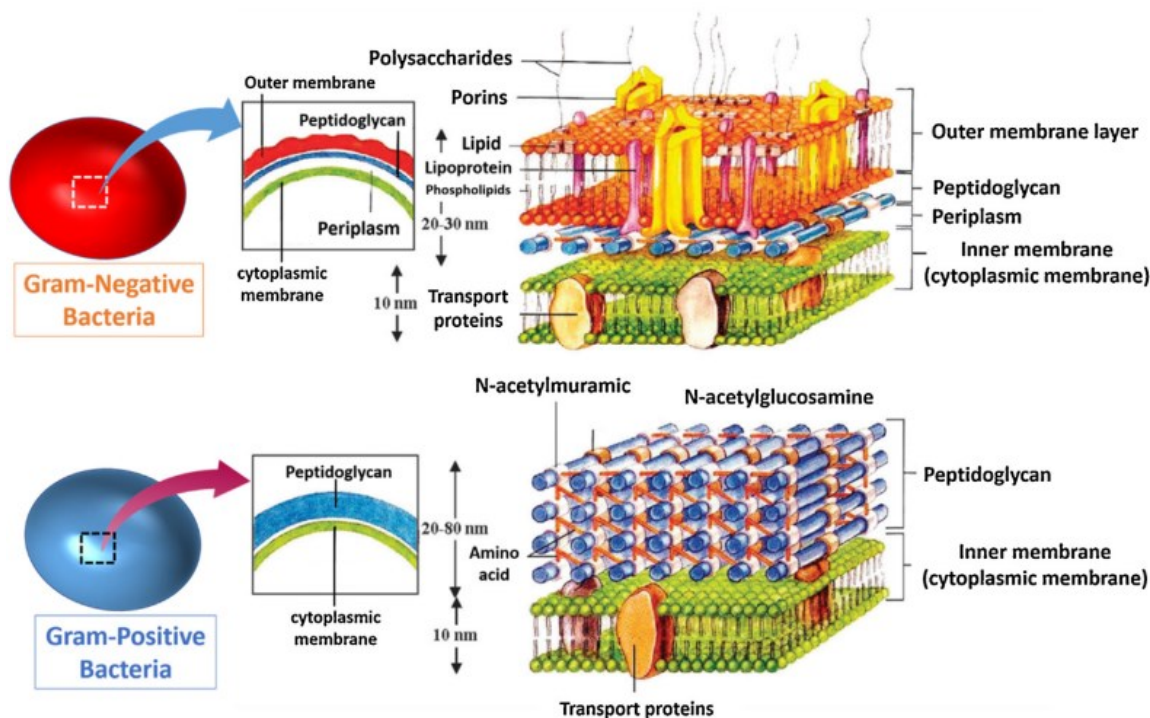


Obrázek 29: Porovnání eukaryotické a prokaryotické buňky.⁸⁵

Mezi hlavní charakteristiky bakteriální buňky patří organizace buněčného jádra (nukleoid), které u bakterií není od cytoplasmy odděleno jadernou membránou a je tvořeno jedinou do kruhu uzavřenou dvojšroubovicí DNA (bakteriálním chromozomem), která se nachází v tzv. nukleolární oblasti.⁸⁴

Architektura bakteriálních buněk je velice komplexní a různé povrchové oblasti plní pro buňku důležité funkce. Řadí se sem funkce mechanická, udržení tvaru buněk, permeabilita buněčných bariér, propustnost pro různé molekuly a v neposlední řadě sem patří i

mechanismy pro ochranu před působením antibiotik. Buněčné stěny hrají důležitou roli v mezibuněčném kontaktu, adherenci buněk, či invazi do hostitelské tkáně a také umožňují bakteriím uniknout imunitnímu systému hostitelského organismu (Obrázek 30).



Obrázek 30: Rozdílná stavba buněčné stěny gramnegativních a grampozitivních bakterií.⁶

Součástí buněčného povrchu jsou různé sacharidové struktury. Patří sem peptidoglykany, které jsou poměrně konzervativní strukturou většiny bakterií. V buněčných stěnách bakterií vznikají zesíťováním sacharidových polymerů, které obklopují plazmatickou membránu. Peptidoglykany jsou hlavní strukturální složkou buněčných stěn a mají zásadní význam pro udržení tvaru a pro ochranu bakterií před osmotickou lýzou. Štěpení vrstev peptidoglykanů způsobuje lýzu buněk. Struktura a syntéza peptidoglykanů je u bakterií poměrně neměnná, což je činí dobrým cílem pro antibakteriální látky. Klinicky relevantní antibiotika, která cílí na syntézu peptidoglykanů v buněčné stěně jsou např. penicilin a vankomycin.^{65,75,79,83}

Většinu bakterií lze rozdělit do dvou skupin podle struktury buněčné stěny bakteriálních buněk, bakterie pak označujeme jako G⁺ (Grampozitivní) a G⁻ (Gramnegativní).

Toto rozdělení má svůj původ v barvení, které provedl Hans Christian Gram (dánský lékař) v roce 1884 a je založeno na schopnosti některých bakteriálních buněk zadržet při procesu barvení krystalovou violet, pak se jedná o bakterie grampozitivní G⁺ (barví se fialově), gramnegativní bakterie tuto schopnost nemají (po dobarvení jsou červené).⁸⁶

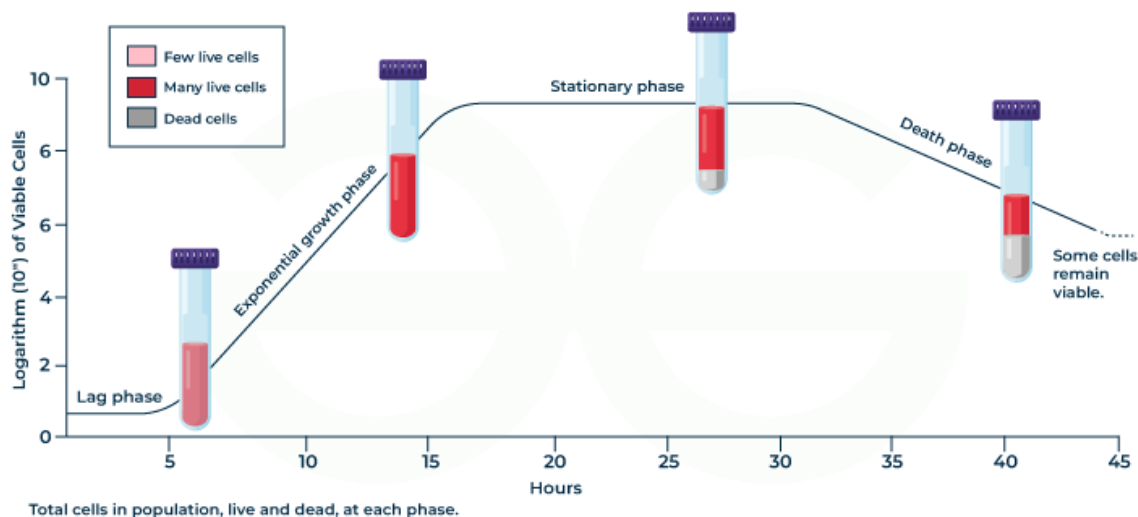
G⁺ bakterie mají jednodušší skladbu buněčné stěny, která je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanů (může dosahovat tloušťky až 80 nm) s navázanou teichoovou a lipoteichoovou kyselinou.⁸⁴

G⁻ buněčná stěna je strukturně i chemicky složitější. U gramnegativních bakterií obsahuje buněčná stěna jen tenkou vrstvu peptidoglykanů (do 10 nm) v periplasmatickém prostoru obklopeném vnější a vnitřní fosfolipidovou membránou.⁸⁴

3.6.4.1 Růst bakterií

Bakteriální buňka potřebuje pro svůj růst vhodné chemické i fyzikální podmínky. Během růstu bakteriální buňka přijímá z okolí energii a živiny a podle svého genetického programu, který je modulovaný aktuálními podmínkami prostředí, syntetizuje všechny komponenty svého těla, zvětšuje svůj objem a hmotnost. Po dosažení určité velikosti se příčně rozdělí na dvě buňky, které dále rostou stejným způsobem jako buňka dceřiná. Dobu mezi dvěma děleními označujeme jako dobu generační. Charakteristická doba potřebná pro zdvojení hmotnosti biomasy rostoucích organismů je pro bakterie 1/2 hodiny, kvasinky 2 hodiny, řasy 20 hodin.⁸⁴

Když se populace bakterií dostane do kontaktu s prostředím bohatým na živiny, které podporuje jejich růst, buňky se musí přizpůsobit novým podmínkám. Tato první fáze růstu se nazývá lag fáze, což je období pomalého růstu s vysokou biosyntetickou aktivitou, během kterého se produkují proteiny potřebné pro rychlý růst. Druhou fází je logaritmická fáze růstu, známá také jako log fáze nebo exponenciální fáze. Tato fáze se vyznačuje rychlým exponenciálním růstem. Během log fáze jsou živiny metabolizovány maximální rychlostí, dokud se jedna z živin nevyčerpá, což omezuje další růst. Třetí růstovou fází je stacionární fáze, která nastává v důsledku vyčerpání živin. Buňky snižují svou metabolickou aktivitu a spotřebovávají neesenciální buněčné proteiny. Poslední fází je fáze odumírání, kdy počet odumřelých buněk převyšuje počet nově vzniklých buněk.⁸⁷



Obrázek 31: *Růstová křivka bakteriální populace.*⁸⁷

3.6.5 Testované mikroorganismy

3.6.5.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je Gram-pozitivní kok, který se vyskytuje v nepravidelných hloučcích. Netvoří spory ani pouzdra a má malou náročnost na kultivační prostředí. Roste v pigmentovaných koloniích na pevných půdách a je fakultativně anaerobní. Stafylokokové infekce jsou časté, zejména kožní hnisavé procesy, jako jsou furunkuly a karbunkuly. Klinicky je významný také v kontextu nosokomiálních infekcí, kde může způsobit závažné infekce krevního řečiště, septický šok, pneumonii či endokarditidu.⁸⁴

3.6.5.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli je Gram-negativní, chemoorganotrofní, fakultativně anaerobní bakterie s aerobním a fermentativním metabolismem. Buňky jsou tyčkovité, pohybují se bičíky a rostou na běžných kultivačních půdách. Jsou tolerantní k teplotám 10–49 °C s optimem 37 °C. Optimální pH pro růst je 6–8. *E. coli* je typickým představitelem střevní flóry obratlovců a může být patogenem způsobujícím různé záněty, jako jsou záněty močových cest, apendicitida a peritonitida. Některé toxigenní kmeny mohou způsobovat závažné infekce. Je důležitým modelovým organismem v genetice a mikrobiologii a významným nástrojem v biotechnologiích.⁸⁴

3.6.5.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (pivní kvasinka) je kvasinka používaná v pekařství a pivovarnictví. Je jedním z nejvíce studovaných eukaryotních organismů v molekulární a buněčné biologii. Buňky jsou oválné až kulovité, velké 5-10 µm, a rozmnožují se pučením. Pivní kvasinka je modelový organismus, snadno kultivovatelný a podobný rostlinám a živočichům. Byla prvním osekvenovaným eukaryotním organismem a sdílí s člověkem asi 23 % genomu. Klinicky je významná zejména v kontextu infekcí u imunokompromitovaných pacientů, kde může způsobit fungemii a další invazivní infekce.^{88,89}

3.6.5.4 *Candida albicans*

Candida albicans je polymorfní houba, která může růst ve třech různých morfologických formách: jako kvasinka, pseudohyfa a pravá hyfa. Buňky jsou malé, oválné, měří 2-4 µm v průměru a v kvasinkové formě se rozmnožují pučením. Buněčná stěna obsahuje polysacharidy, jako jsou glukany a chitin, a proteiny, které hrají důležitou roli v adhezii k hostitelským buňkám a v imunitní odpovědi hostitele. Povrchové proteiny, zvané adheziny, umožňují přilnutí k hostitelským buňkám a tvorbu biofilmů, které poskytují ochranu před imunitním systémem a antimikrobiálními látkami.^{90,91}

Candida albicans roste na různých kultivačních médiích, jako je Sabouraudův dextrosový agar a maltový agar, kde tvoří krémově bílé kolonie. Optimálně roste při teplotách 25-37 °C a při neutrálním až mírně kyselém pH. Klinicky je významná zejména u imunokompromitovaných jedinců, kde může způsobit závažné infekce, jako je kandidémie, vulvovaginální kandidóza a orofaryngeální kandidóza. Je schopna tvořit biofilmy na lékařských zařízeních, což zvyšuje její odolnost vůči léčbě. Klinicky významné jsou také její schopnosti adheze, invaze a tvorby hyf, které přispívají k její patogenitě.⁹⁰⁻⁹²

3.6.6 Metody testování antibakteriálních účinků

Metody testování antimikrobiálních účinků lze rozdělit na metody kvalitativní a kvantitativní, agarové a bujónové.

3.6.6.1 Difúzní disková metoda

Jednou z nejčastěji používaných kvalitativních metod testování citlivosti je diskový difúzní test. Tato relativně jednoduchá metoda je založena na difúzi antimikrobiální látky z

disku do agarové půdy, což vytváří koncentrační gradient látky, která inhibuje růst mikroorganismů. Bakteriální suspenze s vhodnou koncentrací bakteriálních buněk očkujeme na agarovou plotnu. Poté se na plotnu umístí papírové testovací disky (obvykle o průměru cca 6 mm) s účinnou koncentrací látky a miska se inkubuje, obvykle po dobu 24 hodin při 37 °C. Během inkubace se vytvoří tzv. zóna inhibice růstu, jejíž průměr se měří a porovnává s hodnotami zjištěnými pro citlivé kmeny. Velikost inhibiční zóny je také ovlivněna (kromě citlivosti dané bakterie k dané látce) množstvím účinné látky v disku, složením kultivační půdy, výškou agarové vrstvy, rychlostí difúze účinné látky v agarovém gelu a kvantitou očkovaného inokula. Kmen se hodnotí jako citlivý nebo rezistentní, případně hraničně citlivý. V praxi se pro vyjádření inhibiční citlivosti stanoví určitá šířka minimální inhibiční zóny v milimetrech, za dodržení přesných podmínek, tzn. kvality agaru, pH, koncentrace iontů.^{70,93,94}

Testování agarový diskovým difúzním testem se datuje od roku 1940. Je oficiální metodou používanou v mnoha klinických mikrobiologických laboratořích pro rutinní testování antimikrobiální citlivosti. Ačkoli touto metodou nelze přesně testovat všechny náročné bakterie, byla standardizována i pro testování určitých náročných bakteriálních patogenů, jako jsou streptokoky, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Neisseria meningitidis*.s použitím specifických kultivačních médií, různých inkubačních podmínek a interpretačních kritérií pro zóny inhibice.⁹⁴

3.6.6.2 Diluční metody

Mezi kvantitativní metody stanovení citlivosti patří agarová diluční metoda a diluční metody v tekutém bujónovém médiu. Tyto metody se v praxi využívají hlavně k určení účinnosti antibiotik a umožňují zjistit hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) a minimálních baktericidních koncentrací (MBC).⁹⁴⁻⁹⁶

U agarové diluční metody se hodnota MIC zjišťuje na agarovém médiu obsahujícím zvolenou koncentraci antibiotika (ATB). Připravuje se až 15 koncentrací jednoho ATB a inokuluje se bakteriální suspenze o odpovídající hustotě bakteriálních buněk podle McFarlandovy zákalové stupnice. Po inkubaci se vyhodnocuje nejnižší koncentrace ATB, která inhibovala růst testovaného kmene. Agarová diluční metoda je považována za referenční metodu. Její výhodou je možnost vyšetřit velké množství bakterií za stejných podmínek a snadno odhalit kontaminaci suspenze.⁹⁷ Je však poměrně pracná a ekonomicky náročná, což omezuje její použití v běžné praxi.⁹⁸

Z kvantitativních technik se nejčastěji používá mikrodiluční metoda, která se provádí v mikrotitrační destičce obsahující Mueller-Hintonův bujón (MHB). V každé jamce je daná koncentrace ATB a inokulum o odpovídající hustotě bakteriálních buněk podle McFarlanda se nanáší jehlovým inokulátorem nebo multikanálovou pipetou. Po inkubaci se vyhodnocuje hodnota MIC odečtením na spektrofotometru a dle zákalu se vyhodnocuje nejnižší koncentrace ATB, která inhibuje růst mikroorganismu. Inhibice růstu se projeví tím, že v jamce nedojde ke vzniku zákalu nebo sedimentu.⁹⁴

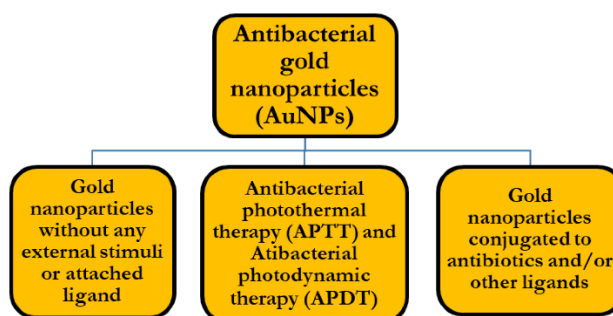
V případě použití nanočástic má tato metoda svoje omezení. Je známo, že zbytky mrtvých buněk, vláknitý růst, či únik fluorescenčních proteinů mohou ovlivnit absorbanci a odhad buněčné hustoty vzorku.⁹⁴ Chung et al.⁹⁹ popisují případ, kdy *Candida albicans* nevykazovala žádný růst při spektrofotometrickém vyhodnocení v případě, že byly buňky hub vystaveny nanočásticím v koncentracích 31,3 µg/ml a 15,6 µg/ml, přestože hodnota MIC byla 62,5 µg/ml. Demonstrují tím fakt, že spektrometrie měří pouze optickou hustotu a nezohledňuje životaschopné buňky hub v mateřské kultuře. Nanočástice tedy mohly inhibovat růst, takže se buňky nemnožily a neměnily optickou hustotu, ale mateřské kultury zůstaly životaschopné. V případě použití barviva resazurinu byly tyto buňky viabilní. Dalším omezením této metody je, že suspenze mrtvých buněk a/nebo nanočástic se mohou při vysokých koncentracích shlukovat a ovlivňovat měření optické hustoty.

Dále autoři popisují nanočástice AgCu, které podléhaly během testování aglomeraci a ovlivňovaly absorbanci. Pan et al.¹⁰⁰ uvedli, že spektrometrie byla nejméně spolehlivou metodou z těch, které testovali pro kvantifikaci bakteriálních buněk v přítomnosti nanočástic oxidu kovu. Například Loo et al.¹⁰¹ použili roztok resazurinu k indikaci bakteriálního růstu při zkoumání minimální inhibiční koncentrace, Ruparelia¹⁰² et al. použili spektrometrické vyhodnocení k měření bakteriálního růstu měřením nárůstu absorbance k určení MIC. Ačkoli obě práce testovaly antibakteriální účinek stříbrných nanočástic o průměrech 4,06 nm a 3 nm na *Escherichia coli*, hodnota MIC se lišila od 7,8 µg/ml do 180 µg/ml.

Vhodnou modifikací se jeví „time kill“ test, jde o metodu, kdy se inkubuje testovaný vzorek s kulturou bakterií o určité densitě inokula v časových intervalech se vyočkovává na sterilní půdu a počítají se narostlé kolonie po 24 hodinách inkubace. Tato metoda je velice vhodnou metodou pro stanovení baktericidního nebo fungicidního účinku. Je to robustní metoda pro získání informací o dynamické interakci mezi antimikrobiální látkou a mikrobiálním kmenem. Test odhaluje časově závislý nebo koncentrací závislý antimikrobiální účinek testované látky.⁹⁴

3.7 Nanočástice zlata

Zlaté nanočástice mají vynikající optické a plasmonové vlastnosti a jejich velký potenciál spočívá v možnosti snadné funkcionalizace jejich povrchu různými ligandy. Funkcionalizované zlaté nanočástice nacházejí uplatnění v biologické detekci, senzorech a dokonce i v klinické léčbě. Pro využití jejich antibakteriálního potenciálu lze volit z několika přístupů (Obrázek 32).^{12,71,72}



Obrázek 32: *Různé přístupy modifikace zlatých nanočástic v použití jako antimikrobiálních agens.*¹⁰³

3.7.1 Příprava nanočástic zlata

Jednou z nejčastěji používaných metod syntézy koloidních nanočástic zlata je chemická redukce z kovového prekursoru, redukčního činidla a stabilizátoru. Známa je Turkevichova metoda redukce zlatité kyseliny citronanem sodným.^{27,28} Dalšími přístupy jsou biologické („zelené“) metody syntézy, kdy se k syntéze používají mikroorganismy, rostlinné extrakty nebo intracelulární či extracelulární extrakty hub či bakterií^{43,49,103}. V posledním desetiletí byly snadno syntetizovány nanočástice zlata v různých morfologiích, jako jsou koule, tyčinky, hvězdice a nanokapsle, přístupem zdola nahoru, a to úpravou výchozích složek a koncentrací reagentů.¹⁰³

3.7.2 Biologické aplikace a antimikrobiální účinky nanočástic zlata

Předností zlatých nanočástic je jejich syntetická univerzálnost, která umožňuje ladit jejich velikost, tvar a povrchové vlastnosti. Kromě toho lze modifikovat jejich povrch tak, aby se dala řídit jejich rozpustnost, stabilita a interakce s okolním prostředím. Na povrch

nanočástic je možné vázat thioly, aminy a fosfíny které mají vysokou afinitu k jejich povrchu. Tím se otevírá i prostor pro značení, cílení a konjugaci farmakologických molekul. Díky svým jedinečným vlastnostem jsou zlaté nanočástice mimořádně zajímavým materiálem v medicíně. Mezi jejich hlavní oblasti použití patří biosenzory a biozobrazování, nanosystémy pro aplikaci léčiv a také léčba některých druhů tumorů. Nanočástice zlata nabízejí i potenciální antibakteriální aktivitu, ačkoliv se uvádí, že jde o nanočástice s nižší antibakteriální aktivitou, než vykazují např. stříbrné nanočástice, má se za to, že jde o materiál méně toxický pro savčí buňky oproti stříbrným nanočásticím. Antimikrobiální aktivity lze také dosáhnout konjugací zlatých nanočástic s protilátkami a různými antimikrobiálními látkami. Zlaté nanočástice konjugované s antibiotiky vykazují silnou antimikrobiální aktivitu proti různým bakteriím a kmenům rezistentním na antibiotika.^{2,49,72,103}

Uvádí se, že mechanismus antibakteriálního účinku nanočástic závisí také na jejich velikosti. Menší nanočástice působí tak, že při své translokaci přes bakteriální buněčnou membránu vytvářejí velké ireverzibilní póry¹⁰⁴. V případě větších nanočástic v rozmezí velikostí 80-100 nm se sice nanočástice nejsou schopny volně přemísťovat přes bakteriální membránu. přesto několik studií popisuje jejich schopnost ničit bakterie.^{74,105,106}

Farmakologicky jsou nanočástice zlata zajímavé i tím, že vykazují antiangiogenní, anti-HIV, antimalarické, antimikrobiální a antiartritické účinky.^{9,12}

Zlaté nanočástic vykazují svou antimikrobiální aktivitu proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *Serratia sp.*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis* a *E. faecalis*). Relativní inertnost zlatých nanočástic znamená, že nevykazují žádnou zjevnou vnitřní antibakteriální aktivitu. Hlavní mechanismus jejich bakteriální toxicity spočívá v jejich přímé adhezi na bakteriální povrch, zprostředkovaný elektrostatickými silami. Tento mechanismus je vysoce závislý na velikosti nanočástic, přičemž menší nanočástice vykazují nižší MIC. Adheze nanočástic způsobuje změny membránového potenciálu, inhibici aktivity adenosintrifosfatázy (ATPázy) (vedoucí k inhibici syntézy ATP) a inhibici vazby tRNA v podjednotce ribozomu. Tyto změny blokují klíčové metabolické procesy, což vede ke ztrátě buněčné integrity.⁷⁵

Vzhledem k jejich nízké reaktivitě vykazují nanočástice zlata uvolňování iontů a produkci ROS jako vedlejší mechanismus účinku. Proto je k dosažení stejného antibakteriálního působení jako vykazují např. nanočástice stříbra dosáhnout vyšších koncentrací.

3.7.3 Toxicita nanočástic zlata

Přestože se lze často setkat s názorem, že jsou zlaté nanočástice netoxické, je tento mainstreamový názor poněkud sporný a přetrvávají určité pochybnosti o jejich potenciální toxicitě. Potenciální toxicita nanočástic *in vitro* a *in vivo* se zdá být mnohostranná a obtížně předvídatelná. Někteří autoři zkoumali *in vitro* toxicitu zlatých nanočástic a zjistili, že indukují tvorbu endogenních ROS po vstupu do buněk a následně vedou k další cytotoxicitě související s oxidačním stresem, jako je poškození DNA, buněčná smrt a následně zástava buněčného cyklu. Jako příklad testu viability buněk *in vitro*, nanočástice zlata o velikosti 15–20 nm snižují životaschopnost buněk ze 100 % při koncentraci 0,1 ppm na méně než 40 % při koncentraci 10 ppm, což ukazuje jejich potenciální toxicitu.¹⁰⁷ Na druhou stranu některé výzkumy uvádějí, že nanočástice zlata nejsou toxické při testování různých buněčných linií, s nanočásticemi různých tvarů a funkcionalit.¹⁰⁸

Toxicita *in vivo* byla studována na některých zvířecích modelech, jako jsou myši, krysy, krevety, hlemýždi, škeble a prasata, přičemž byly hodnoceny různé tvary nanočástic, povrchové skupiny a dávky. Získané výsledky neuváděly vedlejší účinky ani smrtelnou toxicitu. Většina studií však uvádí vyšší bioakumulaci v játrech a několik autorů pozorovalo akumulaci v jiných orgánech, jako jsou plíce, mozek, srdce a ledviny. Mechanismus toxicity ani dávky však dosud nebyly popsány.⁷²

3.8 Nanočástice stříbra

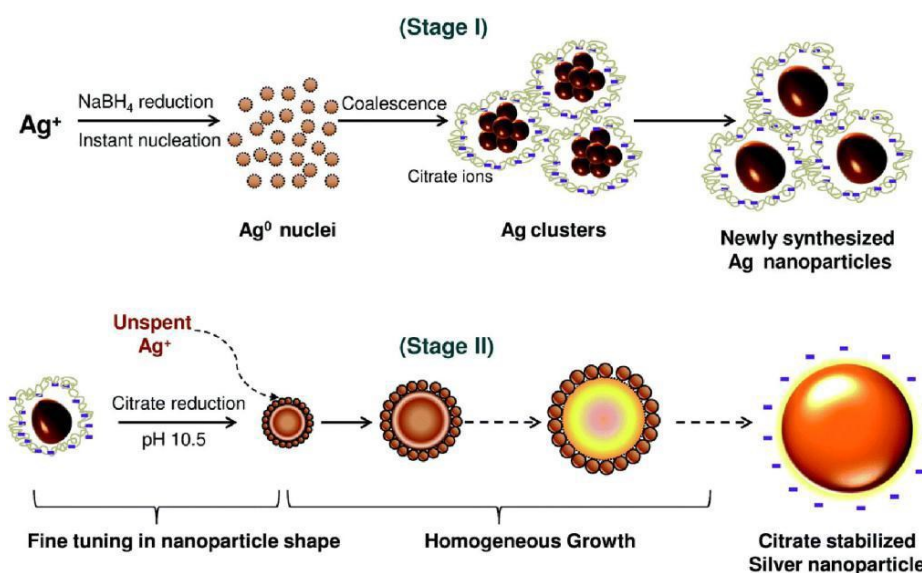
Příprava nanočástic stříbra chemickou cestou je úsporný a nejčastěji používaný proces pro přípravu koloidních disperzí nanočástic stříbra. Syntézy lze realizovat jak ve vodném prostředí, tak i v organických rozpouštědlech.^{39,42,109} Mezi cesty syntézy řadíme chemickou redukci, mikrovlnami asistovanou syntézu, fotoredukci, elektrochemickou redukci a další.⁴²

Chemická redukce je relativně jednoduchý, vysoce výnosný a nákladově efektivní proces, při kterém dochází k chemické redukci stříbrné soli za vzniku koloidní suspenze. Tato strategie vyžaduje stříbrnou sůl, redukční činidlo a stabilizační/uzavírací činidlo. Dusičnan stříbrný je nejčastěji používaným prekurzorem stříbrné soli. Typickými redukčními činidly pro redukci stříbrných iontů jsou tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4), kyselina askorbová, glukóza, hydrazin, citronan sodný a další.^{25,26,110,111}

3.8.1 Příprava nanočástic stříbra

Tvorba koloidních roztoků redukcí stříbrné soli obecně probíhá ve dvou fázích - nukleace a následný růst. Fáze nukleace zahrnuje redukci Ag^+ na atomy Ag^0 a následnou agregaci atomů Ag^0 za vzniku klastrů $(\text{Ag}^0)_n$ podle reakcí: $n\text{Ag}^+ \rightarrow n\text{Ag}^0 \rightarrow (\text{Ag}^0)_n$, nebo prostřednictvím postupného redukčního mechanismu: $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0 \rightarrow \text{Ag}_2^+ \rightarrow \text{Ag}_4^+ \rightarrow \dots \rightarrow (\text{Ag}^0)_n$. Když je dosaženo kritické velikosti, jádra nanočástic rostou odpovídajícím způsobem.¹⁰⁹ Tyto fáze lze ovlivnit sledováním reakčních podmínek, jako je pH, teplota a zvolená redukční činidla a stabilizátory. Modifikací podmínek syntézy lze kontrolovat tvar, velikost a distribuci velikostí připravovaných nanočástic.^{110,112}

Například citronan sodný je slabým redukčním činidlem vedoucím k tvorbě polydisperzních nanočástic stříbra. Citrátem povrchově modifikované stříbrné nanočástice vykazují záporný povrchový náboj díky přítomné karboxylové skupině citrátu. To vede k elektrostatickému odpuzování mezi nanočásticemi a zabraňuje jejich aglomeraci. Agnihotri et al.¹¹² uvádějí, že velikost vznikajících nanočástic lze kontrolovat použitím ko-redukčního přístupu, tj. NaBH_4 působí jako primární redukční činidlo, zatímco citrátový anion působí jako sekundární redukční a stabilizační činidlo (Obrázek 33).



Obrázek 33: Schema dvoustupňové syntézy nanočástic stříbra s využitím redukčního činidla NaBH_4 a koredukčního a stabilizačního činidla citronanu sodného.¹¹³

Pro malé nanočástice je žádoucí nadbytek silného redukčního činidla, který usnadňuje okamžitou tvorbu jader, což vede k tvorbě monodisperzních a rovnoměrně velkých stříbrných koloidů.¹¹²

Je obecně známo, že příprava diskretních stříbrných nanočástic s dobře definovaným tvarem a dobře kontrolovanými rozměry je obtížnější než příprava zlatých nanočástic kvůli vyšší reaktivitě stříbrných sloučenin. S výhodou lze využít Tollensův způsob založený na redukci stříbrné soli, resp. jejího amminokomplexu vhodným redukovadlem ze skupiny redukujících monosacharidů jako je např. glukosa. K při redukci se uplatňuje aldehydická skupina sacharidu. Reakce probíhá dle rovnice (10).^{25,26}



Při syntéze nanočástic hraje koncentrace amoniaku a povaha redukčního činidla důležitou roli při kontrole velikosti a morfologie stříbrných nanočástic. Bylo zjištěno, že nejmenší částice se tvoří při nejnižší koncentraci amoniaku. Glukóza a nejnižší koncentrace amoniaku (5 mol.dm⁻³) vedly k nejmenší průměrné velikosti částic 57 nm s intenzivním maximem povrchové plasmonové absorpce při 420 nm. Zvýšení koncentrace NH₃ z 0,005 mmol.dm⁻³ na 0,2 mmol.dm⁻³ vede k současnému zvýšení velikosti částic a polydisperzity.⁴²

3.8.2 Biologické aplikace a antimikrobiální účinky nanočástic stříbra

Antibakteriální vlastnosti stříbra jsou známy již od starověku. Stříbro se používalo k ošetření popáleninových ran, ošetřování zubů, k výrobě katetrů a k léčbě bakteriálních infekcí, a to ve formě kovového stříbra, dusičnanu stříbrného či sulfadiazinu stříbrného. Používání stříbra k léčbě bakteriálních infekcí se stalo nepopulárním po zavedení penicilinu ve 40. letech 20. století. Výskyt bakterií rezistentních vůči antibiotikům a omezená účinnost antibiotik oživily klinické používání stříbra (např. speciální krytí na rány). Z mnoha různých typů kovových a kovově oxidových nanočástic se stříbrné nanočástice ukázaly jako nejúčinnější proti bakteriím, virům a dalším eukaryotickým mikroorganismům.^{65,67,110,110}

Stříbrné nanočástice poškozují dýchací řetězec a buněčné dělení, které nakonec vedou k buněčné smrti, a současně uvolňují ionty stříbra, které zvyšují baktericidní aktivitu. Antimikrobiální aktivita stříbrných nanočástic je nepřímá závislá na jejich velikosti a tvaru.^{65,110,111} Kombinované použití stříbrných nanočástic s antibiotiky, jako je penicilin G,

amoxicilin, erytromycin a vankomycin, vedlo ke zvýšení a synergickému antimikrobiálnímu účinku proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím (např. *E. coli* a *S. aureus*)^{65,114}. Různorodé aplikace obsahující stříbrné nanočástice zahrnují obvazy na rány, povlaky na zdravotnické prostředky a chirurgické masky, impregnované textilie, nanogely a nanolátky.⁶⁵

Při podrobném zkoumání antimikrobiální aktivity stříbrných nanočástic byly identifikovány faktory ovlivňující jejich antibakteriální aktivitu, jako jsou náboj, velikost a povrch částic. Výrazný nárůst antimikrobiálního účinku byl zaznamenán při velikostech stříbrných nanočástic menších než 10 nm, přičemž se zmenšoval z 10 na 7 a na 5 nm. Menší částice měly lepší antimikrobiální účinek než větší, zejména když velikost stříbrných částic byla menší než 10 nm.⁷¹ Kromě velikosti ovlivňuje antimikrobiální aktivitu nanočástic také jejich tvar a specifická povrchová plocha a s tím spojená rychlost rozpouštění. Např. nanosheety s nejvyšší specifickou povrchovou plochou měly nejvyšší rychlost rozpouštění a vykazovaly nejvyšší úroveň bakteriální inhibice. To ukazuje, že antimikrobiální vlastnost různě tvarovaných nanočástic stříbra je způsobena hlavně Ag^+ ionty generovanými jejich povrchovým rozpouštěním, což je v souladu s uvedenou velikostní závislostí částic na antimikrobiálním působení. Navíc elektrostatická přitažlivost mezi negativně nabitými mikrobiálními buněčnými membránami a pozitivně nabitými stříbrnými nanočásticemi na povrchu může významně podporovat adhezi stříbrných nanočástic, což vede k tomu, že pozitivně nabitě stříbrné nanočástice mají vyšší antimikrobiální aktivitu než negativně nabitě nanočástice.^{5,65,83,102}

3.8.3 Toxicita nanočástic stříbra

Vliv na toxicitu nanočástic stříbra má řada faktorů včetně jejich velikosti, tvaru, koncentrace a povrchové plochy. Proto je přesné stanovení toxické limitní koncentrace nanočástic stříbra obtížně stanovitelné a závisí také na použité metodě.¹¹⁵

Navíc vlastnosti nanočástic ovlivňují faktory jako je způsob syntézy, cesta vstupu do lidského těla a postupy používané pro toxikologické hodnocení. Hlavní příčinou toxicity stříbrných nanočástic je jejich akumulace v buňkách a jejich lokalizace uvnitř buněk.¹¹⁶ Některé studie ukazují, že nízké koncentrace stříbra nejsou škodlivé pro lidské buňky.¹¹⁷ Ukazuje se, že i přesto mají stříbrné nanočástice vyšší potenciál toxicity než samotné Ag^+ ionty.^{75,81} Dále je třeba říci, že adsorpce proteinů na povrchu nanočástic může stabilizovat nanočástice a blokovat jejich rozpouštění a znemožňuje tvorbu nových rozpustných forem stříbra. Místo toho stabilní stříbrné nanočástice podléhají přímé komplexaci na částice sulfidu

stříbrného, které se hromadí ve tkáních. Aktivace metallothioneinů v játrech může být také důvodem akumulace stříbrných nanočástic v tomto orgánu. Tyto malé proteiny, které se váží v různé velikosti 7 kDa, mají vysoký počet thiolových skupin, které se podílejí na detoxikaci těžkých kovů v játrech, ale také v dalších orgánech, jako jsou ledviny, střevo a mozek.

Eliminace stříbrných nanočástic je pomalá. Podíl stříbrných nanočástic vylučovaný ledvinami je zanedbatelný, je nižší než 0,01 %, zatímco biliární exkrece je hlavní cestou vylučování stříbra, která je zodpovědná za více než 50 %. Tato cesta zahrnuje komplexaci stříbra s glutathionem (GSH) za vzniku komplexů stříbro-GSH. Eliminace se však bude řídit tkání, kde se nanočástice nacházejí, a také dávkou a velikostí částic. Stříbrné nanočástice mají poločas eliminace, který se může lišit v řádu od 29 dnů do více než 260 dnů po perorálním podání.^{71,72}

Stříbrné nanočástice vykazují jak prospěšné, tak škodlivé účinky, což z nich činí dvousečnou zbraň. Jsou schopny eliminovat bakterie, avšak mohou působit cytotoxicky. Vzhledem k jejich širokému využití v různých spotřebitelských a zdravotnických produktech rostou obavy veřejnosti ohledně potenciálních zdravotních rizik spojených s jejich používáním. Rozsáhlé aplikace a produkce stříbrných nanočástic s sebou nesou riziko jejich zvýšeného uvolňování do vodních ekosystémů, jako jsou řeky a jezera. Například z antimikrobiálních textilií se mohou nanočástice uvolňovat do vody během praní, což vede ke kontaminaci podzemních vod. Po vstupu do sladkovodního prostředí dochází k jejich oxidaci na ionty Ag^+ , které jsou toxické pro vodní organismy. Iontové stříbro se dále imobilizuje ve formě málo rozpustných solí, jako jsou AgCl nebo Ag_2S . Nanočástice se však mohou akumulovat ve vodních organismech a následně vstupovat do lidského těla prostřednictvím potravního řetězce. Je třeba konstatovat, že o dlouhodobé bezpečnosti a toxických účincích ve vodním prostředí je stále známo velmi málo.^{72,111}

3.9 Nanočástice mědi

Měď má dlouhou historii antimikrobiálních aplikací a její sloučeniny se hojně a široce používají jako antitykotika v zemědělství, zejména na hroznech a bramborách. Ve srovnání s materiály na bázi stříbra nebo zlata je cena mědi mnohem nižší, materiály na bázi mědi jsou snadněji dostupné a nanočástice na bázi mědi lze syntetizovat ekologicky šetrným způsobem s dobře tolerovanou biokompatibilitou. Nanočástice mědi mají oproti jiným kovovým nanočásticím své přirozené výhody; jsou levnější a snadněji dostupné. Z kovových

nanočástic mědi se uvolňují ionty rychleji než z nanočástic na bázi ušlechtilých kovů, což poskytuje vyšší účinnost, pokud jde o aktivitu měďnatých iontů při tvorbě ROS.^{71,118}

3.9.1 Příprava nanočástic mědi

Nanočástice mědi lze připravit redukcí vhodné měďnaté soli. Někteří autoři využívají různá redukční činidla včetně kyseliny askorbové²⁹. Jiní autoři využívají redukce amoniakálního komplexu měďnatých iontů pomocí tetrahydridoboritanu sodného a stabilizací škrobem.¹¹⁹ Nanočástice mědi jsou náchylné k oxidaci a proto jsou k jejich syntéze využívána i různá stabilizační činidla.^{118,120–122}

3.9.2 Biologické aplikace a antimikrobiální účinky nanočástic mědi

Měď je také nezbytným prvkem pro buněčné signální dráhy a biomolekulární procesy. Řízeně uvolněné měďnaté ionty z nanočástic mohou posílit určité buněčné procesy, včetně protizánětlivé regulace, imunitní odpovědi nebo podpořit regeneraci tkání.^{71,75}

Vzhledem ke zvláštním vlastnostem nanočástic mědi se jim věnuje stále větší pozornost v biomedicínských aplikacích, zejména s využitím jejich antibakteriálních vlastností. Mechanismy antibakteriálního působení nebyly dosud plně objasněny; pro antibakteriální účinnost jsou důležité nejen chemické vlastnosti a koncentrace nanočástic, ale rozhodující jsou i fyzikální vlastnosti, včetně tvaru, velikosti, poměru povrchu k objemu a povrchového náboje⁷⁹. Hlavním předmětem výzkumu antibakteriálního mechanismu nanočástic na bázi kovů je tvorba ROS, které způsobují oxidační stres v bakteriální buňce, což následně vede ke ztrátě fyziologické funkce a integrity buněčné membrány a k buněčné smrti^{79,83}. Studií o tvorbě ROS, integračních interakcích mezi částicí a bakteriální buňkou a molekulárním mechanismem způsobeným nanočásticemi mědi je však poměrně málo.⁷¹

Meng-Jiun Lai at al.¹²³ zkoumali antimikrobiální účinek různých velikostí nanočástic mědi, dle jejich výsledků se ukazuje, že ROS a poškození genomové DNA vyvolané nanočásticemi mědi byly ovlivněny velikostí a koncentrací a během interakce mezi nanočásticemi a bakteriemi *Escherichia coli* docházelo k uplatnění více mechanismů antibakteriálního působení současně.

Měděné nanočástice vykazovaly vysokou antibakteriální účinnost vůči celé řadě patogenů jak proti houbám (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*,

Candida krusei), tak gramnegativním bakteriím (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) a grampozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*). Pozoruhodné je, že MIC nanočástic u většiny testovaných mikroorganismů byly 4krát nižší než ve srovnání s CuSO₄.⁷¹

3.9.3 Toxicita nanočástic mědi

Měď je potřebná pro správné fungování mnoha fyziologických procesů v těle, avšak při překročení prahové dávky se mohou projevit její toxické účinky na organismus,

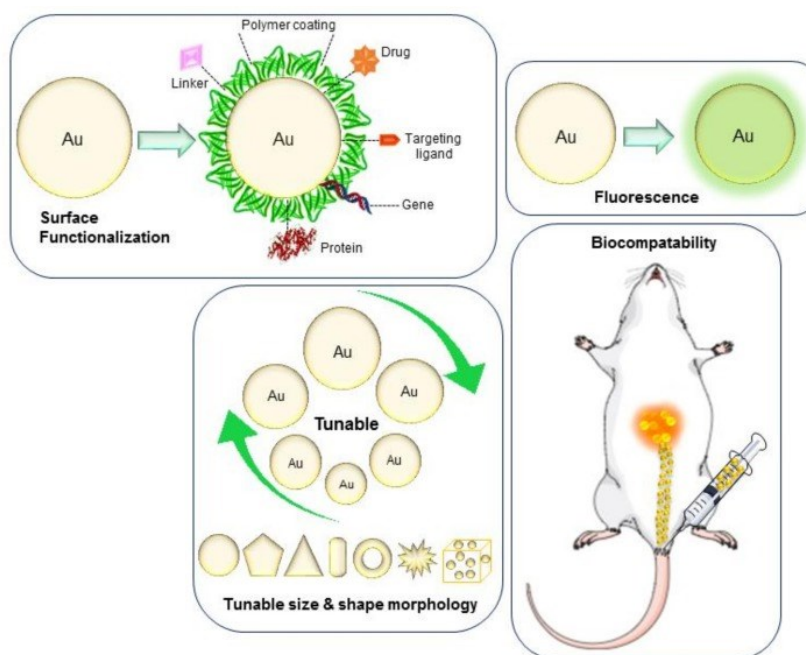
Tuto skutečnost je třeba brát v úvahu při navrhování nanomateriálů na bázi nanočástic mědi pro biomedicínské aplikace. Proto se volí syntetické strategie, které minimalizují toxicitu nanočástic mědi. V experimentech vyvolávaly nanočástice mědi oxidační stres nejen u patogenů, ale také u savčích buněk, např. zvýšily hladinu kaspázy 3 a snížily expresi apelinového receptoru v myší děloze a vedly k apoptóze buněk.¹²⁴

Toxicitu nanočástic mědi lze snížit úpravou povrchových ligandů, které interagují s proteiny prostředí a vytvářejí proteinovou korónu a ovlivňují jejich internalizaci buňkami, rozpoznávání imunitním systémem a nakonec i metabolismus a přetrvávání v organismu. Taková modifikace má nevýhodu ve složitější kinetice v tělesném systému a tedy i složité převádění z laboratorního modelu do praktického použití.^{125,126}

3.10 Cílený transport zlatých nanočástic do osteosarkomových buněk pro potenciální využití v radioterapii a cílené léčbě nádorů.

Rozvoj nanotechnologií a jejich potenciální využití v lékařských vědách souvisí se současným vývojem nanočástic a nanomateriálů z různých kovů, jako je např. zlato, stříbro, měď, kobalt, platina a další. Vhodnými úpravami těchto nanočástic lze měnit jejich fyzikální, chemické a biologické vlastnosti. Díky tomu se nabízí jejich využití v různých medicínských oblastech – diagnostika chorob, zobrazovací metody, transport léčiv a cílená léčba.^{127,128}

Mezi různými organickými a anorganickými nanočásticemi vynikají pro své výjimečné vlastnosti právě nanočástice zlata. Lze je připravit poměrně snadno chemickou cestou^{128,129} a nastavením podmínek přípravy můžeme získat nanočástice různých tvarů (kulové, tyčinky, aj.) a velikostí (jednotky až stovky nanometrů)¹³⁰. Zlaté nanočástice jsou netoxické a neimunogenní¹³¹. Mezi jejich přednosti patří např. vysoký poměr plochy povrchu k objemu nanočástic, existence jevu povrchové plasmonové rezonance, snadná modifikace jejich povrchu a funkcionalizace různými molekulami^{20,132} (Obrázek 34).



Obrázek 34: *Vlastnosti nanočástic – variabilita velikostí a tvarů, funkcionalizace povrchu nanočástic, optické vlastnosti a biokompatibilita.*¹³¹

Zlaté nanočástice lze proto využít v mnoha biomedicínských aplikacích, jako jsou genomika, biosenzory, immunoassay, klinická chemie, laserová fototerapie nádorů, cílený

transport léčiv, antigenů a DNA, biologické a medicínské snímání (bioimaging) a v nejnovějších detekčních a diagnostických systémech^{127,128,133}. Několikanásobně citlivější kontrastní látky obsahující nanočástice zlata dovolují velmi efektivní diagnostiku nádorů pomocí CT – počítačové tomografie, MRI – magnetické rezonance^{134,135} či optické koherentní tomografie – OCT¹³⁶.

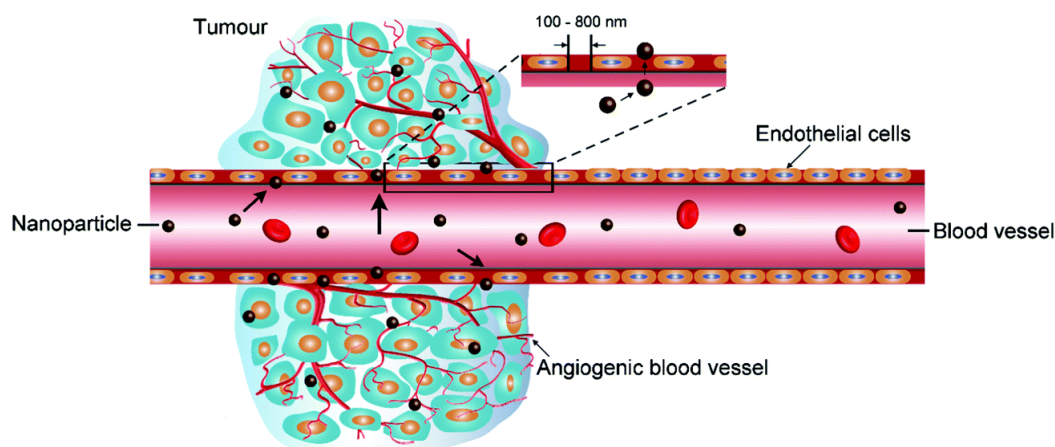
Různé typy nanočástic zlata (nanotyčinky, nanoklíčky, nanokrychle, nanokuličky) se stávají velmi zajímavým a efektivním nástrojem v buněčné biologii a biologii nádorů. Svými výhodnými optickými a fyzikálními vlastnostmi tak poskytují platformu pro rozvoj theranostiky. Theranostika, tedy diagnostika nádorové terapie, dovoluje určit u individuálního pacienta, zda zvolená terapie bude pro daný druh nádoru účinná, a to ještě před jejím zahájením.¹³⁷

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí celosvětově, dle WHO (Světová zdravotnická organizace) bylo v roce 2018 nádorové onemocnění příčinou úmrtí u 9,6 miliónu nemocných. Nádory vznikají ztrátou kontroly nad růstem buněk a jejich autonomním růstem. Současná léčba nádorových onemocnění je stále založena převážně na chemoterapii nebo radioterapii, či kombinaci obou modalit. Jejich společným cílem je zničit nádorové buňky. Bohužel má tato léčba i své vedlejší účinky, mezi hlavní lze jmenovat poškození okolní zdravé tkáně a systémovou toxicitu podávaných chemoterapeutik. Další limitací této léčby je nespecifická distribuce chemoterapeutik v těle a také vznik rezistence na podávanou chemoterapii během léčby a tím neefektivní inhibice růstu tumoru a metastáz.¹³⁸ Svůj podíl na mortalitě nese i časová prodleva od vzniku nádorového procesu ke stanovení diagnózy a včasnost zahájení léčby. Využití nanočástic tak nachází svůj potenciál právě v oblasti léčby nádorů na úrovni včasné detekce a diagnostiky nádorového procesu a jeho specifické cílené léčbě.

Nanočástice lze při vhodné modifikaci nejen selektivně cílit, ale také využít k transportu vhodných léčiv (chemoterapeutik) přímo do nádorové buňky. Cílení protinádorové léčby přímo do nádorových buněk tak dovoluje snížit systémové účinky chemoterapie. Do buněk lze pomocí nanočástic dopravovat i chemoterapeutika, která jsou normálně ve vodném prostředí nerozpustná nebo nestabilní. Vazbou na nanočástice můžeme prodloužit i jejich biologický poločas.¹³⁸

Pro případnou protinádorovou léčbu je výhodné i to, že v nádorech, které mají nezralé a propustné cévy s fenestracemi širšími, nežli mají normální vyzrálé cévy, bylo při pokusech *in vivo* prokázáno, že zlaté nanočástice mají schopnost zvýšené akumulace a v nádorové tkáni

se zadržují^{139,140} (Obrázek 35). Tento jev je popisován jako efekt zvýšené permeability a retence EPR (enhanced permeability and retention effect).

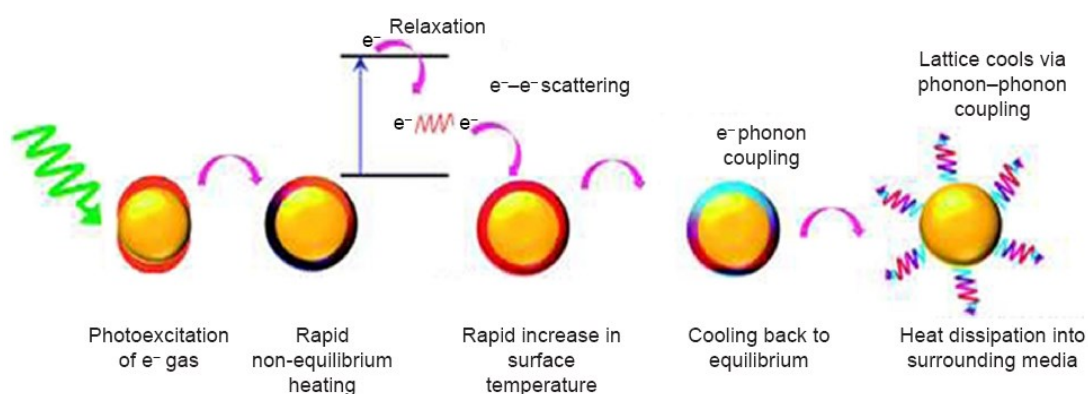


Obrázek 35: *Efekt zvýšené permeability a retence, nanočástice pronikají fenestracemi v nádorových cévách a zvýšeně se v nádoru akumulují.*¹⁴¹

Mnoho léčebných přístupů je založeno na interakci elektromagnetického záření s nanočásticemi. Na jejich povrchu může docházet jak k absorpci záření, tak k odrazu. Optické aplikace kovových nanočástic s výhodou využívají existence povrchového plasmonu, resp. zesílené plasmonové rezonance (SPR). SPR je proces, kdy při interakci vodivé kovové nanočástice s elektromagnetickým zářením dochází ke kolektivní oscilaci vodivostních elektronů na povrchu nanočástice a k masívní absorpci světla při určitých vlnových délkách.^{131,136}

Syntetické přístupy dovolují připravit nanočástice různých velikostí a tvarů a tím „ladit“ jejich optické vlastnosti. Dovolují tak dosáhnout posunu v oblasti rezonančního pásu od 520 nm do 800 – 1200 nm, a to například změnou poměru stran při přechodu nanočástic na nanotyčinky.¹³¹ Rozsah od 800 nm do 1200 nm je vhodný pro zobrazovací a terapeutické aplikace, protože v této oblasti blízkého infračerveného spektra je tkáň pro záření prostupná.^{131,136} NIR záření dosahuje v lidském těle přibližně do hloubky 1 - 3 cm.^{136,142} Hirsch et al.¹⁴³ demonstroval, že např. PEGylované nanoshell $\text{SiO}_2\text{@Au}$ indukují nevratné tepelné poškození v nádorové tkáni při expozici nízké dávce NIR záření (4 W/cm^2) po dobu 4–6 min. při systémovém podání. Na principu absorpce elektromagnetického záření a jeho přeměny na teplo je založena fototermální terapie a fotozobrazovací metody (Obrázek 36).

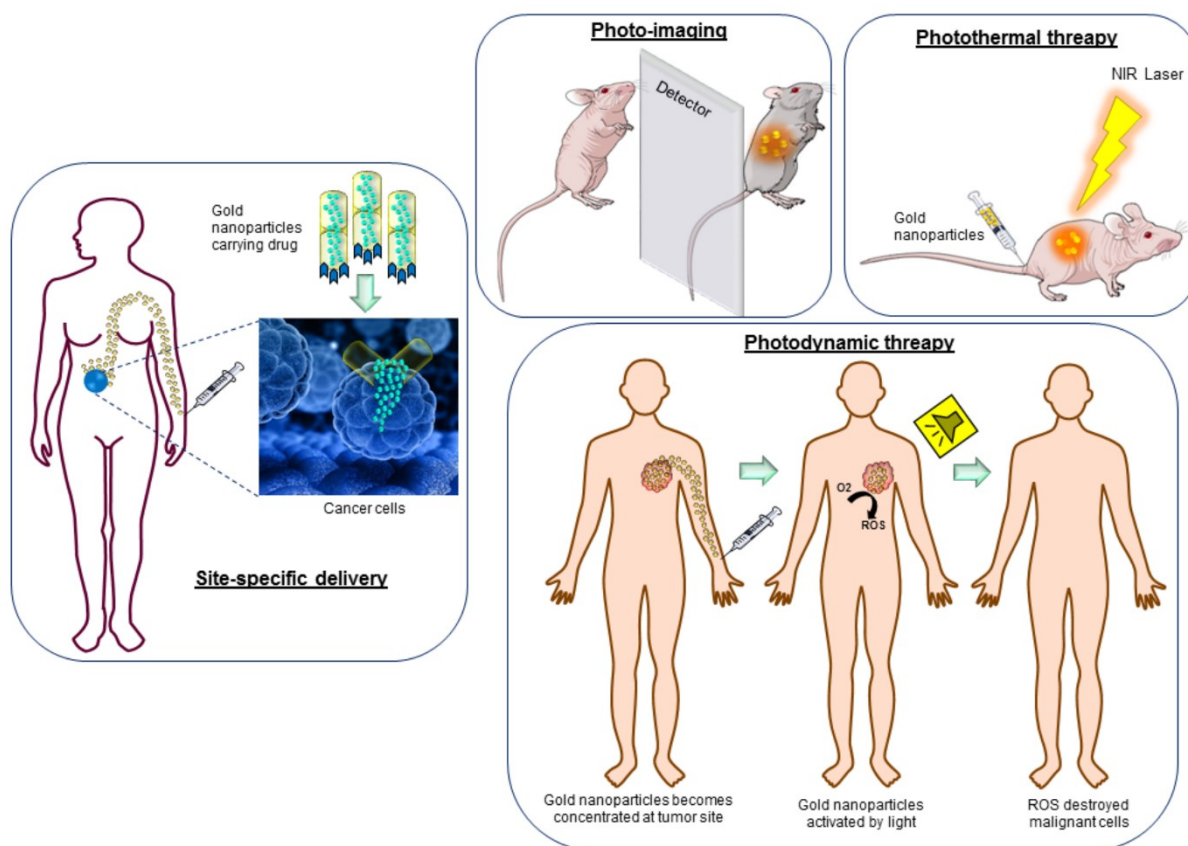
Další možností je fotodynamická léčba, pro kterou je však nutná přítomnost fotosenzitizéru a zdroj tkáňového kyslíku¹³¹. Příkladem takové léčby může být systémové intravenózní podání fotosenzitizující látky, např. porfyrinového derivátu a ozáření místa nádoru zářením o určité vlnové délce. Výsledkem je tvorba singletového kyslíku a reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), které způsobí buněčnou smrt, nebo apoptózu¹⁴². Vzhledem k tomu, že je většina fotosenzitizérů ve fyziologickém prostředí špatně rozpustná, je snížen i jejich uptake postiženou tkání¹³¹.



Obrázek 36: Schematická ilustrace přeměny fotonu elektromagnetického záření na teplo: I) excitace kovové nanočástice absorbovaným fotonem způsobí oscilaci nanočástice a separaci náboje, II) konverze fotonu na teplo procesem elektron-elektronové a elektron – fononové relaxace vede k tvorbě „horké“ krystalové mřížky, III) ochlazení kovové struktury pomocí elektron-fononového couplingu a fonon – fononové relaxace, disipace tepla do okolí.¹⁴⁴

Tyto fotosenzitizéry lze výhodně konjugovat s nanočásticemi, a tím facilitovat uptake v nádorové buňce¹⁴⁵. Samotná fotodynamická terapie přináší výhody ve smyslu minimální invazivity s vyloučením kumulativní toxicity¹⁴⁶. U fotodynamické léčby je navíc nízká pravděpodobnost vzniku mutací vzhledem k tomu, že se ROS v těle neakumulují. Obě metody (fototerapii i fotodynamickou léčbu) lze synergicky kombinovat¹⁴⁷.

Shrnutím výše uvedeného lze konstatovat, že malá velikost, biokompatibilita, schopnost pasivního průniku do buněk, akumulace v nádorech a existence povrchového plasmonu se schopností odpovídat na fotony blízké infračervené oblasti (NIR), činí zlaté nanočástice atraktivními pro zobrazovací, fotodynamické a fototerapeutické aplikace (Obrázek 37).

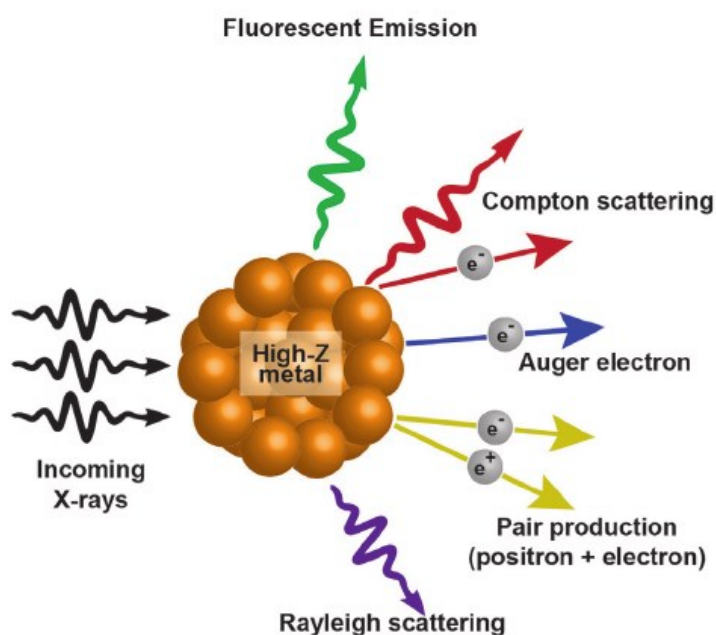


Obrázek 37: *Různé způsoby využití zlatých nanočástic v diagnostice a léčbě nádorů.*¹³¹

Další léčebnou strategií je využití nanočástic zlata pro radiosenzitizaci. Cílem by mělo být snížení radiační zátěže a zvýšení efektivity radiační léčby. Zvláště u radiorezistentních tumorů by mohla být radiosenzitizace přínosná. Při ozáření buněk vysokoenergetickými fotony v pokusech *in vitro* a *in vivo* vykazují zlaté nanočástice schopnost senzitivizovat nádorové buňky.¹⁴⁸ Léčbu lze proto dobře lokalizovat a cílit právě do místa s jejich vysokou depozicí.

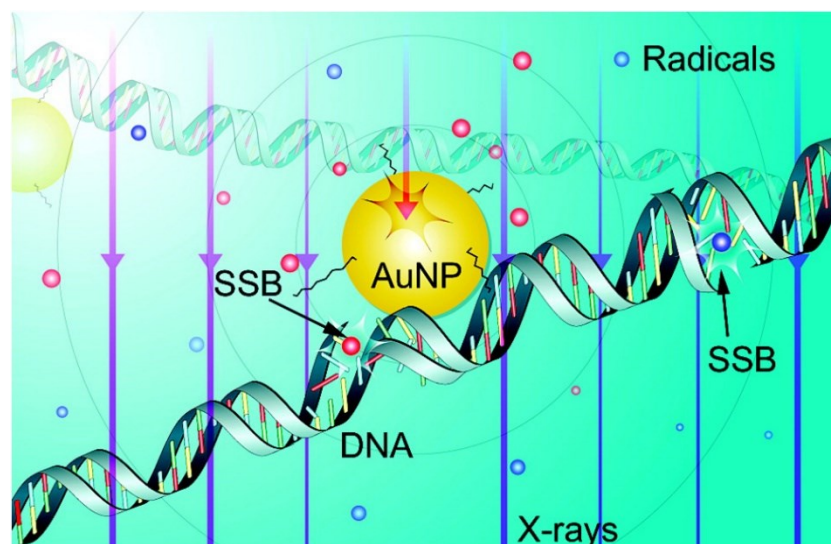
Dle energie ionizujícího záření můžeme pozorovat mezi dopadajícím fotonem a zlatou nanočásticí různé typy interakcí (Obrázek 38). Fotoelektrický jev převládá při energiích od 10 do 500 keV. Vznikají elektrony charakteristického rentgenového záření, nebo Augerovy elektrony. Výtěžek fluorescence je silně závislý na atomovém čísle (Z) a je malý pro atomy s nízkou hodnotou protonového čísla, a naopak velký pro těžké atomy, jako je zlato. Pro energii fotonu nad 500 keV dochází ke Comptonovu jevu. Comptonův rozptyl vede k produkci sekundárních Comptonových elektronů, které mohou vést k následnému fotoelektrickému efektu. Dle určitých pravidel nedochází po excitaci atomu k uvolnění fotonu, ale k emisi fononu. Při fononové emisi proudí excitační energie do hostitelské mřížky a přeměňuje se na

teplo. Excitace vysokoenergetickými fotony ve zlatě vede k dominantním foton – fononovým přechodům. Při vyšší energii než 1,02 MeV převládá tvorba elektron – pozitronových párů. Všechny tyto interakce, kromě Comptonova rozptylu, silně závisí na protonovém čísle (Z), pravděpodobnost fotoelektrického efektu a vzniku elektron-pozitronového páru jsou úměrné Z^3 , resp. Z^2 .¹⁴⁹



Obrázek 38: Interakce vysokoenergetického ionizujícího záření se zlatou nanočásticí.¹⁵⁰

Zlaté nanočástice mohou zvýšit radiosenzitivitu nádorové tkáně zvýšením lokální dávky záření, která vede k vyšší absorpci dopadajících fotonů a tvorbě Augerových elektronů. Následnou emisí pomalých Augerových elektronů dochází k ionizaci molekul vody, tvorbou radikálů a vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) v místě výskytu nanočástic. Mnoho autorů se domnívá, že radiosenzitizační efekt je založen právě na oxidativním stresu, poškození mitochondrií a DNA buňky (Obrázek 39).^{151,152} Další možný mechanismus by mohl být způsoben nanočásticemi indukovanou apoptózou a přímým ovlivněním buněčného cyklu buňky¹⁴⁸. Detailní mechanistické studie však chybí. Simulacemi na základě metody Monte Carlo bylo zjištěno, že teoretické zvýšení lokální dávky dosahované radiosenzitizací zlata by mohlo být 200 % a více.¹⁵³ Praktické experimenty na modelech při ozařování vysokoenergetickými (keV) fotony lokální zvýšení dávky potvrzují¹⁴⁹.

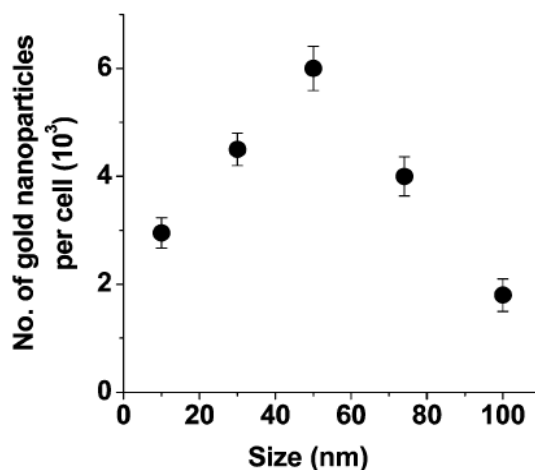


Obrázek 39: Schématická ilustrace znázorňující lokální depozici energie zprostředkovanou nanočásticemi zlata v těsné blízkosti DNA při ozařování vysokoenergetickými fotony rentgenového záření (100 kVp). Dopadající záření ionizuje molekuly vody, dochází k uniformní produkci radikálů (modré kuličky), sekundární elektrony (Augerovy, fotoelektrony) pocházející z interakce s nanočásticemi vytváří vyšší koncentraci radikálů v jejich blízkosti (červené kuličky). Radikály vznikající v blízkosti 0,5 nm od DNA způsobují jednoduché zlomy (SSB) DNA s 25% účinností.¹⁵⁴

Radiosenzitizační odpověď bude tedy závislá na množství akumulovaných nanočástic uvnitř buňky a také na jejich konkrétní intracelulární lokalizaci. Je známo, že nádorová tkáň vykazuje vyšší uptake nanočástic ve srovnání se zdravou tkání (EPR efekt), přičemž množství nanočástic přijímaných buňkami je závislé na jejich velikosti, tvaru, povrchovém náboji, povrchové vrstvě nanočástic, na době expozice a také na teplotě. Ke zvýšení lokální teploty v nádoru dochází při všech výše jmenovaných terapeutických přístupech (ozařování nanočástic) a je spojeno s vyšším příjmem nanočástic buňkami. V literatuře se popisuje silná závislost mezi vychytáváním zlatých nanočástic buňkami a jejich velikostí. Chitrani et al. udává, že nejvyšší uptake vykazují částice o velikosti kolem 50 nm (Obrázek 40)¹⁵⁵. Povrchový náboj částic může jejich vychytávání také ovlivňovat – v experimentu s indukovanými dendritickými buňkami bylo popsáno, že nanočástice s pozitivním nábojem jsou buňkami vychytávány více než nanočástice s nábojem negativním¹⁵⁶.

Získané nanočástice mají velký povrch a tendenci agregovat ve větší celky. Proto je nezbytné tyto nanočástice na povrchu modifikovat a stabilizovat je, zvláště pokud mají přijít do kontaktu s tělními tekutinami. Jinak dochází na povrchu nanočástic k tvorbě tzv. korony.

Korona je tvořena různými proteiny přítomnými v prostředí tělních tekutin. Například krevní plasma obsahuje cca 3700 proteinů, proteinový komplex tvořící koronu, obsahuje méně, přibližně 100 proteinů. Oponiny přítomné na povrchu nanočástic pak dovolují snadné rozpoznání imunitním systémem a dochází k jejich vychytávání.¹³¹



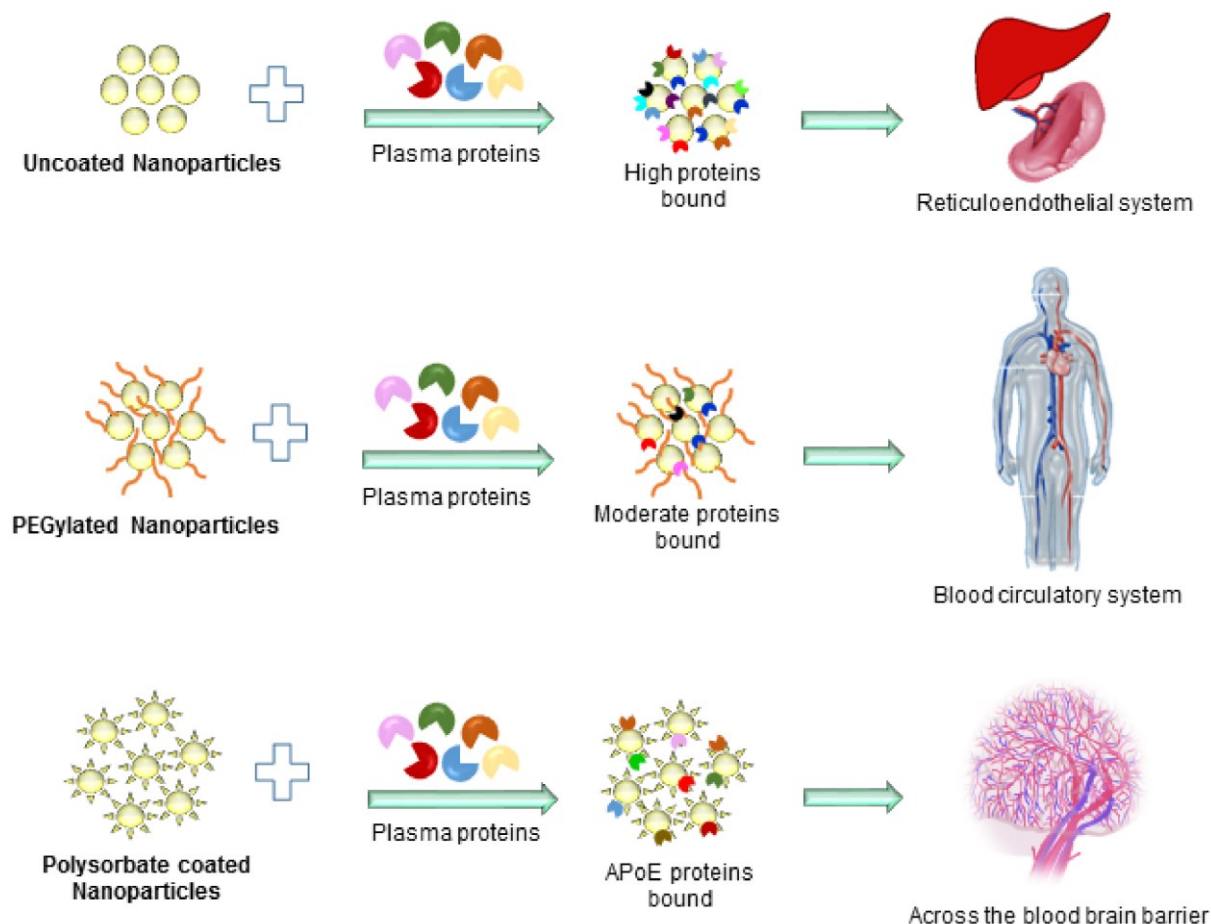
Obrázek 40: *Závislost uptake zlatých nanočástic savčími buňkami na jejich velikosti.*¹⁵⁵

Zlato je typické tím, že má vysokou afinitu k atomům síry a vytváří snadno vazbu s thio-skupinami. Často využívanou metodou je funkcionizace povrchu PEG-thioly umožňující dobrou disperzi zlatých nanočástic ve vodném roztoku (stérická stabilizace). PEG-thioly dokáží efektivně zabránit adhezi zlatých nanočástic na plazmatické proteiny a jejich fagocytóze buňkami imunitního systému, a to tvorbou vnější vrstvy polymeru na povrchu nanočástice^{131,157,158}.

Tato povrchová vrstva také prodlužuje poločas cirkulace nanočástic v krvi tím, že zabraňuje jejich rozpoznání a likvidaci orgány retikuloendoteliálního systému (slezina, játra). Při vhodné modifikaci mohou nanočástice prostupovat i přes hematoencefalickou bariéru (Obrázek 41).

EPR v kombinaci s delším plazmatickým poločasem dosaženým pomocí PEG-ylace, může zvýšit koncentraci potenciálních léčiv v nádorech 10–100x ve srovnání s volnými léčivy¹⁵⁹.

Další možností, jak zefektivnit léčebné postupy závislé na transportu nanočástic do buněk, by mohlo být zvýšení uptake nanočástic použitím speciálních cílicích peptidů.

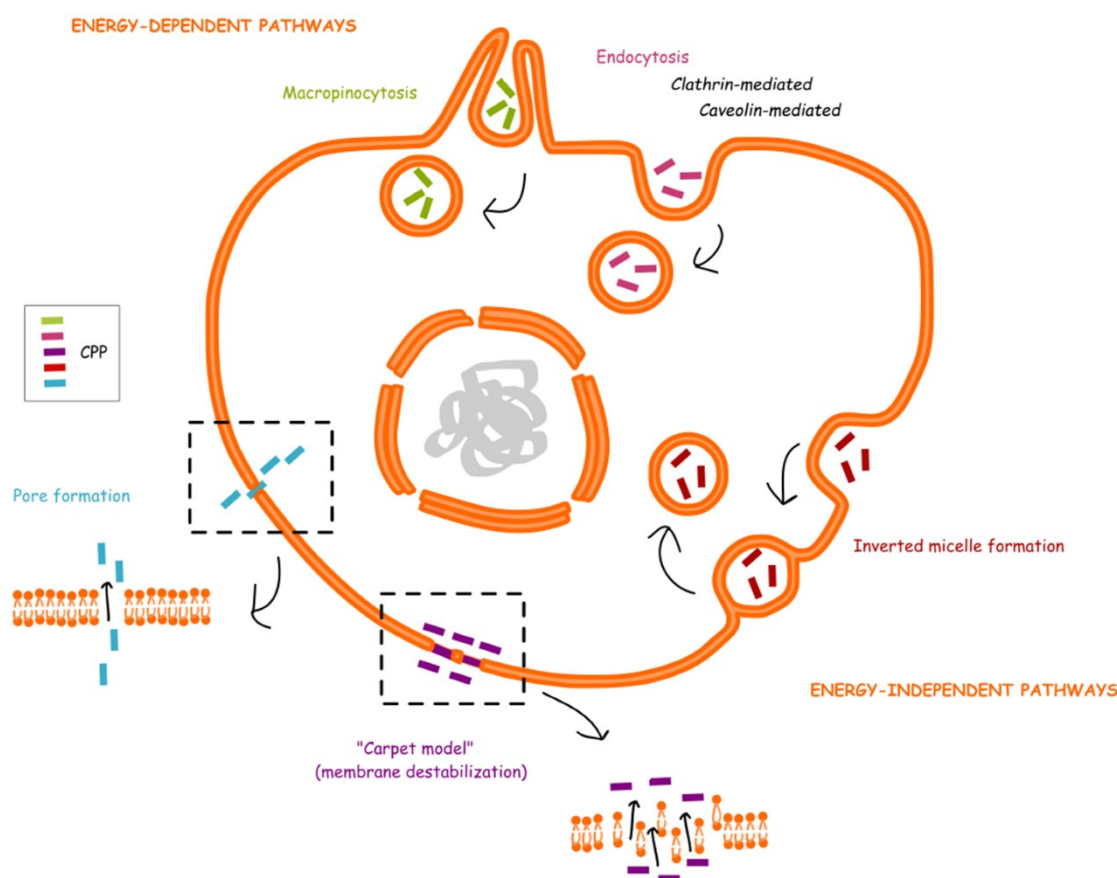


Obrázek 41: I) Tvorba proteinové korony na povrchu nanočástice při kontaktu s krevní plazmou a jejich vychytávání ve slezině a játrech, II) částečná vazba plasmatických proteinů na povrchu PEG-ylovaných nanočástic prodlužuje dobu cirkulace v krevním řečišti, III) nanočástice funkcionizované polysorbátem a následná vazba apolipoproteinu E umožňující prostup přes hematoencefalickou bariéru do mozku.¹³¹

Nabízí se konjugace nanočástic s buňku penetrujícími peptidy CPP (Cell Penetrating Peptide). CPP byly objeveny v roce 1988 při výzkumu schopnosti HIV TAT transaktivního proteinu penetrovat do buněk a aktivovat HIV-1 specifické geny. Nejčastěji jde o krátké kationické sekvenční aminokyselin (lysín, arginin), střídající se s nepolárními aminokyselinami. Jsou schopné zprostředkovat vstup do buňky pro široké spektrum látek – od malých molekul až po velké fragmenty DNA, včetně nanočástic.¹⁶⁰

Pro internalizaci CPP buňkou bylo navrženo několik modelů, ale přesný mechanismus není dosud zcela objasněn. Pravděpodobně se uplatňuje mechanismus jak přímé penetrace (energeticky nezávislý mechanismus), tak také endocytóza (energeticky závislá). Pro mechanismus přímé translokace byly popsány nejméně tři modely – invertovaný model

micely vznikající interakcí lipidové dvojvrstvy s peptidem, dále tvorba pórů a model „koberec“ (destabilizace membrány). Endocytóza může být zprostředkována také několika drahami, které zahrnují fagocytózu pro uptake větších částic a pinocytózu pro uptake solutů. Internalizace CPP může být zprostředkována také makropinocytózou, klathrin či kaveolin závislou i nezávislou endocytózou. Souhrn internalizačních modelů CPP je znázorněn na obrázku (Obrázek 42). Translokaci ovlivňuje mnoho faktorů, jako jsou experimentální podmínky (teplota a pH), typ buňky, povaha CPP, povaha přenášeného nákladu, množství CPP a přenášené látky, stejně jako účinnost endosomálního úniku.^{161,162}



Obrázek 42: Schéma možných mechanismů internalizace CPP do buňky.¹⁶¹

Cílení zlatých nanočástic do buněčného jádra přitahuje velkou pozornost, protože slibuje vývoj nových léčebných strategií. Buněčné jádro je pro léčbu vhodným cílem, neboť je v něm uložena genetická informace. Dopravit nanočástice do jádra však vyžaduje prostup cytoplazmatickou membránou a také jadernou obálkou.

Nefunkcionalizované nanočástice a nanočástice funkcionalizované CPP se většinou

dostanou pouze do cytoplazmy. Pro vstup do buněčného jádra lze však využít následné funkcionalizace s jaderným lokalizačním signálem NLS (Nuclear Localization Signal). NLS byly objeveny během analýzy mutant viru SV40, který produkoval abnormální formu časného virového proteinu zvaného velký T-antigen (původní forma proteinu je nalézána v jádře virem infikovaných buněk, zatímco mutantní formy velkého T-antigenu se hromadí v cytosolu). Mutace zodpovědné za tuto alteraci lokalizace se vyskytují v sekvenci pěti po sobě následujících bazických aminokyselin: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Zlaté nanočástice velikosti 5 nm obalené tímto syntetickým peptidem jsou po mikroinjekci do cytoplazmy kultivovaných buněk transportovány jadernými póry do jádra. Tyto experimenty ukázaly, že tato krátká sekvence z velkého T-antigenu viru SV40 funguje jako signál způsobující cílený transport do buněčného jádra.¹⁶³

3.11 Osteosarkom – zhoubný nádor kostí

Osteosarkom je nejčastější zhoubný nádor vycházející z kostní tkáně. Jde převážně o nádor dětského nebo adolescentního věku. Vrchol výskytu osteosarkomu je ve druhém deceniu a je spojován s růstovou akcelerací. Onemocnění postihuje častěji chlapce než dívky a vyšší výskyt je u černé rasy než u bílé. Osteosarkom postihuje nejčastěji distální část femuru (40 %), proximální části tibie (20 %) a humeru (10 %). Asi 10 % postihuje osový skelet včetně pánve. Přibližně 3 % osteosarkomu vznikají jako sekundární nádor důsledkem ionizujícího záření v místě předchozího ozařování. V době před zahájením systémové chemoterapie umíralo 80–90 % pacientů, většinou na progresi plicních metastáz. Dnes je standardním léčebným postupem použití agresivní chemoterapie před a po chirurgickém výkonu. Chemoterapie využívá vysokodávkovaný methotrexát, adriamycin, cisplatinu +/- ifosfamid, případně etoposid v nejrůznějších kombinacích. Dlouhodobé přežití pacientů s nízkou malignitou, adekvátně léčenými sarkomy, se blíží 90 %.^{164–166} Na rozdíl od agresivních forem vysoce maligních osteosarkomů u jejichž lokalizovaných forem došlo po začlenění agresivních kombinovaných chemoterapeutických režimů k výraznému zlepšení výsledků léčby z historicky méně než 20% přežití do současných 60–75 %. Výsledky léčby metastatických forem onemocnění jsou bohužel nadále neuspokojivé.¹⁶⁶ Osteosarkom je považován za radiorezistentní nádor a zkušenosti s ozařováním jsou limitované. Současné znalosti však ukazují, že radioterapie může mít příznivý efekt v kombinaci se systémovou chemoterapií tam, kde chirurgický výkon není možný nebo kde zůstává mikroskopické residuum.¹⁶⁵ Potenciální využití v léčbě osteosarkomu by mohla nalézt radiosenzitizace.¹⁶⁷

3.12 Osteosarkomové buněčné linie 143B

Lidské osteosarkomové buněčné linie 143B jsou odvozeny od HOS osteosarkomové buněčné linie, kterou v roce 1971 McAllister¹⁶⁸ získal z tumoru 13leté dívky. Původně byla HOS buněčná linie pojmenována TE-85, klon F5. Protože v té době byly výzkumné snahy zaměřeny na výzkum nádorových virů a způsob, jakým jsou schopny transformovat lidské buňky, byly HOS buňky infikovány Kirstenovým myším sarkomovým virem (tím získaly onkogen Ki-Ras) a vznikl tak subklon R970-5. Tento subklon byl schopen, oproti původním HOS buňkám, rozvinout po inokulaci myším nádor do 2 týdnů. V roce 1979 vznikla dalším odvozením buněčná linie pojmenovaná 143. Tato buněčná linie byla 5-bromodeoxyuridin (BUdR)-rezistentní a thymidinkináza-negativní mutantou buněk R970-552. Konečně roku 1986 byla tato buněčná linie pojmenována 143B a stala se komerčně dostupnou ve sbírce tkáňových a buněčných kultur American Type Culture Collection (ATCC, CRL-8303).¹⁶⁹

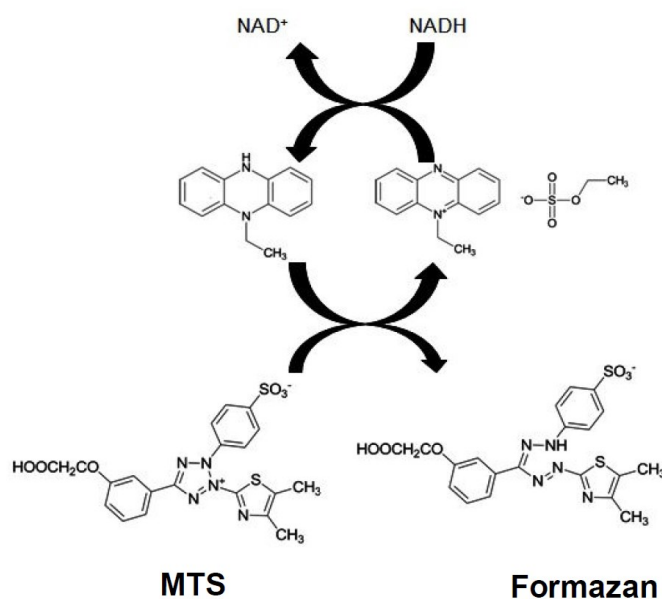
Důležité vlastnosti buněčné linie 143B pro preklinické studie osteosarkomu jsou následující: po intratibiální (do holenní kosti) injekci buněk imunodeficientním myším se nádory vyvíjejí rychle a reprodukovatelně do dvou týdnů po injekci. Vznikající primární nádory jsou převážně osteolytické, což dobře koresponduje s osteolytickými ložisky osteosarkomu pozorovanými i u lidských pacientů. Buňky *in vitro* rostou rychle, což šetří čas pro kultivaci před následnou inokulací. Tyto buněčné charakteristiky jsou důležité např. pro výzkum nových léčiv, testování jejich různých koncentrací nebo cest podání. Pro experimentální studie osteosarkomu je stejně tak důležité, že metastázy vznikají hlavně v plicích zvířat, což se podobá průběhu lidského onemocnění. Je však třeba mít stále na paměti, že transformace Ki-Ras může vyvolat změny odlišné od změn pozorovaných u lidských primárních nádorových buněk.

3.13 Stanovení buněčné toxicity zlatých nanočástic

Ke stanovení cytotoxicity lze využít metod založených na stanovení redukční kapacity buňky. Tyto metody nejčastěji využívají přeměny tetrazoliových barviv pomocí NADH resp. NADPH dependentních buněčných oxidoreduktáz, které odráží metabolickou aktivitu buňky. Tato změna je provázena barevnou změnou vznikajícího formazanu.

Jako činidlo může být využita např. tetrazoliová sloučenina MTS - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium] ve formě vnitřní soli, která je uvnitř metabolicky aktivní buňky redukována na barevný formazan

rozpuštěný v buněčném médiu. Činidlo obsahuje PES (fenazin ethosulfát), který zvyšuje chemickou stabilitu roztoku. MTS a funguje jako přenašeč elektronů (Rovnice 11).¹⁷⁰



Rovnice 11: Redukce MTS činidla za vzniku barevného formazanu.¹⁷⁰

Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk a klesá s poklesem metabolické aktivity buňky. Testy založené na tvorbě formazanu tak mohou být využity pro stanovení cytotoxicity, nebo cytostatické aktivity potenciálního léku nebo toxické látky. Pokles množství vznikajícího formazanu v buňce se projeví snížením hodnot absorbance a odpovídá tak poklesu viability buněk. Absorbance formazanu je měřena při 490 nm. MTS činidlo je fotocitlivé, pokud je vystaveno několik hodin světlu, může dojít ke změně jeho barvy, což může způsobit mírné zvýšení pozadí absorbance. Na provedení testu by to ovšem nemělo mít velký vliv. Příčinou zvýšeného pozadí absorbance může být i interakce mezi MTS a testovanou látkou (redukční činidla jako glutathion, vitamin C, koenzym A jsou schopny redukovat MTS na formazan). Interagující látky lze odhalit měřením absorbance roztoku MTS a testované látky bez buněk. V malé míře může být spontánní neenzymatická redukce tetrazoliové soli způsobena buněčným médiem v závislosti na pH buněčného média, na typu séra a době expozice světlem. Zvýšené pH buněčného média nebo delší vystavení přímému světlu může spontánnost reakce urychlit. Zvýšené pozadí lze korigovat pomocí naměřených hodnot absorbance kontrol buněčného média bez buněk. Doporučená doba inkubace s činidlem je 1-4 hod., po které je měřena absorbance při 490 nm.¹⁷¹

4 Experimentální část

4.1 Příprava a charakterizace nanočástic Au, Ag, Cu

4.1.1 Použité chemikálie

Citronan sodný p.a.	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Penta s.r.o., ČR
Dusičnan stříbrný p.a.	AgNO_3	Penta s.r.o., ČR
Hydroxid draselný p.a.	KOH	Penta s.r.o., ČR
Síran měďnatý pentahydrát p.a.	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Penta s.r.o., ČR
Kyselina dusičná p.a.	HNO_3	Penta s.r.o., ČR
Kyselina chlorovodíková p.a.	HCl	Penta s.r.o., ČR
Polyvinylpyrrolidon K 25	PVP, $M_r = 24000$	Carl Roth GmbH, Německo
Tetrahydridoboritan sodný 98 %	$\text{Na}[\text{BH}_4]$	Sigma Aldrich, USA
Tetrachlorozlatitá kyselina p.a.	$\text{H}[\text{AuCl}_4]$	Carl Roth GmbH, Německo
Tween 20		P-LAB, ČR
Polyvinylalkohol		P-LAB, ČR
Polyethylenglykol		P-LAB, ČR
Agar-agar		P-LAB, ČR
Ultračistá voda		
Ethanol denaturovaný 1 % benzinu		

4.1.2 Použité zařízení a pomůcky

ZetaPALS Potential Analyzer, Brookhaven Instruments Corp., USA

Spektrofotometr StellarNet EPP2000 UV-VIS, USA

Analytické váhy Sartorius CP124 S 12

Magnetické míchadlo s ohřevem Lavat MM4

pH metr Mettler Toledo FE20-ATC Kit FiveEasy™

Ultrazvuková lázeň

Běžné laboratorní vybavení a pomůcky

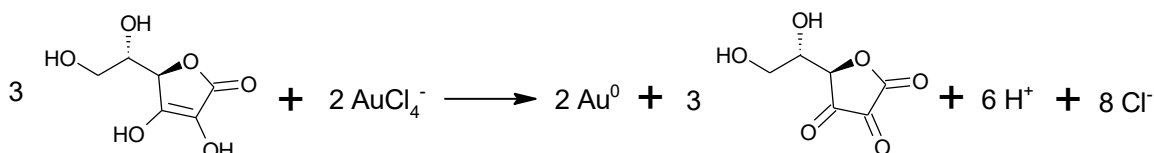
4.1.1 Příprava kovových nanočástic Au, Ag, Cu

Pro přípravu uvedených kovových nanočástic bylo využito chemické redukce příslušných solí kovů. Cílem bylo připravit stabilní koloidní systémy, a to s ohledem na zamýšlené testování pro interakci s biologickým materiálem. Tvorba elektrické dvojvrstvy je součástí elektrostatické stabilizace koloidu, avšak samotná činidla použitá při přípravě nanočástic mohou ovlivňovat chování připravených nanočástic. Proto jsou s výhodou využívána redukční činidla a stabilizátory, které jsou netoxické. Někdy se ale použití potenciálně toxických redukovadel nelze spolehlivě vyhnout. Dalším úskalím při přípravě stabilních koloidů může být nedostatečná elektrostatická stabilizace, zvláště při zamýšlených aplikacích, kde může docházet ke změně pH či iontové síly. Proto je výhodné využít i sterické stabilizace za použití vhodného polymeru/surfaktantu.

Výchozími solemi pro přípravu kovových nanočástic byla kyselina tetrachlorozlatitá pro přípravu zlatých nanočástic, resp. dusičnan stříbrný pro přípravu stříbrných nanočástic a síran měďnatý pro přípravu nanočástic mědi. Příprava nanočástic stříbra a zlata navazovala na práci a výsledky získané v diplomové práci¹⁷². Důležitá je i čistota použitých laboratorních pomůcek, které byly před použitím umyty v ethanolickém roztoku hydroxidu sodného a následně lučavkou královskou.

4.1.1.1 Příprava nanočástic zlata (Au)

Pro přípravu nanočástic zlata byl vyvinut vlastní syntetický postup vycházející z kyseliny tetrachlorozlatité jako zdroje zlatitých iontů a kyseliny askorbové, resp. vitaminu C jako redukovadla (Rovnice 12). Vitamin C je účinné a netoxické redukční činidlo.



Rovnice 12: Redukce tetrachlorozlatitanu kyselinou askorbovou.

K přípravě byl použit roztok $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ připravený přesnou navážkou pevné kyseliny tetrachlorozlatité rozpuštěním v ultračisté vodě a doplněním na příslušný objem. Jednotlivé vzorky (označené Au1 – Au3) byly připravovány s různými poměry výchozí kyseliny tetrachlorozlatité a redukčního činidla kyseliny

askorbové 0,06% (hm.). Uvedené poměry výchozích látek jsou uvedeny tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: *Poměry výchozích látek pro přípravu nanočástic zlata ZA.*

Název	V [ml] H[AuCl ₄] c = 1 mmol.dm ⁻³	V [ml] k. askorbová 0,06%	V [ml] ultračistá voda
Au1	10	10	20
Au2	20	10	10
Au3	20	20	0

Příprava koloidních zlatých nanočástic byla provedena tak, že k uvedenému poměru směsi kyseliny tetrachlorozlatité s vodou v Erlenmeyerově baňce umístěné na magnetickém míchadle byl přidán za stálého míchání roztok kyseliny askorbové. Průběh reakce byl indikován vznikem vínově červeného zbarvení. Část připravených koloidů byla ihned po přípravě stabilizována přidavkem PVP (150 µl 0,3% roztoku na 10 ml připraveného koloidu).

4.1.1.2 Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra, resp. jejich koloidy, jsou s ohledem na reaktivitu stříbra obecně méně stabilní ve srovnání s nanočásticemi zlata. Pro zamýšlené použití a testování jejich účinků bylo využito několik syntetických postupů. Dva z nich využívají redukci stříbrné soli tetrahydridoboritanem sodným, přičemž v jednom z uvedených je využit jako stabilizátor citronan sodný. Poslední postup využívá redukce stříbrné soli za pomoci redukujícího monosacharidu – glukosy, tzv. Tollensův způsob.

4.1.1.2.1 Příprava nanočástic stříbra redukcí tetrahydridoboritanem sodným

Příprava nanočástic stříbra je založena na redukci roztoku dusičnanu stříbrného roztokem tetrahydridoboritanu sodného. Redukce probíhá podle uvedené rovnice (13).



Poměry reaktantů použité pro přípravu nanočástic stříbra jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 3).

Tabulka 3: Poměry výchozích látek pro přípravu nanočástic stříbra Ag1 – Ag3.

Název	V [ml] AgNO ₃ c = 2 mmol.dm ⁻³	V [ml] Na[BH ₄] c = 2 mmol.dm ⁻³	V [ml] ultračistá voda
Ag1	10	30	0
Ag2	7,5	25	2,5
Ag3	5	25	5

Příprava koloidních stříbrných nanočástic byla provedena tak, že k uvedenému poměru směsi dusičnanu stříbrného s ultračistou vodou v Erlenmeyerově baňce umístěné na magnetickém míchadle byl přidán za stálého míchání roztok tetrahydridoboritanu sodného. Průběh reakce byl indikován vznikem žlutého zbarvení.

Část připravených koloidů byla ihned po přípravě stabilizována přidavkem PVP (150 μ l 0,3% roztoku na 10 ml připraveného koloidu).

4.1.1.2.2 Příprava nanočástic stříbra s použitím citrátu (AC)

Do 100 ml Erlenmeyerovy baňky umístěné na magnetickém míchadle bylo předloženo 40 ml ultračisté vody, 0,385 ml AgNO₃ (c = 24 mmol.dm⁻³) a následně 3,5 ml 1% roztoku citronanu sodného. Za stálého míchání bylo přidáno 4 ml čerstvě připraveného roztoku tetrahydridoboritanu sodného (0,05%) v ultračisté vodě.

4.1.1.2.3 Příprava nanočástic stříbra Tollensovým způsobem (AG)

Do 100 ml Erlenmeyerovy baňky umístěné na magnetickém míchadle bylo předloženo 20 ml ultračisté vody, 20 ml roztoku AgNO₃ (c = 5 mmol.dm⁻³), 20 ml roztoku NH₃ (c = 25 mmol.dm⁻³), 20 ml roztoku NaOH (c = 50 mmol.dm⁻³) a na závěr bylo za stálého míchání přidáno 20 ml roztoku glukosy (c = 50 mmol.dm⁻³).

4.1.1.3 Příprava nanočástic mědi (C)

Nanočástice mědi jsou z uvedených nanočástic nejméně stabilní a náchylné k oxidaci. Příprava měděných nanočástic je závislá i na pH prostředí během přípravy. Pro přípravu měděných nanočástic byl vyvinut následující postup založený na redukci síranu měďnatého tetrahydridoboritanem sodným za spolupůsobení kyseliny askorbové.

Tabulka 4: Poměry výchozích látek pro přípravu nanočástic mědi C1 – C3.

Název	V [ml] CuSO ₄ c = 2 mmol.dm ⁻³	V [ml] k. askorbová 0,06%	V [ml] Na[BH ₄] 0,05%
C1	25	50	5
C2	25	50	10
C3	25	50	15

Příprava koloidních nanočástic mědi byla provedena tak, že k uvedenému poměru roztoků síranu měďnatého (Tabulka 4) a kyseliny askorbové v Erlenmeyerově baňce umístěné na magnetickém míchadle byl přidán za stálého míchání roztok tetrahydridoboritanu sodného. Průběh reakce byl indikován vznikem červeno-hnědého zbarvení.

Připravené koloidy bylo třeba ihned po přípravě stabilizovat přidavkem PVP (150 µl 0,3% roztoku na 10 ml připraveného koloidu).

4.1.2 Měření velikosti nanočástic a ζ potenciálu

Hydrodynamický průměr částic (D_h) a ζ potenciál byly měřeny na analyzátoru ZetaPALS Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., USA) využívajícím fázovou analýzu rozptylu světla pracujícího při 660 nm s výstupním světlem 35 mW. Rozsah velikostí pro měření D_h je 1 nm až 100 µm. Rozsah velikostí pro měření ζ potenciálu je 0,3 – 3 000 nm a rozsah koncentrací je od 0,1 mg.cm⁻³ do 10 hmot. %. Signál dynamického rozptylu světla (DLS) je počítán po dobu 30 s, s 10 replikami. Hodnoty jsou statisticky vyhodnoceny (aritmetický průměr a relativní směrodatná odchylka).

4.1.3 Měření absorpčních spekter

Vlastnosti připravených koloidů byly také charakterizovány pomocí absorpčních spekter naměřených na spektrofotometrech UV-VIS-NIR StellarNet EPP2000.

Vláknový spektrometr UV-VIS-NIR StellarNet EPP2000 měří se spektrálním rozsahem od 180 nm do 2200 nm. Jde o kompaktní přístroj využívající jako zdroj deuteriovou a halogenovou výbojku. Přístroj umožňuje měření emise, transmitance, fluorescence, reflektivity a dalších. Měření bylo prováděno v rozsahu vlnových délek od 290 nm do 1120 s krokem po 0,5 nm.

4.1.4 Mikroskopie atomárních sil – AFM

K určení skutečné velikosti a tvaru syntetizovaných nanočástic byla použita mikroskopie atomárních sil. Připravené nanočástice stříbra byly zobrazeny pomocí AFM topologických snímků vzorků připravených metodou „spin coating“. Primární syntetizovaný koloid byl aplikován při 15xg na leptané podložní mikroskopické sklo nebo na vysoce orientovaný pyrolytický grafit (HOPG, Highly Oriented Pyrolytic Graphite). Tento materiál je vrstevnatou formou syntetického grafitu s atomární rovností, používanou jako substrát. Příprava vzorku k měření metodou „spin-coating“ zajišťuje nízkou míru aglomerace a agregace původních částic během přípravy vzorku a rovnoměrnou distribuci částic na povrchu. Vzorky byly následně vakuově vysušeny.

Mikroskopie atomárních sil byla prováděna na přístroji SolverProM (NT-MDT, Rusko) se sondou HA_NC. Měření byla prováděna s rezonanční frekvencí hrotu 185 kHz a silou kmitu $k = 4,6 \text{ N.m}^{-1}$ v semi-kontaktním módu, nastaveném na 40 % volné oscilace.

4.1.5 Skenovací elektronová mikroskopie – SEM

SEM snímky vybraných nanočástic zlata byly pořízeny ve spolupráci s doc. Ing. Mgr. Kateřinou Peterek Dědkovou, Ph.D. z VŠB TU Ostrava na přístroji Quanta FEG 450 (FEI) s EDS analyzátozem APOLLO X.

4.1.6 Rentgenová difrakční analýza – XRD

K rentgenové difrakční analýze stříbrných nanočástic byly použit difraktometr D8-Advance (Bruker AXS, Německo). Tento přístroj je vybaven Bragg-Brentano θ - θ geometrií (parametry rentgenky: 40 kV, 40 mA) při pokojové teplotě. Měření bylo provedeno za použití Cu-K α záření se sekundárním grafitovým monochromátorem. Difrakční úhly byly měřeny v rozmezí od 37° do 39,5° (2 θ) s krokem 0,02° a dobou 30 sekund na jeden krok.

4.2 Testování antibakteriálních účinků připravených nanočástic Au, Ag, Cu

4.2.1 Testované kmeny bakterií a kvasinek

Staphylococcus aureus (referenční kmen CCM 4227)

Escherichia coli (referenční kmen CCM 3954)

Candida albicans (referenční kmen CCM 8215)

Saccharomyces cerevisiae (pivní kvasinka)

4.2.2 Použité zařízení a pomůcky

Sterilní jednorázové plastové pomůcky, mikrozkušavky Eppendorf, očkovací kličky a hokejky, Petriho misky, mikropipety a příslušné špičky, sterilní zkumavky, Bunsenův kahan, běžné laboratorní sklo, Whattmann chromatografický papír.

Biologický termostat BT 120, Denzitometr McFarland typu DEN-1 BIOSAN, Litva, Vortex V-1 plus BIOSAN, Litva, Schuett colony counter – počítač kolonií, autokláv k přípravě sterilních médií a sterilizaci pomůcek.

4.2.3 Příprava pracovních roztoků a kultivačních médií

4.2.3.1 Fyziologický roztok sterilní

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 8,5 g chloridu sodného v 1000 ml destilované vody a sterilizací po dobu 15 minut při 121 °C v autoklávu.

4.2.3.2 Masopeptonový (živný) bujón (MPB)

Masopeptonový bujón byl připraven z Nutrient Broth No. 2, HiMedia Laboratories, Indie o složení: HM pepton A 4,3 g.dm⁻³, chlorid sodný 6,4 g.dm⁻³, trypton 4,3 g.dm⁻³.

15 g komerčního MPB se za tepla rozpustí v 1000 ml destilované vody a sterilizuje se v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121°C. Sterilní medium se skladuje v lednici při teplotě 2-8 °C. (výsledné pH_{25°C} = 7,5 ± 0,1).

4.2.3.3 Masopeptonový agar (MPA)

Živný (masopeptonový) agar, Nutrient agar No. 2 HiMedia Laboratories, Indie o složení: hovězí masový extrakt (HM peptone B) 10 g.dm⁻³, pepton 10 g.dm⁻³, agar 15 g.dm⁻³, chlorid sodný 5 g.dm⁻³.

40 g komerčního MPA se rozpustí v 1000 ml destilované vody a sterilizuje se v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121°C. Po zchladnutí na 45–50 °C se agar asepticky rozlije do sterilních Petriho misek (výsledné pH_{25°C} 7,2 ± 0,2).

Po utuhnutí agarů byly Petriho misky s nalitou půdou skladovány při chladničkové teplotě (2-5 °C), maximálně 14 dní.

4.2.3.4 MALT agar (MALT)

MALT agar byl použit pro kultivaci kvasinek. MALT agar, HiMedia Laboratories, Indie o složení: sladový agar 30 g.dm⁻³, agar 15 g.dm⁻³.

45g komerčního MALT agaru se rozpustí v 1000 ml destilované vody a sterilizuje se v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121°C. Po zchladnutí na 45–50 °C se agar asepticky rozlije do sterilních Petriho misek (výsledné pH_{25°C} 5,5 ± 0,2).

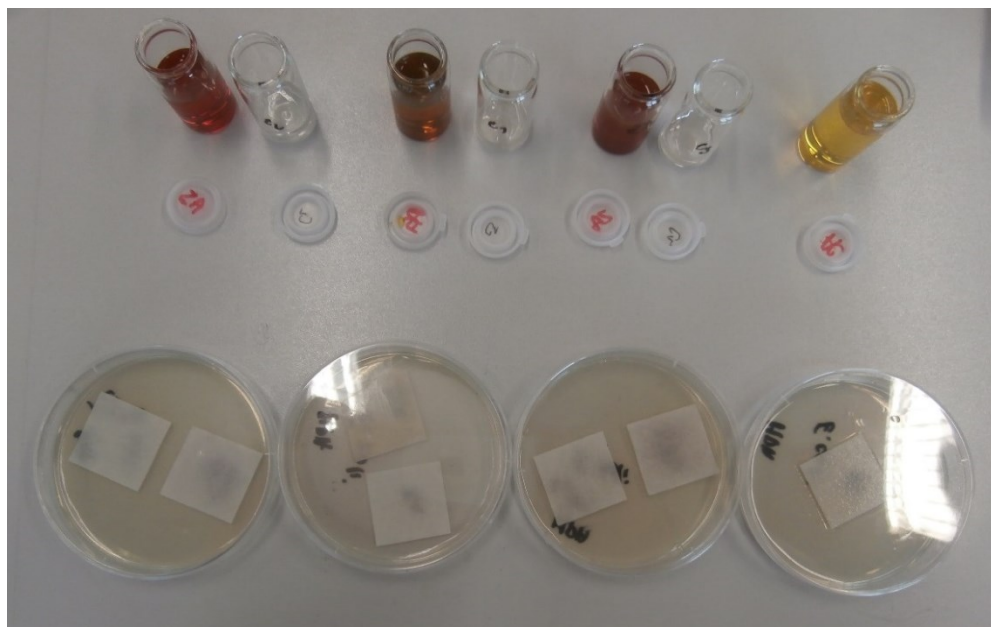
Po utuhnutí agarů byly Petriho misky s nalitou půdou skladovány při chladničkové teplotě (2-5 °C), maximálně 14 dní.

4.2.4 Difúzní diskový test

Difúzní agarová metoda se používá ke kvalitativnímu hodnocení antimikrobiálního účinku testovaného materiálu – v našem případě nanočásticových koloidů. Tato metoda měří průměr inhibičních zón kolem vzorku aplikovaného na agarovou plotnu s inokulovaným testovaným mikroorganismem. Inhibiční zóna určuje citlivost mikroorganismu na daný materiál. Rovněž umožňuje zjistit, zda má mikroorganismus baktericidní nebo bakteriostatický účinek.

Inokulum bakterií bylo připraveno z 24hodinových kultur jednotlivých kmenů, kvasinkové inokulum ze 48hodinové kultury. Byly připraveny suspenze odpovídající 0,5 McFarlandově zákalové stupnici. Z této suspenze byly připraveny kultury s výslednou koncentrací buněk v inokulu 10⁶ v 1 ml. Na agarovou plotnu bylo asepticky inokulováno 100 µl bakteriální/kvasinkové suspenze nalitím/rozetřením pomocí sterilní hokejky.

Na takto připravené agarové plotny byly asepticky vloženy sterilizované testovací čtverce z chromatografického papíru o délce hrany 3 cm. Na každý čtverec bylo aplikováno 150 μ l testovaného koloidu (Obrázek 43).



Obrázek 43: Aplikace připravených koloidů zlata (vínové) a stříbra (žluté) na agarové plotny s inokulovaným kmenem bakterií.

Petriho misky s inokulovanými mikroorganismy byly následně kultivovány při 37 °C v termostatu (kvasinka při 30 °C) po dobu 24, 48, 72, 96 hodin. Testování bylo provedeno v duplikátech.

Po uplynutí časových intervalů se test vyhodnocuje měřením inhibiční zóny kolem aplikovaného disku. Poté se asepticky odebere testovaný materiál a z místa pod ním se odebere stěr. Stěr se kultivuje na sterilní agarové plotny a po 24hodinové kultivaci se určí bakteriostatický či baktericidní účinek aplikované látky.

4.2.5 Diluční metoda

Pro testování nanočástic jsme zvolili makrodiluční metodu resp. modifikovaný způsob sledování časové závislosti expozice bakteriální suspenze nanočásticovými koloidy o různých koncentracích. Tato metoda poskytuje lepší pochopení kinetiky růstu bakterií a baktericidní

aktivity, což pomáhá určit optimální koncentraci a dobu expozice potřebnou k účinnému zabíjení bakteriálních patogenů.¹⁷³

Makrodiluční metoda je metoda časově náročná a pracná, nabízí však možnost sledovat lépe chování koloidů nanočástic v průběhu testu. Tedy od přípravy bakteriální suspenze, diluce koloidů fyziologickým roztokem (iontová síla), interakce s bujónem (proteinová korona) a vliv koncentrace na růst bakterií (agregační stabilita).

Experimenty byly prováděny s bakteriálními kmeny dvojice *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Podobně, jako v případě difúzního testu, bylo připraveno inokulum v kvantitě 10^6 bakterií v 1 ml. Z tohoto inokula byla připravena testovaná suspenze s výslednou koncentrací odpovídající kvantitě 10^5 bakterií v 1 ml obsahující různé koncentrace připravených koloidů nanočástic. Bakteriální suspenze s nanokovy byly inkubovány v termostatu a v časových intervalech byly vyočkovávány na sterilní agarové plotny. Vyhodnocení antibakteriálního účinku nanočástic bylo provedeno počítáním narostlých kolonií po 24 hodinové inkubaci v termostatu.

4.3 Studium chování stříbrných nanočástic v tekutém médiu pro testování ekotoxicity

V návaznosti na zjištěné výsledky při testování antibakteriálních účinků nanočástic jsme se zaměřili na problematiku změny agregační stability v průběhu běžně používaných metod pro testování ekotoxicity. Za model jsme zvolili testování v jednoduchém médiu pro testování akutní akvatické toxicity na rybách dle OECD 203¹⁷⁴. Za vzorový koloid jsme zvolili stabilní koloidní disperzi AG připravenou Tollensovým způsobem. Koncentrace připraveného koloidu byla stanovena ICP – OES.

Uvolňování nanočástic stříbra do životního prostředí je s ohledem na narůstající počet produktů obsahujících nanostříbro aktuální. Výroba, používání a likvidace produktů obsahujících stříbrné nanočástice mohou vést k jejich uvolňování do životního prostředí a k akumulaci v životním prostředí. ¹⁷⁵

Na základě toho vzniká mnoho studií, které se věnují mechanismům uvolňování nanočástic z těchto produktů, otázce, jak je detekovat ve vodním prostředí a hodnocení jejich toxicity.^{175,176}

4.3.1 Příprava média 203 dle OECD

Médium 203 bylo připraveno ze zásobních roztoků jednotlivých solí, které byly připraveny z výchozích solí o čistotě p.a. Jednotlivé zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním navážek v 1000 ml demineralizované vody. Jednotlivé navážky jsou následující: 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,59 g NaHCO_3 a 0,23 g KCl . Samotné médium 203 bylo připraveno pipetováním 2,5 ml výše uvedených roztoků a doplněním do 1000 ml demineralizovanou vodou. Výsledná koncentrace solí v médiu 203 odpovídá $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CaCl_2 , $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ MgSO_4 , $0,0775 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaHCO_3 a $0,75 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl . Měrná vodivost roztoku byla $680 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.3.2 Měření hydrodynamického průměru, ζ potenciálu a iontové měrné vodivosti

Hydrodynamický průměr částic (D_h) a ζ potenciál byly měřeny stejným způsobem jako je uvedeno v bodě 4.1.2. Vodivost byla měřena na konduktometru inoLab cond 730 WTW, Německo, se čtyřpólovou kyvetou WTW TetraCon 325. Měření probíhalo při pokojové teplotě.

4.4 Cílený transport zlatých nanočástic do osteosarkomových buněk pro potenciální využití v radioterapii a cílené léčbě nádorů.

4.4.1 Použité chemikálie

Trihydrát kyseliny tetrachlorozlatité p.a., kyselina askorbová p.a., tetrahydridoboritan sodný 98 %, citronan sodný dihydrát p.a., dimethylsulfoxid p.a., hydroxid sodný p.a., kyselina chlorovodíková 37 % p.a., kyselina dusičná 65 % p.a., ethanol 96 %, hydrogenuhličitan sodný p.a., Dulbeccovo modifikované Eaglovo Medium (DMEM) pro adherentní buněčné linie, Dulbeccův fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate-Buffered Saline – PBS) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.

Methoxypolyethylenglykolthiol mPEG-SH 5000 byl zakoupen od Laysan Bio, Inc.

Trumpův fixační roztok (1% vodný roztok glutaraldehydu a 4% vodný roztok formaldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,2) byl zakoupen od Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA.

CellTiter 96® cell proliferation assay kit, Promega, Madison, WI, USA.

Milli-Q reagent grade water (Millipore) – ultračistá voda.

Purifikované a lyofilizované signální peptidy – Mayo Protein Core Facility, Rochester, MN, USA. Osteosarkomové buňky 143 B – Cryostorage Mayo Clinic. Rochester, USA.

4.4.2 Použité zařízení a pomůcky

Běžné laboratorní pomůcky, analytické váhy, inkubátor ke kultivaci buněčných linií s 90% vlhkostí, 5 % CO₂ a 37 °C, polystyrenové kultivační nádoby, sterilní zkumavky Falcon, lineární box pro práci v aseptickém prostředí, invertovaný mikroskop, Reichertův hemocytometer – komůrka k počítání buněk, centrifuga Eppendorf, jednorázové polystyrenové kyvety, mikropipety, sterilní filtrační set Nalgene™ Rapid-Flow™, sterilní mikrotitrační destičky, 6jamkové sterilní destičky, ACLAR® –Fluoropolymer Film pro zabudování preparátu pro TEM.

4.4.3 Příprava zlatých nanočástic

Nejčastější způsoby přípravy zlatých nanočástic vycházejí z tetrachlorozlatité kyseliny jako zdroje zlatitých iontů, které jsou vhodnými redukčními činidly redukovány za vzniku nanočástic. Tvar a velikost připravených nanočástic závisí na reakčních podmínkách (redukční činidlo, koncentrace, teplota). Pro přípravu požadovaných velikostí zlatých

nanočástic (5 nm a 50 nm) bylo využito několik následujících postupů. Přípravu zlatých nanočástic je třeba provádět v řádně vymytém a čistém laboratorním skle. Za tímto účelem bylo veškeré sklo nejdříve odmaštěno alkoholovým roztokem hydroxidu sodného a následně vymyto lučavkou královskou.

4.4.3.1 Nanočástice A

Roztok 4 mg tetrahydridoboritanu sodného v 50 ml ultračisté vody byl předložen do 250ml Erlenmeyerovy baňky opatřené magnetickým míchadlem, umístěné na magnetickém míchadle. K tomuto roztoku bylo za stálého míchání přidáno 100 ml $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku tetrachlorozlatité kyseliny ve 100 ml ultračisté vody. Roztok byl ponechán 24 hodin k dokončení reakce.

4.4.3.2 Nanočástice B

Ke směsi 20 ml roztoku $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny tetrachlorozlatité a 20 ml roztoku $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ citronanu sodného v řádně vymyté 100 ml Erlenmeyerově baňce bylo za stálého míchání na magnetickém míchadle napipetováno 0,6 ml roztoku tetrahydridoboritanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Všechny roztoky byly připraveny v ultračisté vodě. Reakční směs byla ponechána reagovat po dobu 3 hodin. Poté bylo z tohoto roztoku odebráno 2,5 ml a bylo přidáno 7,5 ml roztoku kyseliny tetrachlorozlatité o koncentraci $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, obsahujícího 0,1 % PVP (polyvinylpyrrolidon, $M_r = 58\,000$). K takto vzniklé směsi bylo přidáno 0,05 ml roztoku kyseliny askorbové o koncentraci $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Směs byla ponechána reagovat po dobu 20 minut, za stálého míchání.

4.4.3.3 Nanočástice BS

Ke směsi 5 ml roztoku $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny tetrachlorozlatité a 5 ml roztoku $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ citronanu sodného v řádně vymyté 25 ml Erlenmeyerově baňce bylo za stálého míchání na magnetickém míchadle napipetováno 0,3 ml roztoku tetrahydridoboritanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Všechny roztoky byly připraveny v ultračisté vodě. Reakční směs byla ponechána reagovat 3 hodiny.

4.4.3.4 Nanočástice ZA

Ke směsi obsahující 10 ml ultračisté vody a 5 ml roztoku tetrachlorozlatité kyseliny o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, umístěné v Erlenmeyerově baňce (50 ml), bylo za stálého míchání na magnetickém míchadle vpipetováno 5 ml 0,6% (hm.) kyseliny askorbové.

4.4.3.5 Nanočástice ZA 2

Ke směsi obsahující 5 ml ultračisté vody a 10 ml roztoku tetrachlorozlatité kyseliny o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, umístěné v Erlenmeyerově baňce (50 ml), bylo za stálého míchání na magnetickém míchadle vpipetováno 5 ml 0,6% (hm.) kyseliny askorbové.

4.4.3.6 Nanočástice ZA PVP

Ke směsi obsahující 8 ml ultračisté vody s 2 ml 0,2% PVP ($M_r = 58\,000$) a 5 ml roztoku tetrachlorozlatité kyseliny o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, umístěné v Erlenmeyerově baňce (50 ml), bylo za stálého míchání na magnetickém míchadle vpipetováno 5 ml 0,6% (hm.) kyseliny askorbové.

4.4.3.7 Nanočástice ZA PVP 2

Ke směsi obsahující 3 ml ultračisté vody s 2 ml 0,2% PVP ($M_r = 58\,000$) a 10 ml roztoku tetrachlorozlatité kyseliny o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, umístěné v Erlenmeyerově baňce (50 ml), bylo za stálého míchání na magnetickém míchadle vpipetováno 5 ml 0,6% (hm.) kyseliny askorbové.

4.4.4 Měření velikosti částic připravených nanočástic zlata pomocí DLS

Hydrodynamické průměry připravených koloidních roztoků zlatých nanočástic byly měřeny v kompatibilní jednorázové polystyrenové kyvetě na přístroji Zetasizer Nano ZS, Malvern. Velikost nanočástic byla vyhodnocena ze získaných distribučních křivek.

4.4.5 Stabilizace zlatých nanočástic – PEG-ylace

Vzhledem k tendenci připravených nanočástic agregovat bylo ihned po přípravě nutné

připravené roztoky nanočástic stabilizovat PEG-ylací. U dvou nejvhodnějších postupů přípravy požadovaných velikostí nanočástic byla nejdříve měřena závislost velikosti hydrodynamického průměru nanočástic na přidavku mPEG-SH před a po přidání redukčního činidla. Poté byla zjišťována závislost hydrodynamického průměru na množství přidaného mPEG-SH. Cílem bylo ověřit vliv mPEG-SH na velikost připravených nanočástic a ověřit, zda na povrchu nanočástic zůstane prostor pro zamýšlenou konjugaci se signálními peptidy. Distribuční DLS křivky byly získány na přístroji Zetasizer Nano ZS, Malvern.

Na základě získaných měření jsme použili na každých 10 ml čerstvě připravených koloidních roztoků zlatých nanočástic roztok 10 μl 1 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ metoxy-PEG-SH ($M = 5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) a 490 μl ultračisté vody. Směs jsme ponechali reagovat přes noc.

4.4.6 Konjugace zlatých nanočástic se signálními peptidy

Připravené koloidní roztoky zlatých nanočástic byly koncentrovány centrifugací při 12 000 otáčkách/min. Po odstranění supernatantu byly nanočástice exponovány 20 min. pod UV lampou v laminárním boxu (k zajištění sterility). Poté byly nanočástice redispergovány v PBS a bylo přidáno vypočítané množství signálních peptidů k následné konjugaci. CPP se sekvencí RGDRGDRGDRGDPGC byl přidán v množství 10 000krát větším, než byla koncentrace zlatých nanočástic. NLS o sekvenci CGGGPKKKRKVGG v koncentraci 100 000krát větší, než byla koncentrace zlatých nanočástic. Po 24 hodinách bylo možné nanočástice použít pro další experimenty.

4.4.7 Příprava Dulbeccova modifikovaného Eaglova média (DMEM)

Do 1000 ml kádinky umístěné na magnetickém míchadle byl k 1,2 g hydrogenuhličitanu sodného přidán práškový obsah lahvičky Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, s L-glutaminem a 15 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HEPES, bez fenolové červeně (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri), poté bylo přidáno 890 ml Milli-Q reagent grade ultračisté vody. Po rozpuštění bylo přidáno 10 ml roztoku antibiotik (streptomycin 10 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, penicilin 10 000 $\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 100 ml rozmraženého fetálního bovinního séra. pH výsledného roztoku bylo upraveno přidávkem roztoku hydroxidu sodného (10 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) na 7,2. Roztok byl sterilizován filtrací přes 0,2 μm filtr, pomocí filtračního setu Nalgene™ Rapid-Flow™ v laminárním boxu.

4.4.8 Kultivace osteosarkomových buněk 143B

Linie osteosarkomových buněk 143B byla získána pomnožením ze zmražených buněk v kapalném dusíku (Mayo Clinic Cryostorage, Rochester, MN). Obsah kryozkumavky byl dispergován do 15 ml kultivačního média. Buňky byly kultivovány v DMEM s přidavkem 1% (obj.) roztoku antibiotik (streptomycin 10 000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, penicilin 10 000 IU. ml^{-1}) a 10% (obj.) bovinním fetálním sérem, v inkubátoru s 90% vlhkostí a 5% CO_2 při teplotě 37 °C.

4.4.8.1 Pasážování buněk

K pasážování buněk bylo přistoupeno v okamžiku, kdy buňky dosáhly konfluence 70–80 %. Za aseptických kautel v laminárním boxu, po pečlivé desinfekci uzávěru kultivační lahve 60% ethanolem, bylo původní vyčerpané médium odsáto z kultivační nádoby a adherované buňky omyty PBS (10 ml). Po odsátí PBS bylo napipetováno do kultivační nádoby 1,5 ml 0,5% roztoku trypsinu, přebytek byl odstraněn. Buňky byly vloženy zpět do inkubátoru na 2 minuty.

Úspěšnost trypsinizace byla ověřena invertním mikroskopem (zakulacení buněk, odloučení od povrchu nádoby). K takto vzniklé buněčné suspenzi bylo přidáno 10 ml ohřátého (37 °C) DMEM média. Do nových sterilních kultivačních nádobek bylo napipetováno 14,5 ml čerstvého, ohřátého (37 °C) DMEM média a 0,5 ml buněčné suspenze získané trypsinizací.

4.4.9 Testování toxicity *in vitro*

Toxicita připravených nanočástic byla ověřována s použitím CellTiter 96® AQueous One Solution – cell proliferation assay kit. Metoda je založena na redukci tetrazoliové soli (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium a tvorbě barevného formazanu. Metoda byla provedena ve sterilní 96jamkové mikrotitrační destičce. 100 μl média s koncentrací 10^5 buněk/1 ml bylo napipetováno do každé jamky mikrotitrační destičky. Buňky byly následně 24 hodin inkubovány v inkubátoru s 5 % CO_2 při teplotě 37 °C. Po 24 hodinách byla vzniklá monovrstva buněk promyta v lineárním boxu sterilním PBS a poté inkubována se 100 μl konjugátů zlatých nanočástic (0,4 mM ZA, BS) v kompletním médiu (DMEM) pro buněčné kultury. Všechny vzorky nanočástic zlata byly před použitím ošetřeny expozicí UV zářením po dobu 20 min. v laminárním boxu pro vyloučení

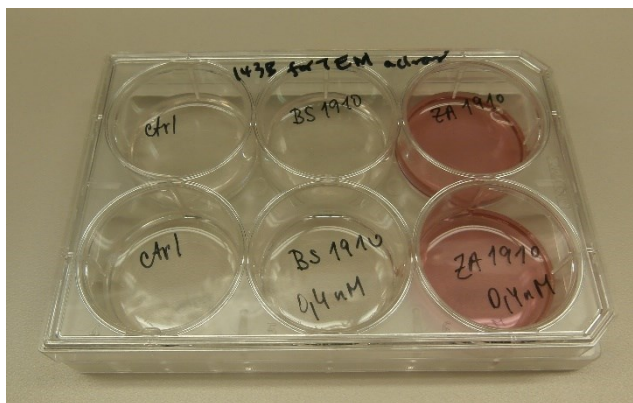
bakteriální kontaminace. 100 μ l 10 % (obj.) roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO) v kompletním médiu pro buněčné kultury bylo použito jako pozitivní kontrola pro všechny buněčné linie. Po 24hodinové expozici bylo médium odstraněno a monovrstva buněk promyta sterilním PBS. Po promytí bylo do každé jamky přidáno 100 μ l roztoku činidla CellTiter 96 naředěného v poměru 1:6 (obj.) s DMEM médiem. Po přidání činidla byla 96jamková destička ponechána 1 hodinu v inkubátoru s 5 % CO₂ při teplotě 37 °C a následně byla měřena absorbance při 490 nm na platereader – spektrofotometru. Pro každý vzorek nanočástic byly provedeny tři nezávislé experimenty. Viabilita buněk byla vypočtena jako poměr vůči absorbanci buněk neexponovaných zlatým nanočásticím. Data byla vyhodnocována se směrodatnou odchylkou (n = 3).

4.4.10 Uptake zlatých nanočástic nefunkcionalizovaných signálními peptidy

Pro ověření lokalizace zlatých nanočástic v buňkách byly buňky 143B o densitě $5,0 \times 10^4$ kultivovány v 6jamkové sterilní destičce (Obrázek 44), opatřené na dně Aclar filmem pro následné zpracování vzorku pro elektronovou mikroskopii. Po dosažení konfluence 75-80 % bylo médium vyměněno za 2 ml média obsahujícího konjugáty zlatých nanočástic (BS, ZA) o koncentraci $0,4 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Buňky byly 24 hodin inkubovány v inkubátoru s 5 % CO₂ při teplotě 37 °C. Dále byly vzorky zpracovány pro vyhodnocení TEM.

4.4.11 Uptake zlatých nanočástic funkcionalizovaných signálními peptidy

Pro ověření lokalizace funkcionalizovaných zlatých nanočástic (BS, ZA) s CPP a CPP + NLS v buňkách, byly buňky 143B o densitě $5,0 \times 10^4$ kultivovány v 6jamkové sterilní destičce, opatřené na dně Aclar filmem pro následné zpracování vzorku pro elektronovou mikroskopii. Po dosažení konfluence 75–80 % bylo médium vyměněno za 2 ml média obsahujícího konjugáty zlatých nanočástic (BS, ZA) o koncentraci $0,4 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Buňky byly 24 hodin inkubovány v inkubátoru s 5 % CO₂ při teplotě 37 °C. Dále byly vzorky zpracovány pro vyhodnocení TEM.



Obrázek 44: 6jamková sterilní destička s Aclar filmem, adherovanými buňkami 143B, připravená pro inkubaci s nanočásticemi BS a ZA.

4.4.12 Transmisní elektronová mikroskopie

Pro zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii byly buňky nejdříve promyty dvakrát PBS a poté fixovány Trumpovým fixačním roztokem. Po fixaci byly následně promyty 3krát 30 min. v lázních fosfátového pufru ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$) o pH 7,2 a 1 hodinu fixovány ve fosfátem pufrovaném 1% roztoku oxidu osmičelého. Po promytí v destilované vodě 3krát 30 min. byly buňky obarveny 2% octanem uranylu po dobu 30 min. při 60°C . Po této proceduře následovalo promytí 3krát v destilované vodě a dehydratace vzorku ve vzestupné ethanolové řadě. Nakonec ve směsi ethanol – propylenoxid. Na závěr byly buňky převedeny do 100 % propylenoxidu. Následovalo zalití do Spurrovy pryskyřice. Tenké řezy byly zhotoveny na Reichertově ultramikrotomu Ultracut E. Po umístění na měděnou mřížku byly vzorky obarveny citronanem olovnatým. Výsledné TEM snímky byly pořízeny mikroskopem JEOL JEM-1400 při urychlovacím napětí 80 kV.

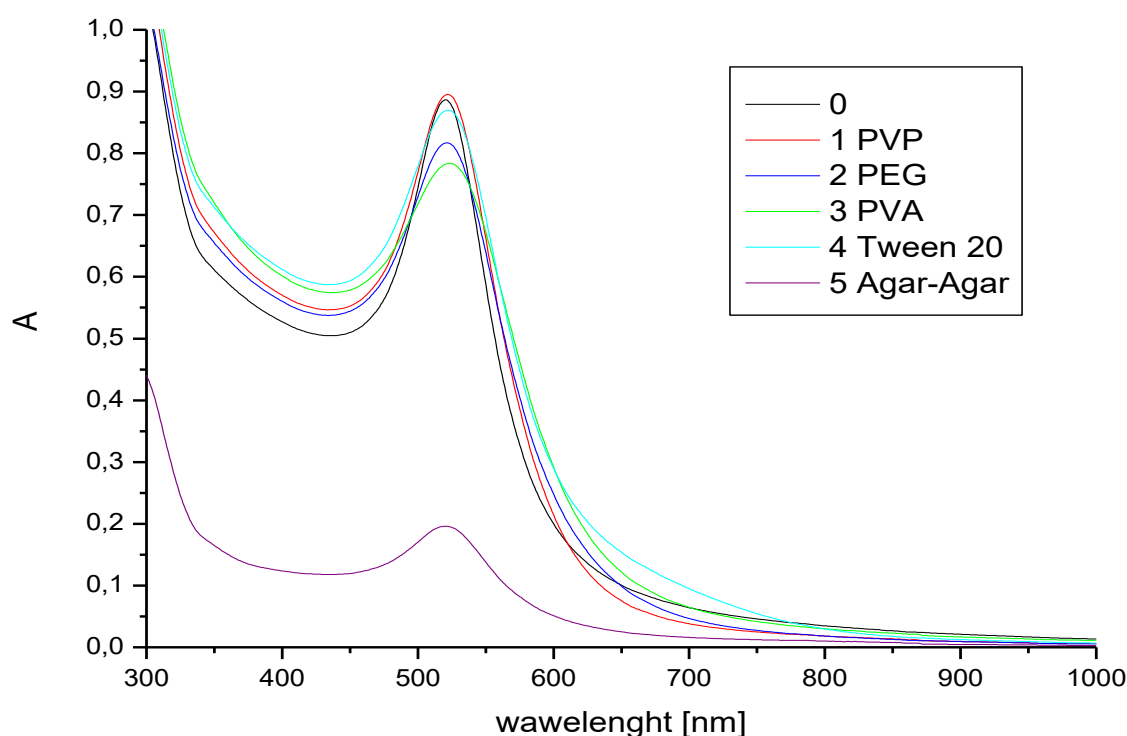
5 Výsledky a diskuse

5.1 Příprava a charakterizace nanočástic Au, Ag, Cu

5.1.1 Nanočástice zlata (Au)

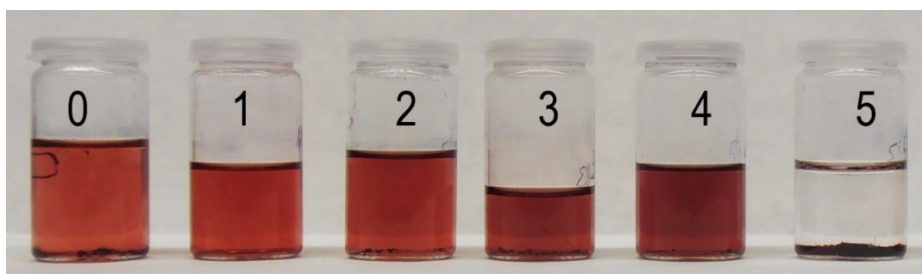
Nanočástice zlata byly připraveny redukcí kyseliny tetrachlorozlatité kyselinou askorbovou. Kyselina askorbová slouží jako redukční a stabilizační činidlo zlatých nanočástic. Uvedený postup dovoluje připravit reprodukovatelně nanočástice různých velikostí s ohledem na reakční podmínky. Připravené nanočástice zlata jsou díky použití netoxického redukčního činidla vhodné pro potenciální aplikace v biologii a medicíně.

Pro zvýšení stability připravených koloidů byly testovány různé stabilizátory. Připravené nanočástice byly stéricky stabilizovány přidavkem polymerních sloučenin/surfaktantů. Za tímto účelem byly testovány různé ve vodě rozpustné polymery (PVP – polyvinylpyrrolidon, PEG – polyethylenglykol, PVA – polyvinylalkohol, Tween 20, Agar-agar).



Obrázek 45: Průběh absorpčních křivek pro nanočástice zlata ZAl s použitím různých stabilizátorů.

Z testovaných stabilizačních přísad se jako nejvhodnější jevil PVP (č.1, Obrázek 46) a Tween 20 (č. 4, Obrázek 46), kde i po 6 měsících nejsou přítomny sedimentované velké částice na dně vialek. U koloidu bez přídavku stabilizátoru (č. 0, Obrázek 46) je na dně také patrná tvorba usazeniny způsobená agregací nanočástic. Zcela nevhodný byl přírodní polysacharid agar-agar, kde došlo po jeho přidání ke koloidu připravených nanočástic ke koagulaci (č. 5, Obrázek 46). Pro stabilizaci připravených koloidů byl zvolen PVP jako neiontový blokový kopolymer, který je považován za biokompatibilní⁴⁷, navíc Tween 20 má vlastnosti neiontového tenzidu, čímž by mohl dále ovlivňovat případné testování vlastností nanočástic.



Obrázek 46: *Připravené koloidy nanočástic zlata ZA1 s různými stabilizátory – po 6 měsících.*

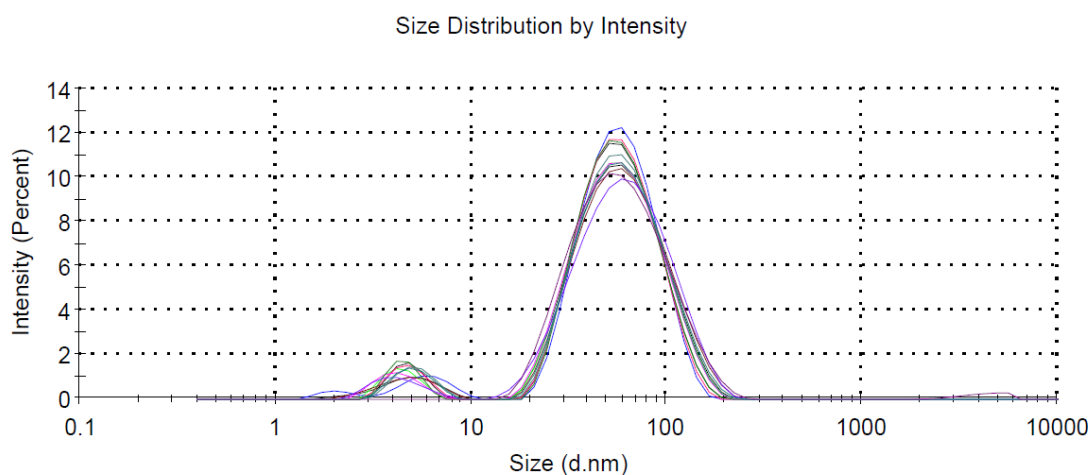
U připravených nanočástic byla měřena jejich velikost a ζ potenciál, a to jak pro nanočástice označené Au stabilizované pouze kyselinou askorbovou a Au_PVP. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 5) a (Tabulka 6).

Tabulka 5: *Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Au.*

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
Au1	43,78	2,62	-27,41	5,53
Au2	40,99	2,05	-32,56	3,53
Au3	45,15	2,03	-27,62	2,39

Tabulka 6: *Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Au_PVP.*

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
Au1_PVP	57,01	1,95	-16,57	3,53
Au2_PVP	53,10	2,22	-17,53	2,22
Au3_PVP	53,46	2,59	-15,05	1,66

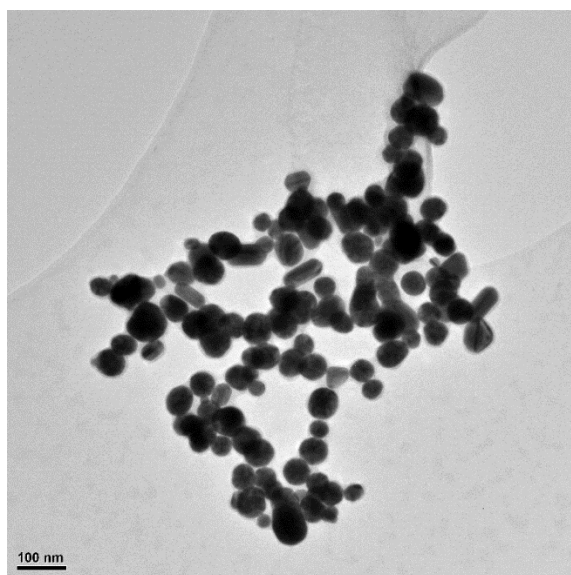


Obrázek 47: *Distribuční křivky pro nanočástice Au1.*

Z uvedených hodnot je patrné, že nanočástice Au mají menší hydrodynamický průměr, než mají nanočástice stabilizované přídavkem PVP (Au_PVP), což je v souladu s představou vytvoření polymerní vrstvy kolem vzniklé kovové nanočástice. Syntetické podmínky, resp. poměr výchozích látek nemá zásadní vliv na velikost připravených koloidních systémů.

ζ potenciál nanočástic stabilizovaných PVP klesá, což by mohlo být vysvětleno stíněním potenciálu kovové nanočástice navázanou polymerní vrstvou PVP. Tvar distribuční křivky (Obrázek 47) vykazuje dvě maxima, menší maximum odpovídá frakci nanočástic zlata o velikosti kolem 5 nm. Tento bimodální průběh distribuce velikosti částic by mohl odpovídat stavu, kdy pík menší velikosti odpovídá primárním nanokrystalům a větší odpovídá agregačním růstem vzniklým větším nanočásticím. Pozorování časných bimodálních průběhů distribuce nanokrystalů by mělo být připisováno spíše agregačnímu růstu než Ostwaldovu zrání¹⁷⁷.

Pro vzorek nanočástic Au1 byl zhotoven i SEM mikrogram, který zobrazuje mimo kulovitých nanočástic také nanotyčky a nanotrojúhelníky (Obrázek 48).



Obrázek 48: Nanočástice Au1 v SEM.

Sonikace, tedy použití ultrazvuku na nanočástice se využívá s cílem rozrušit případně vzniklé agregáty nanočástic. Některé postupy využívají ultrazvuk i pro lepší modifikaci povrchu nanočástic.^{178,179} Připravené nanočástice byly ultrazvukovány v lázni po dobu 10 minut a poté měřen hydrodynamický průměr a velikost ζ potenciálu (Tabulka 7).

Tabulka 7: Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Au po 10 min. působení ultrazvuku.

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
Au1_UZ	52,91	3,88	-26,77	1,96
Au2_UZ	46,71	2,38	-31,90	2,21
Au3_UZ	46,18	3,37	-21,61	3,07

Po vystavení koloidní suspenze zlatých nanočástic ultrazvuku došlo u vzorku Au1 k malému nárůstu velikosti hydrodynamického průměru. U vzorku au1_PVP, jež byl vystaven ultrazvuku poklesla hodnota měřeného hydrodynamického průměru na polovinu původní

hodnoty (z 57 nm na 32,18 nm). V tomto případě mohlo dojít pomocí ultrazvuku k rozrušení vzniklých agregátů (Tabulka 8).

Tabulka 8: *Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Au_PVP po 10 min. působení ultrazvuku.*

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
Au1_PVP_UZ	32,18	1,38	-17,74	2,63
Au2_PVP_UZ	54,48	3,37	-16,76	2,03
Au3_PVP_UZ	59,32	3,55	-14,97	1,95

5.1.2 Nanočástice stříbra

U nanočástic stříbra připravených redukcí tetrahydridoboritanem sodným byla měřena velikost jejich hydrodynamického průměru po přípravě, tak i po stabilizaci pomocí PVP. Množství tetrahydridoboritanu sodného vystupujícího v reakci je nadstechiometrické. Naadsorbované anionty tetrahydridoboritanu se také částečně podílí na elektrosterické stabilizaci. Získané hodnoty hydrodynamických průměrů a ζ potenciálu jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 9) a (Tabulka 10).

Tabulka 9: *Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic stříbra Ag.*

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
Ag1	57,26	12,38	-26,78	6,09
Ag2	28,60	1,8	-45,87	3,40
Ag3	32,30	2,30	-39,00	4,32

Největší nanočástice s hydrodynamickým průměrem 54,47 nm poskytuje postup Ag1 pro nanočástice, které nebyly stabilizovány přidavkem PVP. Oproti zlatým nanočásticím nedochází u stříbrných nanočástic po stabilizaci PVP k nárůstu hydrodynamického průměru, spíše je patrný opačný trend. Zatímco zlaté nanočástice naadsorbováním PVP na svůj povrch

zvětšují svůj hydrodynamický průměr, zde dochází k nárůstu hydrodynamického průměru u nanočástic, které nebyly stabilizovány PVP. Vrstva polymerního PVP přidaná ihned po přípravě zde může fungovat jako bariéra a bránit případné koalescenci.¹⁸⁰ U nestabilizovaných nanočástic pomocí polymeru PVP může docházet připojování stříbrných iontů na povrch částic ke zvětšování jejich průměru, resp. hydrodynamického průměru. K ověření tohoto faktu je třeba využít mikroskopických metod.

Tabulka 10: *Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic stříbra Ag_PVP.*

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
Ag1_PVP	50,65	2,18	-25,38	4,51
Ag2_PVP	25,32	1,34	-23,07	4,00
Ag3_PVP	30,34	1,26	-27,76	4,22

I u stříbrných nanočástic lze, podobně jako u zlatých nanočástic, sledovat podobný fenomén poklesu ζ potenciálu u vzorků s přídavkem PVP jako stabilizačního činidla. Jak bylo zmíněno dříve, hranice stability odpovídající hodnotě potenciálu $\zeta > \pm 30$ mV nemusí zcela pro nanočástice platit.

Tabulka 11: *Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Ag po 10 min. působení ultrazvuku.*

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
Ag1_UZ	56,88	3,16	-31,02	2,48
Ag2_UZ	35,49	2,75	-48,28	3,19
Ag3_UZ	36,42	2,32	-40,29	2,4

Jeho pokles může být způsoben stíněním elektrostatického potenciálu kovových nanočástic polymerní vrstvou PVP. Zjištěná nižší hodnota ζ potenciálu proto nemusí mít za následek nižší stabilitu nanočásticového koloidu (může být vykoupena sterickou stabilizací

koloidu). U nanočástic stříbra nedošlo k výrazným změnám ve velikosti hydrodynamického průměru ani nemělo použití ultrazvuku vliv na změnu ζ potenciálu připravených koloidů.

Tabulka 12: *Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Ag_PVP po 10 min. působení ultrazvuku.*

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
Ag1_PVP_UZ	48,62	2,57	-24,72	2,83
Ag2_PVP_UZ	26,02	1,36	-31,48	2,96
Ag3_PVP_UZ	31,39	2,06	-26,38	3,62

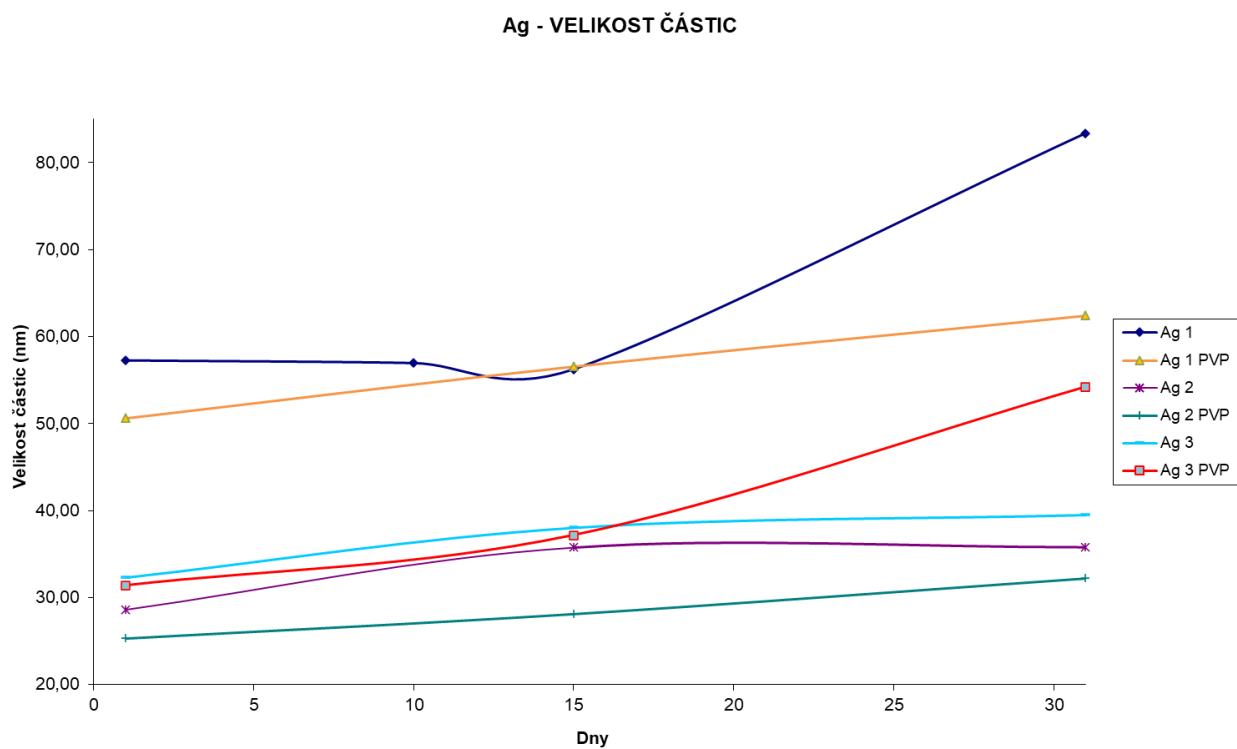
Dále byl sledován vývoj změny hydrodynamického průměru a ζ potenciálu stříbrných nanočástic v čase v průběhu 30 dnů.

U všech připravených stříbrných nanočástic (Ag1–Ag3 a Ag1_PVP–Ag3_PVP) dochází v průběhu jednoho měsíce k nárůstu velikosti hydrodynamického průměru. Nejstrmější nárůst lze sledovat u nanočástic stříbra Ag1 bez přídavku PVP a u nanočástic stříbra stabilizovaného Ag3_PVP. U ostatních nanočástic je nárůst velikosti nanočástic pozvolnější (Obrázek 49).

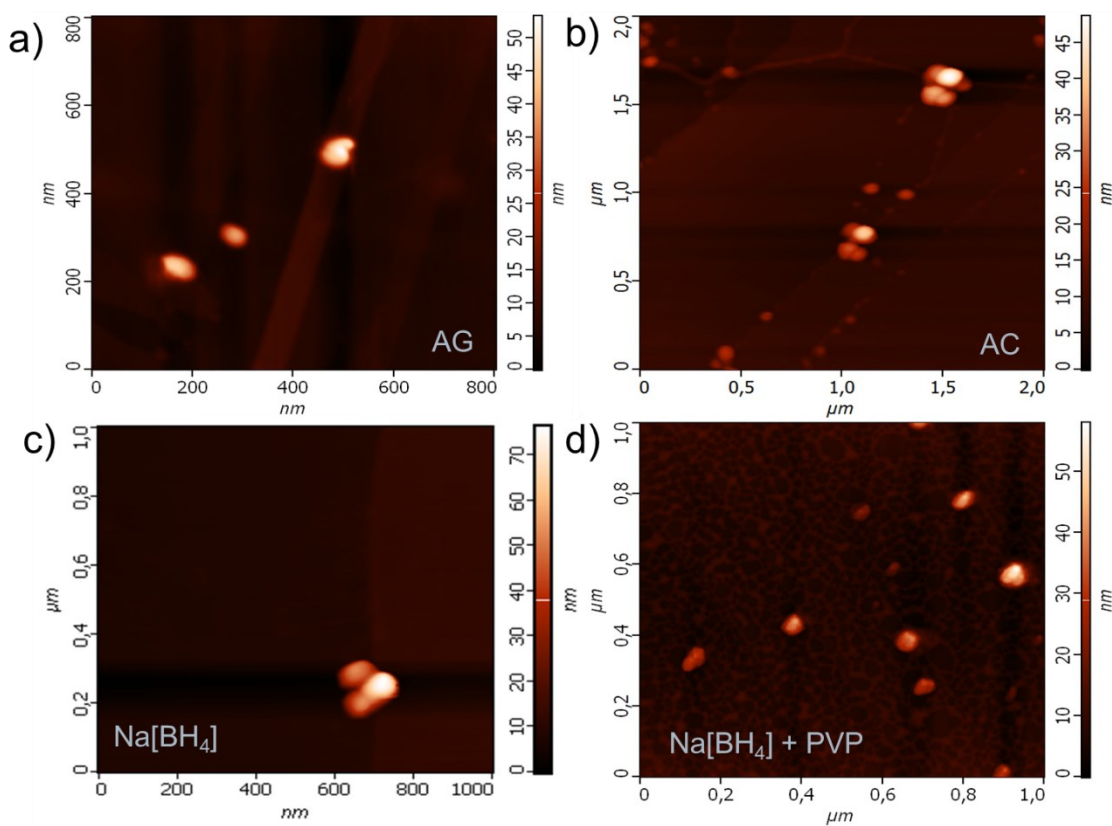
Nanočástice stříbra připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti citronanu sodného mají oproti nanočásticím připraveným pomocí tetrahydridoboritanu sodného větší hodnoty hydrodynamických průměrů. Hodnoty jejich hydrodynamického průměru a ζ potenciálu jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 13) společně s hodnotami změřenými pro nanočástice stříbra připravené Tollensovým způsobem.

Tabulka 13: *Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic stříbra AC a AG.*

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
AC	60,82	1,29	-29,40	1,24
AG	36,35	1,183	-29,6	1,52



Obrázek 49: *Hydrodynamický průměr nanočástic stříbra Ag v závislosti na čase.*



Obrázek 50: *AFM topogramy připravených nanočástic stříbra.*

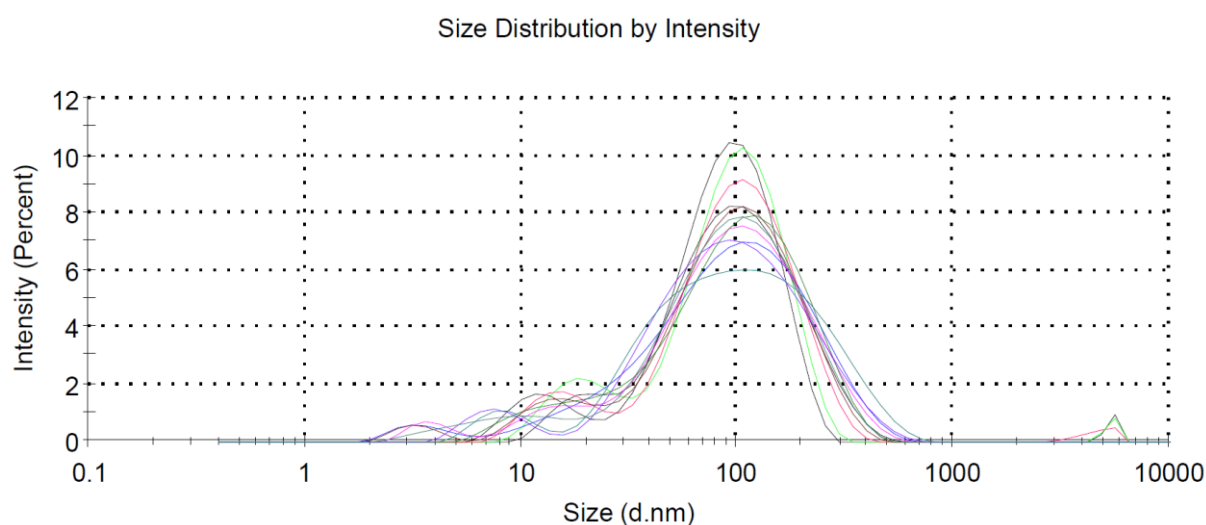
U vybraných nanočástic byla hodnocena i jejich morfologie pomocí AFM (Obrázek 50).

Nanočástice stříbra získané redukcí Tollensovým způsobem a tetrahydridoboritanem sodným mají dle AFM sférický tvar, nanočástice připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti citronanu sodného mají tvar diskovitý. Rozměry jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 14).

Získané rozměry nanočástic stříbra jsou v dobrém souhlasu s hodnotami získanými měřením hydrodynamického průměru. Zajímavý je výsledek pro nanočástice stříbra připravené v prostředí citronanu sodného jako stabilizátoru, který poskytuje čočkovité/diskovité nanočástice s popsanou polydisperzitou. Fluktuace velikostí je patrná i z distribučních křivek pro AC (Obrázek 51).

Tabulka 14: Parametry nanočástic stříbra získané pomocí AFM.

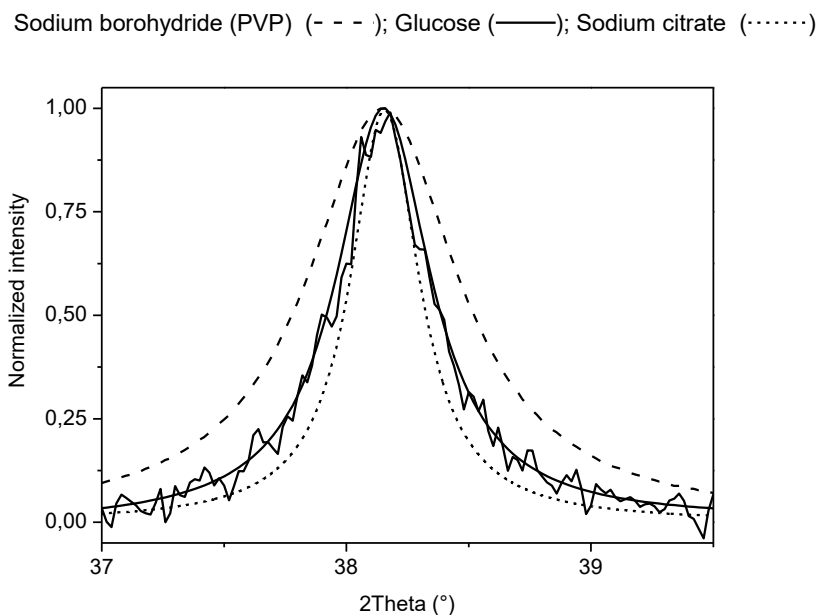
Název	AFM velikost [nm]	Tvar	Poznámka
AC	70-130 nm v průměru, výška 40 nm	diskovité/čočkovité	výrazně polydisperzní
AG	30-50 nm	kulovité	-
Ag3	60-70 nm	kulovité	-
Ag3_PVP	45-60 nm	kulovité	hrubý povrch, polymerní micely



Obrázek 51: Distribuční křivky velikostí nanočástic AC.

Morfologický popis nanočástic Ag₃_PVP se liší od ostatních nanočástic, které měly hladký povrch. PVP přítomný v koloidu nanostříbra po odpaření vody způsobil zhrubnutí povrchu s přítomností jednotlivých micel polymeru. Ze získaných dat je patrné, že částice Ag₃, které nebyly stabilizovány jsou větší ve srovnání s nanočásticemi Ag₃_PVP, což je v souladu se zjištěním výše. PVP jako stabilizátor zabraňuje v okamžiku přidání dalšímu připojování atomů stříbra a dalšímu nárůstu velikosti nanočástic.

Pro ověření velikosti nanočástic bylo využito i XRD, dle Schererovy rovnice dochází k rozšiřování pásu (full width at half max.) se snižující se velikostí částic. Byla měřena nejintenzivnější difrakce K α kubické struktury na 38,2°. Experimentální data se fitovala Lorenzovskou funkcí. Pološířky klesají v pořadí: Ag₃_PVP>AG>AC. Z toho je patrné, že Ag₃_PVP částice, které mají na AFM podobnou velikost jako částice AG jsou ve skutečnosti nejmenší (Obrázek 52).



Obrázek 52: XRD difraktogram – nafittovaná data pro nanočástice stříbra připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným = Ag₃_PVP, glukosou = AG a citronanem sodným.

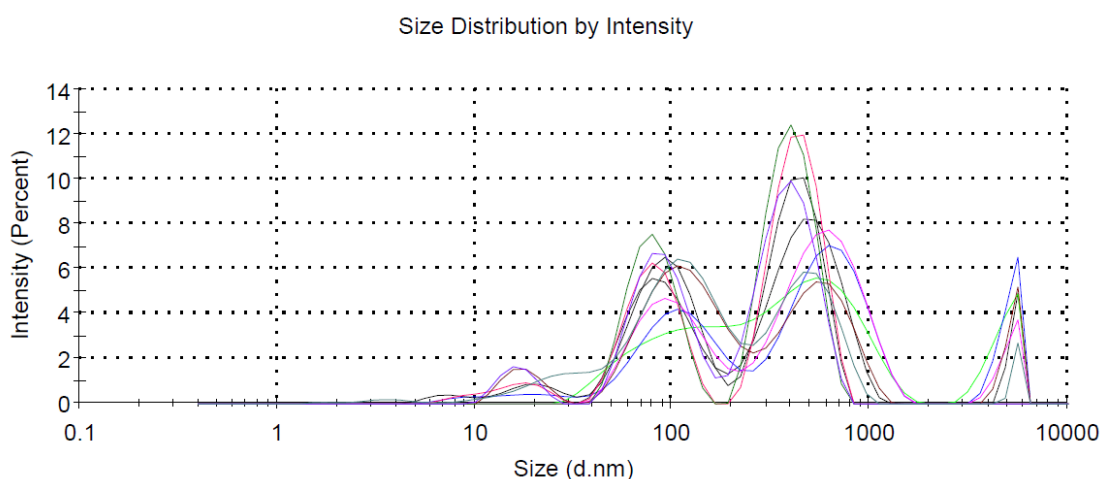
5.1.3 Nanočástice mědi

Nanočástice mědi byly připravovány redukcí tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti kyseliny askorbové. Kyselina askorbová působí jako stabilizátor vznikajících měděných nanočástic a chrání je před oxidací. Nanočástice mědi jsou velice reaktivní a snadno se oxidují vzdušným kyslíkem.

Nanočástice které nebyly stabilizovány PVP podléhaly rychlé zkáze a docházelo k jejich časně agregaci. Proto byly připraveny nanočástice mědi, které byly ihned po přidání tetrahydridoboritanu sodného stabilizovány stéricky přídatkem PVP. Hodnoty hydrodynamického průměru a potenciálu ζ jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 15).

Tabulka 15: *Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic mědi C.*

Název	Hydrodynamický průměr DLS D_h [nm]	Směrodatná odchylka [%]	ζ potenciál [mV]	Směrodatná odchylka [%]
C1	284,20	68,24	-5,77	0,57
C2	38,38	0,89	-11,6	1,69
C3	38,69	2,05	-12,6	2,58



Obrázek 53: *Distribuční křivky velikostí nanočástic C1 – polydispersní systém.*

Vzorek C1 má změřený hydrodynamický průměr násobně vyšší, než zbývající nanočástice mědi označené C2 a C3. Absolutní hodnota ζ potenciálu pro nanočástice mědi C1 je nízká.

Tento systém nanočástic vykazuje velkou polydispersitu (vysoká směrodatná odchylka). Distribuční křivka je uvedena na obrázku (Obrázek 53). Tento jev by mohl být vysvětlen stejným způsobem jako výše u nanočástic Ag. Přidáním PVP k disperzi nanočástic krátce po přidání redukčního činidla může vést k zastavení růstu jednotlivých nanočástic a dojde k vytvoření polydisperzního systému.

5.2 Testování antibakteriálních účinků připravených nanočástic Au, Ag, Cu

Cílem testování antibakteriálních účinků připravených koloidů nebylo jen zjistit, zda vykazují baktericidní či bakteriostatické účinky, ale také snaha odhalit faktory mající vliv na zjištěný antibakteriální účinek připravených koloidů za daných testovacích podmínek.

5.2.1 Difúzní diskový test

Za účelem testování bylo využito difúzní diskové metody. Jde o kvalitativní metodu, která má screeningový charakter. Předkladatel disertační práce prováděl ve své diplomové práci¹⁷² předběžné testování antimikrobiálních účinků diskovou metodou a došel k závěru, že pro dostatečnou odezvu by bylo vhodnější využít větších disků s možností aplikovat větší objem testovaného koloidu. Na agarovou plotnu v Petriho misce s naočkovanou kulturou bakterií bylo proto pro testování antibakteriálních účinků kovových nanočástic aplikováno 150 μ l připraveného koloidu nanokovu na sterilní disk z filtračního papíru o hraně 3 cm.

Běžně používaným médiem pro testování antibiotik je Mueller-Hintonův agar, avšak v současné literatuře není jednotnost ve výběru vhodného kultivačního média pro testování nanočástic, zvláště kovových nanočástic. Mnozí autoři používají různé testovací půdy (Luria Bertani agar, trypton-sójový agar, BHI agar – z infuze z telecího mozku a hovězího srdce, Mueller-Hintonův kationtově adjustovaný agar – používaný pro testování antibiotika kolistinu,)^{69,93,96,118,181}. Duval⁹⁶ et al. také na tento problém později poukázali ve své práci z roku 2019 a např. pro testování nanočástic stříbra preferovali použití kationtově adjustovaného Mueller-Hintonova agaru.

V našem případě jsme zvolili jednoduchá média pro nenáročné mikroorganismy – masopeptonový agar pro bakterie, resp. MALT agar pro kvasinky.

Při difúzní diskové metodě je využíván postup, který je běžný pro testování antibiotik, avšak tato metoda je původně navržena pro testování molekul antibiotik, jež jsou obvykle schopny difundovat z přiloženého disku do agarového média.^{95,96,182} Jak bylo uvedeno výše, je tato metoda mnoha autory prováděna i za účelem testování nanočástic^{69,93,96,118,181}. Nanočástice kovů mají již ze své podstaty jiné chování, než organické molekuly a je zřejmé že i testování nanočástic s sebou ponese určitá úskalí.

Metoda je založena na difúzi testované látky do média a vytváří gradient koncentrace, což vede k vytvoření inhibičních zón, kde je koncentrace dostatečná k inhibici růstu inokulovaného mikroorganismu. Průměry inhibičních zón jsou v případě antibiotik klasifikovány do kategorií citlivosti pro jednotlivé mikroorganismy. Je třeba zmínit, že průměr zón ovlivňuje několik faktorů, které souvisí s testovanou látkou (obsah disku, rychlost difúze, aktivita proti testovanému mikroorganismu), použitým agarem (hloubka, složení), inkubačními podmínkami (teplota, doba trvání, atmosféra) nebo mikroorganismem (rychlost růstu, hustota inokula).¹⁸²

Pro testování antimikrobiálních vlastností byly na základě zjištěných parametrů připravených koloidů nanočástic testovány následující nanočástice – koloidy nanočástic zlata s označením Au1, Au2, nanočástice stříbra AC, AG a koloidy nanočástic mědi C1, C2, C3.

Odečtené hodnoty zón inhibice jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 16).

Tabulka 16: *Hodnoty inhibičních zón testovaných nanočástic pro jednotlivé testované mikroorganismy.*

testovaná kultura	Au1	Au2	AC	AG	C1	C2	C3
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 mm	0,5 mm	1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0,5 mm	1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	1 mm
<i>Candida albicans</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	0,5 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0,5 mm	0 mm

Vyhodnocením inhibičních zón difúzního diskového testu nebyly prokázány baktericidní vlastnosti testovaných koloidů. Inhibiční zóny byly u vzorku nanočástic Au2 zcela minimální a to pro testované kmeny *Staphylococcus aureus* tak pro *Escherichia coli*. Minimální inhibiční zónu vykazovaly nanočástice mědi C2 a C3 pro *E. coli* resp. pro kvasinku *Saccharomyces*.

Malé rozměry inhibičních zón mohou být způsobeny i nedostatečnou difuzibilitou nanočástic do agarového média. Navíc aplikací nanočástic na disk z filtračního papíru může být zabráněno kontaktu s testovacím médiem. Mezi antibakteriální mechanismy nanočástic patří mimo jiné jejich schopnost uvolňovat své ionty do okolí. Pokud by však byly nanočástice dostatečně stabilní, nemusí k tomuto efektu rozpouštění dojít. Důvodem nezdaru experimentu může být i agregace nanočástic, které tak mohou ztratit své antibakteriální účinky.

Z míst po odstranění disků byl proveden stěr, který byl kultivován na sterilní půdě. Ve všech případech došlo k opětovnému nárůstu bakterií. V uvedeném provedení testované nanočástice nevykazovaly baktericidní vlastnosti.

5.2.2 Makrodiluční metoda

Antibakteriální vlastnosti připravených nanočástic byly testovány makrodiluční bujónovou metodou. Za tímto účelem byly připraveny bakteriální suspenze *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* s různými koncentracemi testovaných koloidních disperzí nanokovů ve fyziologickém roztoku. Bakteriální suspenze byla poté inkubována v termostatu při teplotě 37 °C. V časových intervalech 5 a 24 hodin byly jednotlivé bakteriálních suspenze vyočkovány na sterilní agarové plotny. Po 24 hodinách byly počítány narostlé kolonie. V tabulkách je uveden průměr z provedených duplikátů. Před použitím vlastních koloidů nanočástic byla upravena hodnota pH tak, aby se pohybovala v rozmezí 7-8 pH. Hodnoty pH jednotlivých koloidů jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 17).

Tabulka 17: pH testovaných koloidů nanočástic

vzorek	AC	AG	Au1	Au2	C3
pH	9,43	11,7	3,09	3,00	4,60

Tabulka 18: *Testované koloidy nanočástic – Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>					
				po 5 hod.	po 24 hod.
vzorek	c_{vzorku} [mg.dm ⁻³]	pH	V [ml]/10ml	počet kolonií	počet kolonií
AC	22,71	7,1	0,50	nepočítaně	0
			1,00	nepočítaně	0
			3,00	nepočítaně	0
AG	107,87	7	0,50	0	0
			1,00	0	0
			3,00	0	0
Au1	49,24	6,9	0,50	>>300	330
			1,00	9	6
			3,00	3	0
Au2	98,49	6,5	0,50	nepočítaně	0
			1,00	23	0
			3,00	0	0
C3	42,37	8	0,50	0	0
			1,00	0	0
			3,00	0	0

Hodnota výsledného pH upravených koloidů je uvedena v příslušné tabulce. Testování nanočástic stříbra, zlata a mědi vykazuje oproti výsledkům diskového difuzního testu baktericidní účinky na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* (Tabulka 18). Nižší koncentrace nanočástic zlata Au1 ani po 24 hodinách stafylokoka neusmrtila.

V případě testování připravených koloidů na gramnegativní bakterii *E. coli* si lze povšimnout, že velmi dobrý efekt vykazují stejně jako v případě *Staphylococcus aureus* nanočástice stříbra označené AG, baktericidní účinek mají po 24 hodinách i nanočástice AC.

Zatímco nanočástice zlata označené Au1 i Au2 vykazují vyšší baktericidní účinnost při vyšších koncentracích aplikovaného koloidu při působení na bakterii *Staphylococcus aureus*, tak nemají v daném testovacím rozsahu účinek na gramnegativní bakterii *E. coli* (Tabulka 19).

Nanočástice mědi při testování na obou bakteriálních kulturách vykazovaly baktericidní efekt. Nanočástice mědi jsou známy svou schopností snadno se rozpouštět za vzniku měďnatých iontů.

Tabulka 19: Testované koloidy nanočástic – *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>					
				po 5 hod.	po 24 hod.
vzorek	c_{vzorku} [mg.dm ⁻³]	pH	V [ml]/10ml	počet kolonií	počet kolonií
AC	22,71	7,1	0,5	nepočítaně	0
			1,0	nepočítaně	0
			3,0	>>300	0
AG	107,87	7	0,5	0	0
			1,0	0	0
			3,0	0	0
Au1	49,24	6,9	0,5	nepočítaně	nepočítaně
			1,0	nepočítaně	nepočítaně
			3,0	nepočítaně	nepočítaně
Au2	98,49	6,5	0,5	nepočítaně	nepočítaně
			1,0	nepočítaně	nepočítaně
			3,0	nepočítaně	nepočítaně
C3	42,37	8	0,5	0	0
			1,0	0	0
			3,0	0	0

Tabulka 20: Testované koloidy nanočástic – *Staphylococcus aureus* MPB

<i>Staphylococcus aureus</i>							
				1 hod.	3 hod.	6 hod.	24 hod.
vzorek	c_{vzorku} [mg.dm ⁻³]	pH	V [ml]/10ml	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií
AG	107,87	7,6	0,1	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.
			0,3	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.
			0,5	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.
			1	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.
			3	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.
Au1	49,24	7,4	0,5	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.
			1	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.
			3	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.
			5	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.

Tabulka 21: Testované koloidy nanočástic – *Escherichia coli* MPB

<i>Escherichia coli</i>							
				1 hod.	3 hod.	6 hod.	24 hod.
vzorek	c_{vzorku} [mg.dm ⁻³]	pH	V [ml]/10ml	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií
AG	107,87	7,6	0,3	nepoč.	nepoč.	589	0
			0,5	nepoč.	1382	2,5	0
			1	nepoč.	658,5	279	0
			3	nepoč.	1436	194,5	0
Au1	49,24	7,4	5	nepoč.	890	140	0

Následně byly testovány antibakteriální účinky nanočástic stříbra AG a nanočástic zlata Au1, cílem bylo ověřit jaký vliv bude mít změna kultivačního média na výsledek antimikrobiálních testů. Dle předchozích výsledků byly upraveny i škály ředění s tím rozdílem, že pro bakteriální suspenze byl použit masopeptonový bujón (MPB).

Tato změna vedla v případě ověření antimikrobiálních účinků nanočástic AG a Au1 ke ztrátě jejich účinnosti proti bakterii *Staphylococcus aureus* (Tabulka 20) oproti testování s použitím fyziologického roztoku (Tabulka 18). Antibakteriální účinky však vykazovaly zmíněné nanočásticové systémy proti *E. coli*. Zajímavý je výsledek nanočástic AG, kdy při použití vyšší koncentrace koloidu (3 ml) nedochází k poklesu počtu kolonií po 3 hodinách inkubace. Stejně tak není zcela patrná koncentrační závislost na poklesu počtu narostlých kolonií po 6hodinové expozici.

Rozdílnost získaných výsledků antibakteriálních účinků připravených nanočástic je ukázkou skutečnosti, že zjištěné údaje značně závisí na použité metodě a testovacích podmínkách.

Difúzní disková metoda je dobrý screeningový nástroj k posouzení antibakteriálních účinků, zvláště pak je vhodná pro určení citlivosti bakterie na antibiotikum. V případě testování kovových nanočástic může selhat. Problémem může být obtížná difuzibilita nanočástic do testovací půdy z přiloženého disku a záleží i na charakteru testovaných nanočástic (chránění polymerem, rychlost uvolňování iontů do prostředí, funkcionalizované nanočástice bioaktivními molekulami).

Rozdílné výsledky při testování antimikrobiálních účinků nanočástic mohou mít původ v několika faktorech. Úpravou pH původních koloidů může dojít k přiblížení se hodnotě pH v nulovém bodě pro daný koloid a dojít tak k jeho agregaci porušením

elektrostatické repulze. Při použití fyziologického roztoku, pro přípravu nanočásticové disperze k účelům testování, vystavujeme nanočástice prostředí o vysoké iontové síle, které může negativně ovlivňovat stabilitu testovaného koloidu a ovlivnit tak výsledek testu.

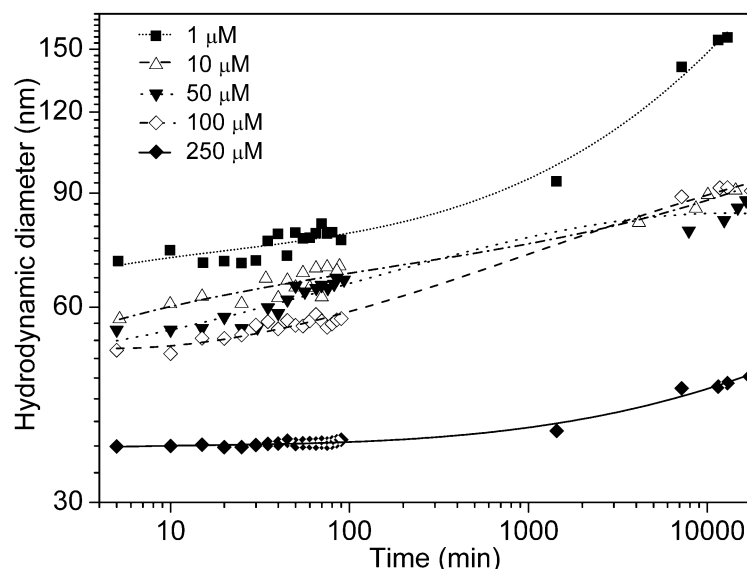
Při použití masopeptonového bujónu mohou přítomné biomolekuly jako je pepton, aminokyseliny a další ovlivňovat stabilitu nanočástic. Může dojít i k tvorbě proteinové korony kolem nanočástice a tím i ke snížení antibakteriální účinnosti nanočástic. Pro sledování kinetiky chování nanočástic v čase je uvedená metoda („time kill“ test) velice vhodná. Jde však o metodu pracnou a časově náročnou, proto se zcela nehodí pro rutinní testování. Z tohoto důvodu většina autorů volí metodu mikrodiluční, která může být zatížena mnoha chybami uvedenými v kapitole 3.6.6.2. Pro testování antimikrobiálních účinků nanočástic kovů dosud neexistuje jednotné doporučení. Hodnoty MIC se proto mohou pro jednotlivé nanočástice mezi autory významně lišit.^{71,99} Ke každé metodě by proto měla být provedena charakterizace koloidu a uvedeny podmínky za kterých byl test prováděn.

5.3 Studium chování stříbrných nanočástic v tekutém médiu pro testování ekotoxicity

Masová produkce nanomateriálů a jejich uvolňování do životního prostředí představuje potenciální rizika. Rychlost aplikačního využití nanomateriálů předbíhá často naše znalosti o jejich chování v životním prostředí, schopnosti akumulace a jejich transformace. Hlavním problémem je nedostatečná fyzikálně-chemická charakterizace nanomateriálů před, během a po ekotoxikologických experimentech. Faktory jako chyby v měření, změny experimentálních metod, různé expoziční scénáře a délky expozice, různá kapalná média a nízké detekční limity analytických technik přispívají k nízké reprodukovatelnosti dat.¹⁸³ Proto jsme se rozhodli sledovat chování koloidu nanočástic stříbra (AG) při ředění demineralizovanou vodou a v jednoduchém testovacím médiu M 203 dle OECD, pro testování akutní akvatické toxicity a simulovat tak chování nanočástic v průběhu experimentu.

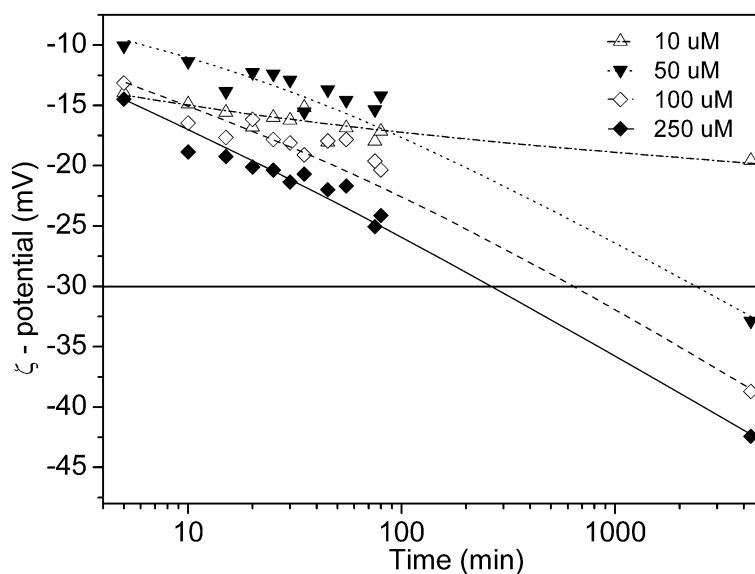
Pro testování byl zvolen stabilní koloid AG, který vykazoval dlouhodobou stabilitu (déle než 30 dnů). Zkouška akutní toxicity pro ryby popsaná v pokynu OECD 203 navrhuje použití kvalitní přírodní vody, nebo nejlépe rekonstituované vody o celkové tvrdosti 10 - 250 mg.dm⁻³ CaCO₃ a pH 6,0 - 8,5 připravené z demineralizované vody a vhodných směsí solí. Toto kultivační médium se vyznačuje relativně vysokou iontovou silou, což je další důležitý parametr ovlivňující agregaci nanočástic a následně výsledky testů ekotoxicity.

Zaznamenané hodnoty hydrodynamického průměru D_h stříbrného koloidu AG při ředění demineralizovanou vodou v koncentračním rozmezí od 1 do 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jsou uvedeny na obrázku (Obrázek 54).



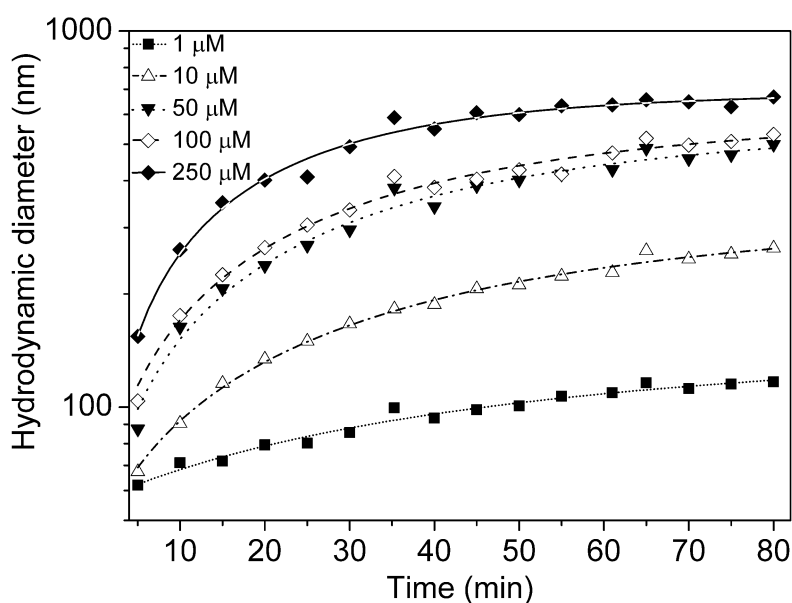
Obrázek 54: Časová závislost nárůstu hydrodynamického průměru D_h nanočástic AG při jejich ředění demineralizovanou vodou (koncentrace 1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Hodnoty hydrodynamického průměru (D_h) stabilního AG koloidu se ředěním zvýšily ze 40 nm (250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ag) na 70 nm (1 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ag). Toto zvýšení hodnot D_h naznačuje agregační chování stříbrných nanočástic způsobené změnami iontové síly v primárním koloidu AG jeho ředěním demineralizovanou vodou. Tento jev podporují i nízké hodnoty zeta potenciálu (-10 až -15 mV), které svědčí o snižování stability koloidního systému (Obrázek 55). Dále je patrné, že se systémy stříbrných nanočástic v čase stabilizovaly agregací, čemuž nasvědčuje nárůst hodnot D_h , ale také zvýšení absolutních hodnot ζ potenciálu. Změny D_h byly velmi pomalé, ale zřetelné, a dosáhly maximálně dvojnásobných hodnot výchozích hodnot D_h během experimentální doby 13 000 minut (9denní experiment nutný pro toxikologické hodnocení). Tento nárůst by mohl souviset s fenoménem opačným k popsanému jevu komprese Sternovy vrstvy. Koloidní systém dosáhl empirické hodnoty stability koloidního systému -30 mV nejdříve za 2 000 minut po zředění pro koncentrace > 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnoty -30 mV nebylo dosaženo pro koncentraci nanočástic 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ani při extrapolaci na nekonečno.



Obrázek 55: Časová závislost ζ potenciálu nanočástic AG při jejich ředění demineralizovanou vodou (koncentrace 1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Dále byla sledovaná agregační stabilita výchozího koloidu AG v prostředí média 203 o vysoké iontové síle ($680 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$). Chování nanočástic stříbra bylo sledováno pro koncentrace v rozmezí 1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ag.



Obrázek 56: Časová závislost hydrodynamického průměru D_h nanočástic AG při jejich ředění médiem 203 (koncentrace 1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Nárůst D_h v čase 5 minut po přípravě pro médium 203 v koncentračním rozmezí 1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ag jasně ukázal rozdíly v chování stříbrných nanočástic v demineralizované vodě a v médiu 203. Zatímco v médiu 203 byl nejvyšší nárůst hodnoty D_h pro experimentální čas 5 minut pro koloid o koncentraci 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ag, tak v experimentu s demineralizovanou vodou byl tento nárůst pro nejnižší koncentraci 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ag.

U koloidního systému připraveného ředěním s médiem 203 byly nejvyšší hodnoty D_h dosaženy v 5. min měření u nejkonzentrovanejší disperze koloidu 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ag ($D_h = 170$ nm). Rychlost, míra aglomerace a konečná velikost aglomerátů se výrazně liší. U nejkonzentrovanejšího koloidu se začaly objevovat i aglomeráty velikosti D_h 650 nm v 80. minutě měření a došlo k jejich sedimentaci na dno kyvety.

Konstanty rychlosti agregace (k) a konečný D_h pro ustálený stav byly úměrné koncentraci nanočástic. Pro kvantifikaci tohoto procesu byl nárůst D_h v závislosti na čase nafitován dle rovnice (14).

$$(14) \quad D_H^t = D_H^{\text{inf}} + (D_H^0 - D_H^{\text{inf}}) * e^{-k*t}$$

Kde je k rychlostní konstanta, D_H^0 je počáteční hydrodynamický průměr a $D_H^{(\text{inf})}$ je hydrodynamický průměr v ustáleném stavu. Experimentálně získaná data dobře korelují s daty namodelovanými, což je patrné na obrázku (Obrázek 56), body reprezentují naměřená data, křivky odpovídají datům nafitovaným.

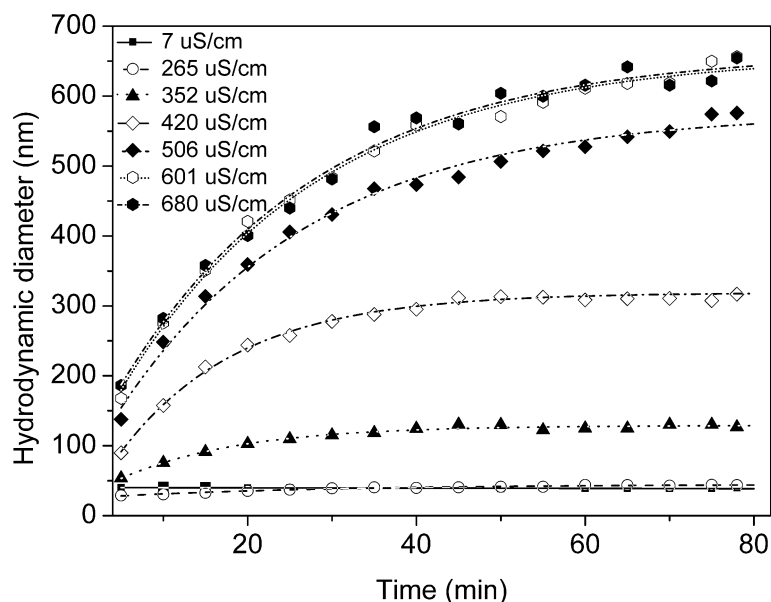
Rychlostní konstanta agregace se zvyšovala v rozmezí 0,89 - 2,5 h^{-1} , stejně jako hydrodynamický průměr v ustáleném stavu, který se zvýšil ze 145 nm na 675 nm s narůstající koncentrací Ag (1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ag). Z těchto údajů vyplývá, že pokud koloid obsahuje vyšší koncentraci stříbra, vznikající agregáty jsou větší a rychleji se tvoří, což vede k rychlejší sedimentaci. V případě testování ekotoxicity na rybách v médiu 203 může paradoxně vyšší koncentrace AgNPs vést k "lepším" výsledkům, protože stříbrné nanočástice rychle opouštějí médium 203 a usazují se bez kontaktu s rybami.¹⁸³

Na základě rozdílného chování AgNPs při ředění v demineralizované vodě nebo médiu 203 byl proveden návrh experimentu pro časové závislosti hydrodynamického průměru v různých médiích s různou iontovou silou. Testovací disperze nanočástic byly připraveny

v 7 koncentracích v rozsahu iontové vodivosti 7 - 680 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Koncentrace nanočástic stříbra byla ve všech případech $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Během ředění těmito médii se počáteční hydrodynamický průměr v experimentálním čase 5 minut zvyšoval s rostoucí iontovou vodivostí (Obrázek 57).

Časové závislosti hydrodynamického průměru se měnily s různou rychlostí. Údaje byly analyzovány podobně jako údaje na (Obrázek 56) za použití rovnice (14). Závislosti D_h splňují výše uvedenou kinetiku prvního řádu (plná čára - Obrázek 57). Kinetické parametry pro demineralizovanou vodu (7 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) byly vypočteny ze závislostí D_h uvedených na (Obrázek 56) pro experimentální dobu do 13 000 minut. Je zřejmé že nárůst hydrodynamického průměru pro jednotlivé iontové vodivosti roztoku se odehrává s jinými rychlostními konstantami. Rychlost aglomerace neměla monotónní trend, nejvyšší hodnoty ($k=4,2\text{ h}^{-1}$) byly získány pro média se střední iontovou vodivostí (350 - 420 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Nad touto hranicí se hodnoty rychlosti aglomerace snížily na $2,5\text{ h}^{-1}$ (pro vodivost média $>500\text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) a pro demineralizovanou vodu byl proces velmi pomalý ($k=0,011\text{ h}^{-1}$). Naopak hodnoty D_h^{inf} aglomerátů monotónně rostly s iontovou vodivostí roztoku od cca 50 nm ($<265\text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) do 660 nm ($>680\text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).



Obrázek 57: Časová závislost hydrodynamického průměru D_h nanočástic AG o koncentraci $250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, ředění roztoky o různé iontové síle.

Zkoumali jsme chování koloidního systému nanočástic stříbra v rozmezí koncentrace 1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v kapalném médiu předepsaném pro test akutní toxicity na rybách.

Rychlost agregace nanočástic v demineralizované vodě byla extrémně nízká. Systém nedosáhl rovnovážného stavu ani po 13 000 minutách. Hydrodynamický průměr nanočástic se v celém rozmezí koncentrací po čas typický pro tento typ ekotoxického testu (8 dní) zvětšil pouze dvojnásobně. Médium 203 vedlo k významnému urychlení agregace nanočástic.

V koloidu stříbrných nanočástic o koncentraci 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ se zvětšil hydrodynamický průměr ze 40 nm na 650 nm během 80 minut. S klesající koncentrací nanočástic v médiu 203 se signifikantně snížila jak rychlost agregace, tak hydrodynamický průměr v ustáleném stavu. Demineralizovaná voda neobsahuje ionty interferující s elektrickou dvojvrstvou nanočástic, proto při testech v demineralizované vodě nebylo dosaženo prahu agregace. Obsah volných iontů v médiu 203 je mnohem vyšší, a proto se agregace nanočástic objevila v celém rozsahu testovaných koncentrací. Výše zmíněná pozorování korelují s teorií DLVO. Vliv iontové síly kapalného média na agregaci nanočástic byl dále studován v roztocích s rozdílnou iontovou vodivostí 7-680 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, pro koncentraci nanočástic 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zatímco velikost agregátů monotónně narůstala s iontovou vodivostí roztoku, rychlost agregace dosáhla maximálních hodnot v roztocích s iontovou vodivostí 400 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Naše experimenty demonstrují signifikantní vliv iontové síly kapalného média na agregaci dispergovaných stříbrných nanočástic. Rozdílná toxicita agregátů a primárních nanočástic je dobře známa. Z toxikologického pohledu je otazné, zda lze nanočástice a jejich agregáty považovat za tytéž chemické látky. Je proto možné konstatovat, že rozdíl mezi iontovou silou použitého média a potenciálně znečištěnou přirozeně se vyskytující vodou je kritický parametr testů vodní toxicity nanočástic. Jsme toho názoru, že smysluplných výsledků lze dosáhnout v relevantním experimentálním systému, v němž má optimalizace parametrů kultivačního média stejnou prioritu jako výběr vhodného biologického modelu.

Koncentrace nanočástic stříbra v kapalném médiu byla dalším parametrem významně ovlivňujícím stupeň a rychlost agregace. Výpočet rychlostních konstant agregace by mohl být důležitou součástí designu metod semi-statických ekotoxických testů. Perioda pro výměnu kapalného média musí respektovat závislost rychlosti agregace na koncentraci nanočástic. Naše práce byla cílena na přípravnou charakterizaci a optimalizaci systému testování ekotoxicity. Logickým dalším krokem naší práce by bylo studium sedimentace a praktické ověření našich výsledků v reálném testu akutní toxicity na rybách.¹⁸³

5.4 Cílený transport zlatých nanočástic do osteosarkomových buněk pro potenciální využití v radioterapii a cílené léčbě nádorů

Pro cílený transport nanočástic zlata do osteosarkomových buněk 143B byly porovnávány dva velikostní systémy nanočástic o velikosti 5 nm a 50 nm. Snahou bylo ověřit, zda nebudou menší nanočástice vhodnější pro cílení do buněčného jádra (menší velikost jaderných pórů), a proto vhodnější pro radiosenzitizaci nádorových buněk. Před započítím vlastních experimentů s buněčnými liniemi bylo nutné nanočástice požadovaných velikostí syntetizovat. Za tímto účelem bylo vyvinuto několik originálních postupů. Všechny syntézy vycházely z kyseliny tetrachlorozlatité, jako zdroje zlatitých iontů. Kyselina tetrachlorozlatitá byla redukována různými redukčními činidly s cílem dosáhnout požadovaných velikostí nanočástic. Velikost takto připravených nanočástic, respektive jejich hydrodynamický průměr (D_h) byl ověřován měřením distribuce velikosti částic pomocí DLS za využití přístroje Zetasizer Nano. (Tabulka 22).

Tabulka 22: *Hydrodynamické průměry připravených nanočástic*

Název	Velikost D_h [nm]	Sm. odch. [%]
A	14,57	1,07
B	15,59	0,62
BS	6,47	0,80
ZA	73,97	0,49
ZA PVP	48,32	0,69
ZA2	63,73	0,60
ZA 2 PVP	89,58	3,26

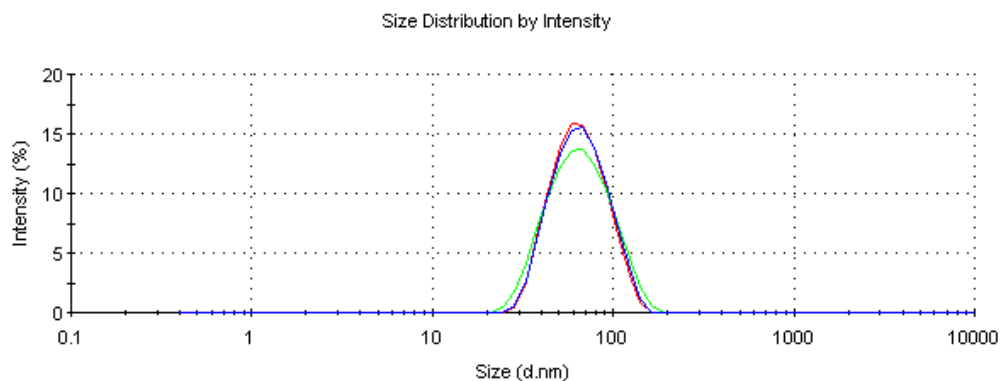
Pro přípravu menších nanočástic využívaly syntetické postupy silného redukčního činidla – terahydridoboritanu sodného (nanočástice A, B, BS). Přídavek citronanu sodného v postupech B a BS působí jako stabilizátor.

Postupy příprav využívajících jako redukční činidlo kyselinu askorbovou poskytovaly obecně nanočástice o větší velikosti (nanočástice ZA). Kyselina askorbová se navíc jeví jako vhodné redukční činidlo i z toho důvodu, že je, podobně jako citronan sodný, netoxická. Ionty

přítomné v roztoku připravovaných nanočástic vytvářejí na povrchu nanočástic elektrickou dvojvrstvu a ionty z ní uvolněné mohou ovlivňovat následné testování v přítomnosti buněk.

Připravené nanočástice mají tendenci ihned po přípravě podléhat aglomeraci a agregaci, získaná hodnota hydrodynamického průměru pak nemusí odpovídat velikosti čerstvě připravených nanočástic. Z tohoto důvodu byl testován i modifikovaný postup s přidavkem polyvinylpyrrolidonu jako stabilizátoru, který byl přidán k připravenému roztoku s nanočásticemi ihned po reakci (nanočástice označené ZA PVP, ZA 2 PVP), ve snaze předejít dalšímu nežádoucímu nárůstu velikosti částic.

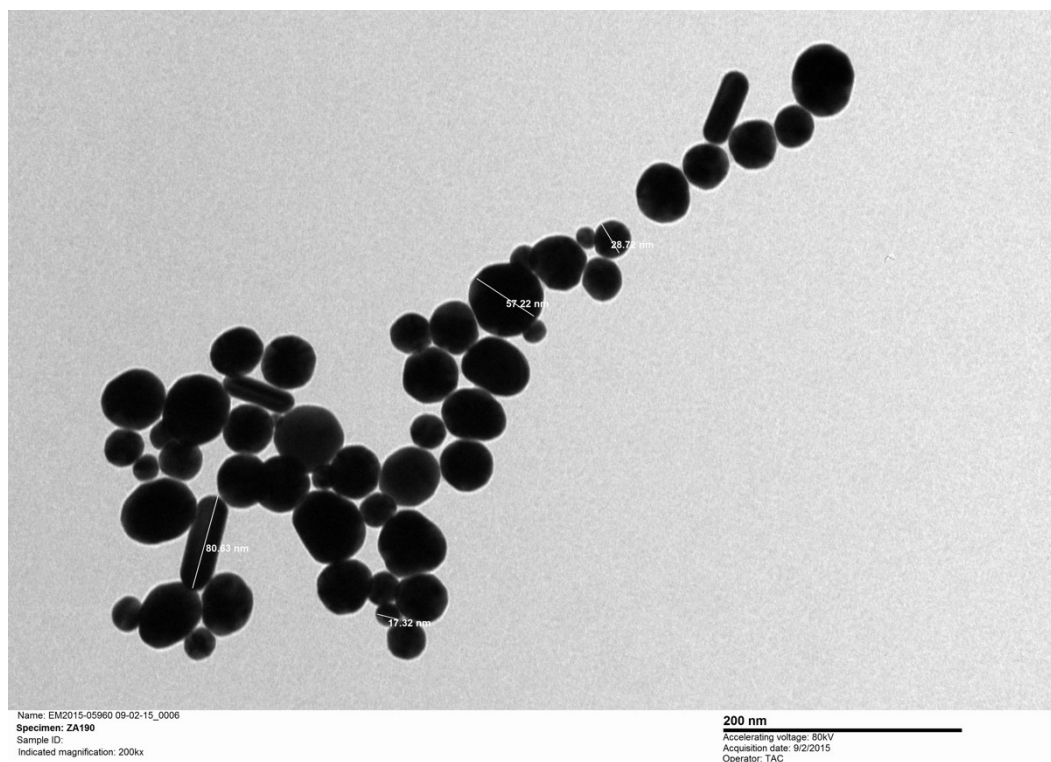
Ze získaných dat lze usuzovat, že pokud se nanočástice ZA ihned stericky stabilizovaly přidavkem PVP, měly v čerstvém roztoku velikost menší a byl naměřen menší hydrodynamický průměr ($D_h = 48,32$ nm), nežli u nanočástic bez přidavku stabilizačního činidla, kde dochází k nárůstu hydrodynamického průměru ($D_h = 73,97$ nm). Připravené koloidy měly poměrně úzkou distribuci velikosti částic (Obrázek 58). Postup ZA byl zvolen jako výchozí pro přípravu požadovaných nanočástic o větší velikosti (50 nm) s vědomím, že nanočástice je třeba ihned po přípravě stabilizovat.



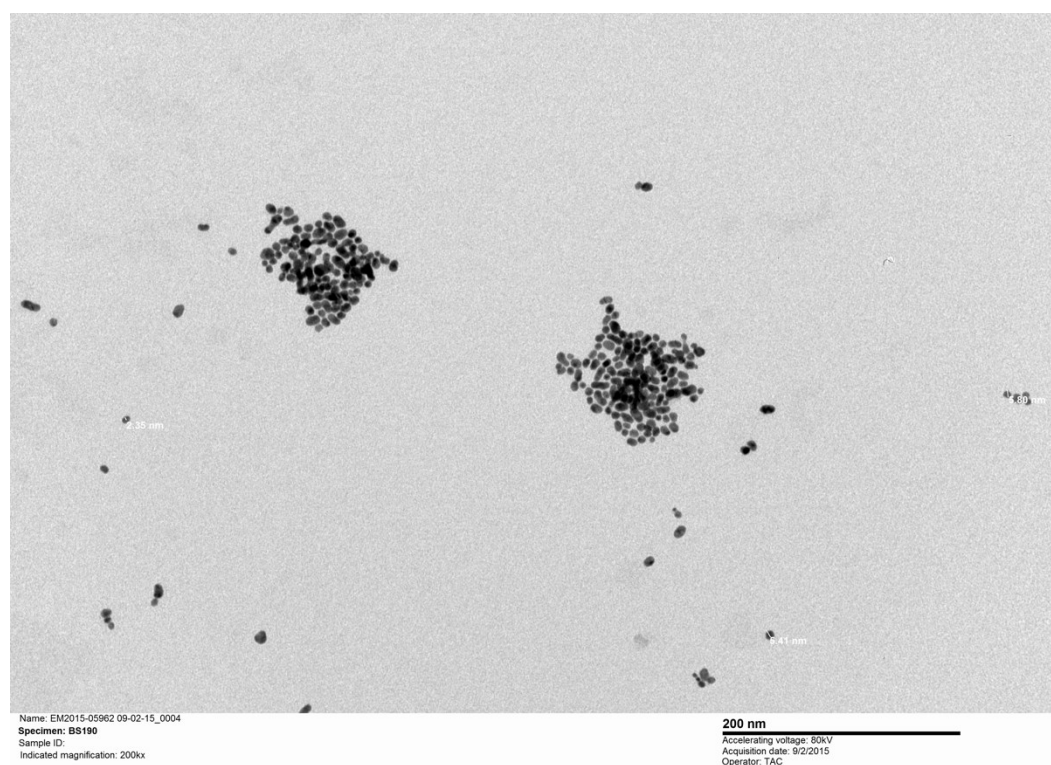
Obrázek 58: Distribuční křivka stabilizovaných zlatých nanočástic ZA.

Na snímku z transmisní elektronové mikroskopie je patrné, že lze uvedeným postupem získat sférické nanočástice o velikosti od 17,5 nm do 57 nm. V malé míře jsou přítomny i nanotyčinky (Obrázek 59).

Pro přípravu zlatých nanočástic o menší požadované velikosti (≈ 5 nm), byl na základě získaných dat vyhodnocen jako nejvhodnější postup BS, který poskytoval ihned po přípravě nanočástice v téměř požadovaném rozměru ($D_h = 6,47$ nm).



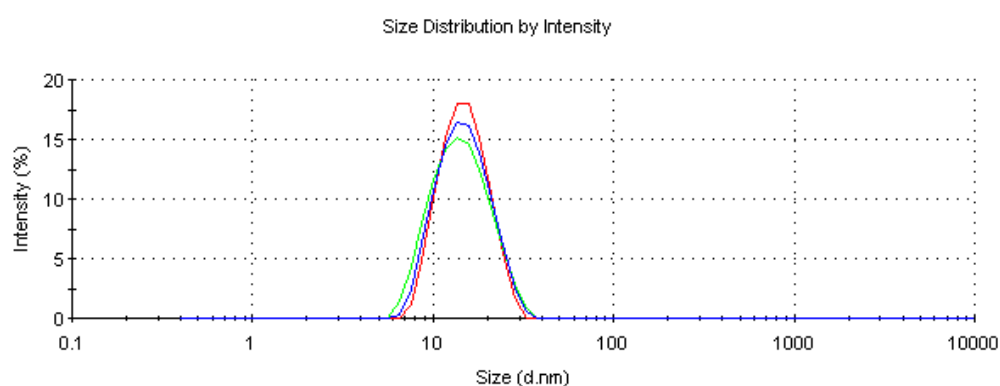
Obrázek 59: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující AuNPs (ZA), velikosti 17,3 – 57, 2 nm, přítomné jsou i nanotyčinky (Mayo Clinic, Rochester, MN).



Obrázek 60: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující AuNPs (BS) o velikosti 5,4 – 5,8 nm (Mayo Clinic, Rochester, MN).

Přestože hydrodynamický průměr D_h nemusí zcela odpovídat velikosti samotné kovové nanočástice, ale je v něm zahrnut i její obal tvořený adsorbovanými molekulami a ionty, byla malá velikost takto připravených nanočástic potvrzena i transmisí elektronovou mikroskopií. Dle snímků z transmisního elektronového mikroskopu dovoluje tento postup připravit téměř uniformní sférické částice o průměru 5,4–5,8 nm s úzkou distribucí velikosti částic

(Obrázek 60). Nanočástice bylo také nutno ihned po přípravě stabilizovat, jinak docházelo za dobu tří dnů od přípravy k nárůstu jejich hydrodynamického průměru na dvojnásobek jejich velikosti (Obrázek 61).

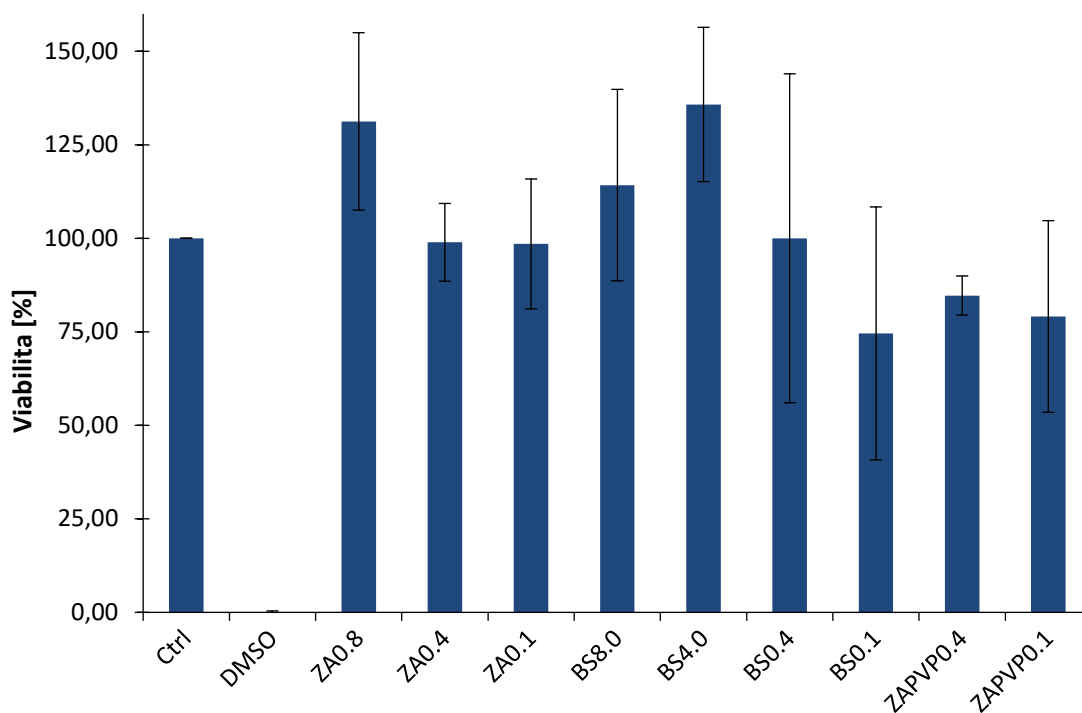


Obrázek 61: Distribuční křivka nestabilizovaných zlatých nanočástic BS po 3 dnech od přípravy ($D_h = 13$ nm).

Pro ověření cytotoxicity připravených nanočástic byly připravené nanočástice zkoncentrovány centrifugací a redispergovány v DMEM médiu. Po 24hodinové inkubaci buněk 143B s různými koncentracemi zlatých nanočástic byla vyhodnocena jejich viabilita pomocí CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Dle získaných výsledků je patrné, že nedochází k poklesu životnosti buněk 143B, žádný z nanočásticových systémů nevykazoval akutní *in vitro* toxicitu vůči osteosarkomovým buněčným liniím 143B při inkubaci po dobu 24 hodin.

Pro stabilizaci nanočástic pro plánované experimenty s buněčnými liniemi byl díky svým přednostem vybrán methoxypolyethylenglykolthiol (mPEG-SH, $M = 5000$ g.mol⁻¹), jako stérické stabilizační činidlo. Thiolová skupina umožňuje díky své afinitě dobrou vazbu s povrchem zlatých nanočástic a pro případné *in vivo* využití je mPEG-

SH vhodný také proto, že prodlužuje dobu cirkulace v krevním řečišti a brání vychytávání zlatých nanočástic v orgánech retikuloendoteliálního systému a tím zvyšuje jejich dostupnost pro cílený transport do oblasti výskytu nádorového ložiska.



Obrázek 62: Viabilita osteosarkomových buněk 143B po 24hodinové inkubaci se zlatými nanočásticemi o různé koncentraci (0,1, 0,4, 0,8, 4, 8 mmol.dm⁻³).

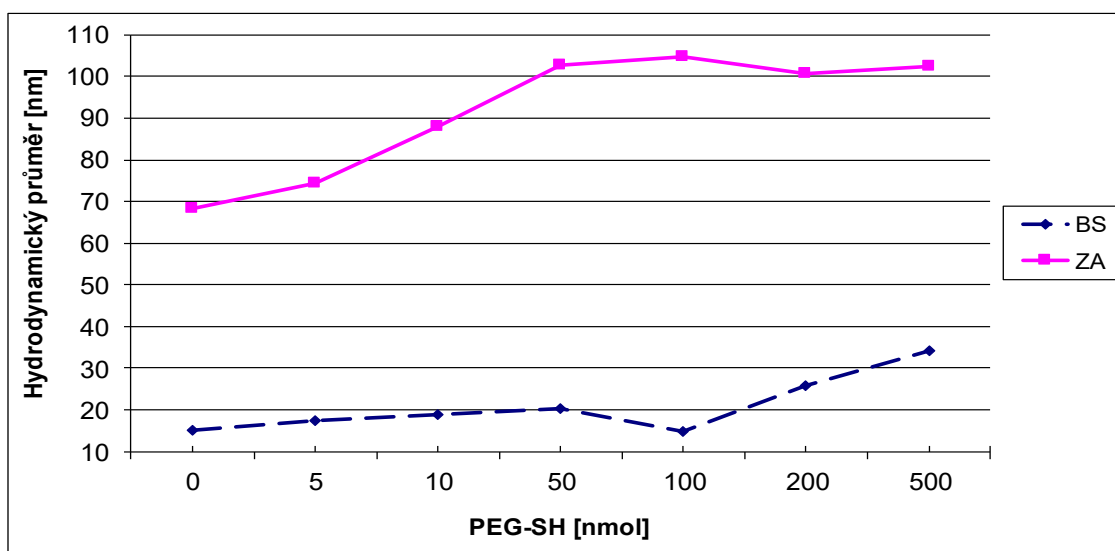
U BS nanočástic byl nejprve zkoumán efekt přidavku mPEG-SH na velikost hydrodynamického průměru zlatých nanočástic. mPEG-SH byl v experimentu přidán do reakční směsi jednak před přidavkem redukčního činidla a také ihned po jeho přidavku. Z hodnocení získaných výsledků je patrné, že pokud se mPEG-SH přidá do reakční směsi ještě před samotnou redukcí, obdržíme nanočástice o vyšším hydrodynamickém průměru, nežli v případě, kdy je stabilizátor přidán až po proběhlé redukcii (Tabulka 23). Tento efekt je pravděpodobně výraznější právě u menších nanočástic, kdy se může nejlépe v hodnotě hydrodynamického průměru promítnout tvorba polymerní korony kolem nanočástice.

Vzhledem k pozorovanému jevu a plánované následné funkcionalizaci nanočástic signálními peptidy byla zvolena metoda přidavku mPEG-SH až po proběhlé reakci s redukčním činidlem. Vycházeli jsme také z předpokladu, že je nutné na povrchu nanočástic ponechat volný prostor pro následné navázání signálních peptidů za pomoci thiolových skupin terminálního cysteinu v aminokyselinové sekvenci peptidu. Za tímto účelem byla

ověřena závislost hydrodynamického průměru nanočástic na množství přidaného mPEG-SH (Obrázek 63). Na základě získaných měření byl ke stabilizaci použit roztok 10 μl 1 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ methoxy-PEG-SH ($M = 5000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) a 490 μl ultračistě vody na každých 10 ml čerstvě připravených koloidních roztoků zlatých nanočástic.

Tabulka 23: *Efekt přídavku mPEG-SH na hodnotu D_h zlatých nanočástic BS.*

Název	mPEG-SH [1 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	Velikost D_h [nm]	Sm. odch. [%]
BS – A	3,3 μl (před)	35,46	9,07
BS – B	3,3 μl (po)	14,80	0,62
BS – C	30 μl (před)	55,68	23,36
BS – D	30 μl (po)	20,16	6,81
BS – E (bez citronanu sodného)	3,3 μl (před)	34,23	3,47
BS – F (bez citronanu sodného)	30 μl (po)	16,74	2,05



Obrázek 63: *Závislost hydrodynamického průměru zlatých nanočástic AuNPs (BS) a AuNPs.(ZA) na množství přidaného mPEG-SH*

Povrchová modifikace zlatých nanočástic přídavkem mPEG-SH je, mimo jiné, provázena barevnou změnou jejich koloidních roztoků, což je dobře patrné na pořízených fotografiích (Obrázek 64, Obrázek 65).

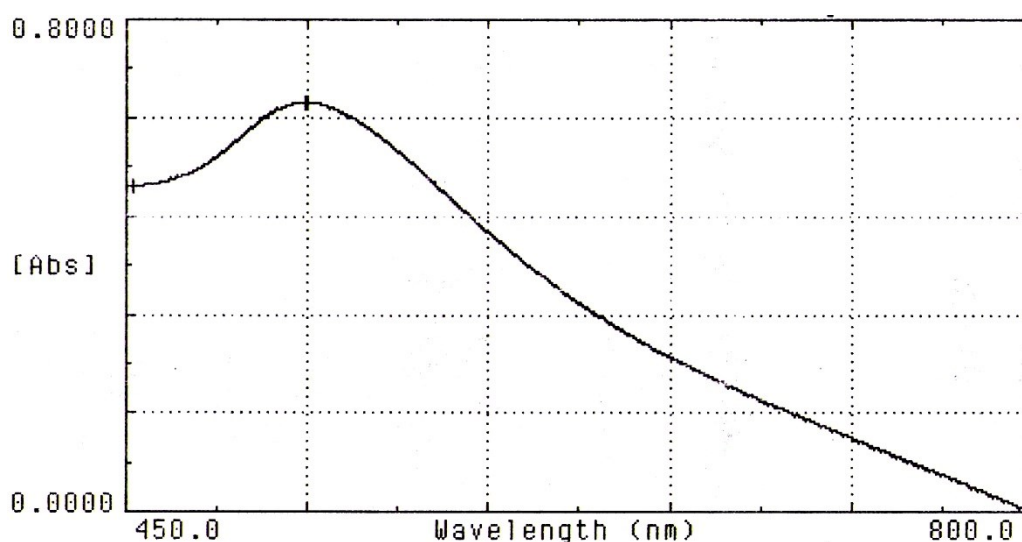


Obrázek 64: Koloidní roztoky nanočástic AuNPs (BS), barevná změna v závislosti na množství přidaného mPEG-SH, zleva 0, 5, 10, 50, 100, 200, 500 nmol mPEG-SH



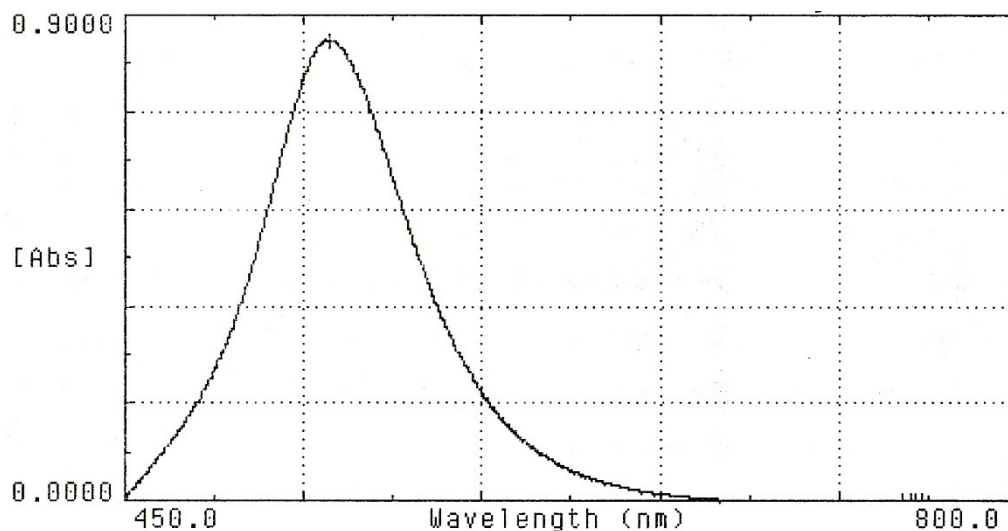
Obrázek 65: Koloidní roztoky nanočástic AuNPs (ZA), barevná změna v závislosti na množství přidaného mPEG-SH, zleva 0, 5, 10, 50, 100, 200, 500 nmol mPEG-SH

Ze získaných UV/VIS spekter nanočástic je patrné, že nanočástice o menší velikosti (BS) dosahují absorpčního maxima při 535 nm (Obrázek 66).



Obrázek 66: Absorpční spektrum koloidu zlatých nanočástic BS.

Absorpční spektrum koloidu zlatých nanočástic ZA vykazuje maximální hodnoty absorbance při vlnové délce 529 nm (Obrázek 67).



Obrázek 67: Absorpční spektrum koloidu zlatých nanočástic ZA.

Modifikací povrchu zlatých nanočástic mPEG-SH dochází vlivem změny prostředí obklopujícího nanočástici ke změně dielektrické konstanty a dochází tak k posunu absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám, tedy k tzv. červenému posunu v absorpčním spektru (Tabulka 24).

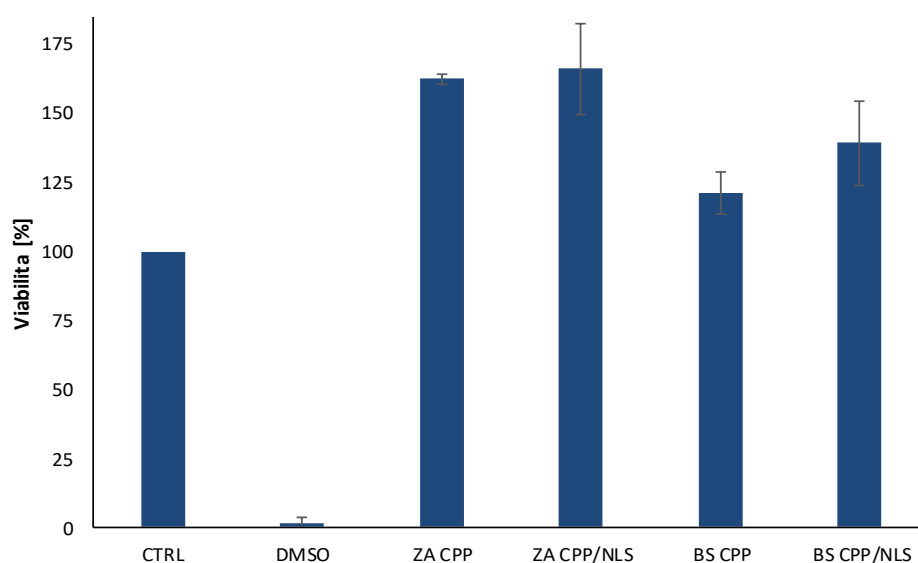
Tabulka 24: Změna polohy absorpčního maxima při modifikaci povrchu nanočástic mPEG-SH.

Název	PEG-SH [1mM]	$\lambda_{\max}$ [nm]	$A_{\max}$
BS	0	520	0,6649
BS	10 μ l (po)	530	0,1911
ZA	0	529	0,8543
ZA	10 μ l (po)	530,5	0,8526

Nanočástice stabilizované pomocí mPEG-SH byly následně funkcionalizovány signálními peptidy s cílem zvýšit jejich penetraci do osteosarkomových buněk. Stabilizované nanočástice obou velikostních systémů byly nejdříve funkcionalizovány CPP (Cell Penetrating Peptide) se sekvencí aminokyselin RGDRGDRGDRGDPGC pro cílení do

buněčné cytoplasmy a pro zamýšlené cílení do buněčného jádra byly tyto nanočástice navíc funkcionalizovány NLS (Nuclear Localisation Signal) se sekvencí aminokyselin CGGGPKKKRKVGG. Oba peptidy byly syntetizovány tak, aby na jejich konci byla aminokyselina cystein, která obsahuje thiolovou skupinu a zprostředkovala tak vazbu s povrchem nanočástic zlata.

Po 24hodinové inkubaci osteosarkomových buněk 143B s funkcionalizovanými zlatými nanočásticemi byla pomocí CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay hodnocena jejich viabilita (Obrázek 68).



Obrázek 68: Viabilita osteosarkomových buněk 143B po 24hodinové inkubaci se funkcionalizovanými zlatými nanočásticemi ($0,4 \text{ nmol.dm}^{-3}$).

Nebyl zaznamenán signifikantní pokles v životnosti buněk linie 143B po jejich expozici zlatým nanočásticím funkcionalizovaným signálními peptidy (CPP, resp. CPP/NLS). Viabilita buněk 143 B po expozici nanočástic ZA funkcionalizovaných jak CPP tak CPP/NLS naopak vzrostla (150 %), stejně tak i menší nanočástice BS funkcionalizované CPP resp. CPP/NLS spíše buněčný růst stimulovaly (125 – 130 %). Tento efekt byl popsán několika autory^{184,185}, ale jeho podstata není dosud zcela jasná.

K ověření schopnosti zlatých nanočástic *in vitro* prostupovat buněčnými membránami resp. jadernou obálkou byly následně nanočástice inkubovány s linií osteosarkomových buněk

143B po dobu 24 hodin. Jejich schopnost penetrace byla po zhotovení cytologických řezů a barvení ověřována pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Nejdříve byl porovnáván uptake zlatých nanočástic, které nebyly funkcionalizovány signálními peptidy. Dle pořízených TEM snímků je patrný vyšší spontánní uptake nefunkcionalizovaných zlatých nanočástic ZA o větší velikosti (50 nm) ve srovnání s nefunkcionalizovanými nanočásticemi BS s menší velikostí (5 nm).

Nanočástice jsou přítomné pouze v cytoplasmě buněk (Obrázek 69, Obrázek 70).

Při funkcionalizaci zlatých nanočástic pomocí CPP lze na TEM snímcích pozorovat zvýšený uptake nanočástic oproti nefunkcionalizovaným nanočásticím zlata (Obrázek 71, Obrázek 72). Zlaté nanočástice obou systémů (ZA a BS) jsou lokalizované v cytoplasmě a na snímcích je patrné, že jsou buňkou vychytávány ve větší míře větší nanočástice ZA (50 nm).

Při inkubaci osteosarkomových buněk 143B se ZA a BS nanočásticovými systémy, které byly funkcionalizovány oběma signálními peptidy (CPP a NLS) lze pozorovat, že tyto nanočástice pronikají do cytoplasmy buněk stejně jako výše uvedené nanočástice (funkcionalizované CPP), ale navíc lze tyto nanočástice nalézt i v jádře buněk (Obrázek 73, Obrázek 74). Pravděpodobně dochází k rozpoznání NLS funkcionalizovaných nanočástic pomocí jaderných importinů a do buněčného jádra jsou translokovány tedy i nanočástice o větší velikosti ZA (50 nm). Zdá se že větší nanočástice ZA (50 nm) vykazují vyšší spontánní uptake nádorovými buňkami, který ještě zesiluje při jejich funkcionalizaci pomocí CPP a po následné funkcionalizaci s NLS jsou tyto schopny pronikat přes jadernou obálku až do buněčného jádra, do místa kde je uložena genetická informace buňky. Proto by mohly být právě nanočástice o velikosti 50 nm vhodné pro cílený transport do nádorových buněk.

Uvedená metoda nabízí relativně jednoduchý způsob přípravy funkcionalizovaných zlatých nanočástic požadované velikosti, jež zachovávají své vlastnosti v médiu pro kultivaci buněk, během centrifugace a v roztocích o různé iontové síle (fosfátem pufovaný fyziologický roztok) a při testování *in vitro* nevykazují akutní toxicitu. Tato metoda může být využita v cíleném transportu léčiv do nádorových buněk, resp. pro jejich radiosenzitizaci. Penetrace zlatých nanočástic do buněčného jádra nádorových buněk by mohla zvýšit biologický účinek radiační léčby právě u radiorezistentních nádorů, jakým osteosarkom je.

6 Závěry

Disertační práce se zaměřuje na přípravu a charakterizaci stříbrných, zlatých a měděných nanočástic, které mají široký aplikační potenciál. Byly vyvinuty originální syntetické postupy s použitím různých redukčních činidel. U připravených nanočástic byl měřen jejich hydrodynamický průměr a stabilita nanočástic byla ověřována měřením a ζ potenciálu nanočástic. K charakterizaci připravených nanočástic bylo využito i mikroskopických technik (TEM, SEM, AFM) a XRD.

Zlaté nanočástice byly připravovány redukcí tetrachlorozlatité kyseliny kyselinou askorbovou. Tento postup je činí vhodnými i pro potenciální biologické aplikace, díky netoxickému redukčnímu činidlu. Byl testován vliv různých stabilizačních přísad na stabilitu výsledných koloidů. Přičemž nejúčinnější se ukázal být PVP. Sterická stabilizace pomocí PVP měla vliv na nárůst hydrodynamického průměru připravovaných nanočástic a docházelo k poklesu ζ potenciálu. Tento efekt je pravděpodobně způsoben stíněním elektrostatického potenciálu kovové nanočástice polymerní vrstvou. Stříbrné nanočástice byly připraveny několika postupy, redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným, redukcí tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti citronanu a Tollensovým způsobem.

Nejmenší nanočástice byly nanočástice připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným s přidavkem PVP. Nanočástice připravené v přítomnosti citrátu měly diskovitý tvar. Nejstabilnější koloidy nanočástic byly nanočástice AG připravené Tollensovým způsobem.

Nanočástice mědi byly připraveny postupem spočívajícím v redukcí síranu měďnatého v přítomnosti kyseliny askorbové za použití tetrahydridoboritanu sodného. Vzhledem k vysoké reaktivitě těchto nanočástic je bylo nutné stabilizovat polymerním stabilizátorem PVP.

U připravených nanočástic byly testovány jejich potenciální antimikrobiální účinky. Za tímto účelem byly provedeny difuzní diskové testy na agarové plotně. Testovanými mikroorganismy byly bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans*. Uvedené nanočástice vykazovaly bakteriostatické účinky vůči bakteriím a omezenou antimikrobiální aktivitu vůči kvasinkám. Uvedené uspořádání testu neprokázalo baktericidní účinek připravených nanočástic. Pro neuspokojivé výsledky testu byly provedeny i testy diluční metodou založené na působení nanočástic na bakteriální suspenzi resp. „time-kill“ test. Testované nanočástice stříbra AG, AC i zlata Au1, Au2 měly baktericidní účinek na testované bakterie *Staphylococcus aureus*.

Zlaté nanočástice Au₁ a Au₂ neměly účinek na *Escherichia coli*. Tato rozdílnost může být dána odlišným složením bakteriální buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií. Úpravou podmínek testu, kdy byly bakteriální suspenze připraveny v masopeptonovém bujónu vedly k překvapivě odlišným výsledům, než jsme získali při testování s použitím fyziologického roztoku. Nanočástice zlata Au₁ a AG nevykazovaly antibakteriální aktivitu vůči *Staphylococcus aureus*. Ale měly baktericidní účinek na *E. coli*, kdy došlo k úmrtí všech buněk do 24 hodin. Na základě provedených experimentů jsme analýzou došli k závěru, že během testování je přítomno několik kritických bodů, které mohou ovlivňovat výsledky antibakteriálních testů. V literatuře totiž neexistuje jednoznačné doporučení jak testovat antibakteriální vlastnosti nanomateriálů. Testování nanočásticových koloidů v biologických systémech a jejich chování se odvíjí od intrinsických vlastností nanočástic samotných (stabilita, povrch, velikost, porozita, funkcionalizace a další). Naše zjištění poukazuje na nutnost charakterizace testovaného materiálu, jeho stability a zajištění reprodukovatelných postupů pro testování kovových nanočástic. Hodnoty zjištěných inhibičních koncentrací v literatuře pak nesou pouze informaci o daném nanomateriálu při konkrétních testovacích podmínkách a nemusí být přenositelné. Vhodným postupem k testování nanomateriálů by mohl být kombinatorický přístup využívající více metod založených na různých mechanismech testování antibakteriálního účinku.

Po těchto zjištěních jsme se zaměřili na jednoduchý způsob testování stability nanočástic stříbra AG v demineralizované vodě a médiu 203 pro testování akutní akvatické toxicity. V koloidu stříbrných nanočástic o koncentraci 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ se hydrodynamický průměr zvětšil ze 40 nm na 650 nm během 80 minut. S poklesem koncentrace nanočástic v médiu 203 se výrazně snížila jak rychlost agregace, tak hydrodynamický průměr v ustáleném stavu. Demineralizovaná voda neobsahuje ionty, které by interferovaly s elektrickou dvojvrstvou nanočástic, proto při testech v demineralizované vodě nebylo dosaženo prahu agregace. Obsah volných iontů v médiu 203 je mnohem vyšší, což vedlo k agregaci nanočástic v celém rozsahu testovaných koncentrací. Tato pozorování podporují teorii DLVO. Vliv iontové síly kapalného média na agregaci nanočástic byl dále zkoumán v roztocích s různou iontovou vodivostí (7-680 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) při koncentraci nanočástic 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zatímco velikost agregátů monotónně narůstala s iontovou vodivostí roztoku, rychlost agregace dosáhla maxima v roztocích s iontovou vodivostí 400 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Naše experimenty ukazují významný vliv iontové síly kapalného média na agregaci dispergovaných stříbrných nanočástic. Rozdílná toxicita agregátů a primárních nanočástic je

dobře známa. Z toxikologického hlediska je otázkou, zda lze nanočástice a jejich agregáty považovat za stejné chemické látky. Proto lze konstatovat, že rozdíl mezi iontovou silou použitého média a potenciálně znečištěnou přirozeně se vyskytující vodou je kritickým parametrem testů vodní toxicity nanočástic. Domníváme se, že smysluplných výsledků lze dosáhnout v relevantním experimentálním systému, kde má optimalizace parametrů kultivačního média stejnou prioritu jako výběr vhodného biologického modelu.

Poslední částí disertační práce byla příprava a funkcionalizace zlatých nanočástic pro cílenou léčbu nádorů kostí. Naší snahou bylo připravit nanočástice zlata a efektivně je cílit do buněk radiorezistentních kostních nádorů s cílem zvýšení jejich radiosenzitivity. Takové nanočástice musí být stabilní, nepodléhat agregaci a aglomeraci, zachovávat si své vlastnosti v roztocích o různé iontové síle, pH a v prostředí kde budou vystaveny interakci s četnými proteiny a kde musí být chráněny od tvorby proteinové korony a tím i před rozpoznáním buňkami imunitního systému a vychytáváním orgány retikuloendoteliálního systému. Tím lze dosáhnout prodloužení jejich cirkulačního poločasu a zefektivnění případné léčby. Pouze nanočástice s těmito vlastnostmi mohou najít využití nejen v *in vitro*, ale také v *in vivo* aplikacích.

V literatuře je popsáno, že nádorové buňky obecně vykazují vyšší uptake nanočástic, než buňky nenádorové. Naším cílem bylo mimo jiné ověřit i velikostní závislost na uptake nanočástic buňkami, která dle údajů v literatuře dosahuje maxima při velikosti nanočástic kolem 50 nm. Vzhledem k tomu, že velikost jaderných pórů je 20-50 nm, chtěli jsme také ověřit, zda nebudou pro cílení do buněčného jádra (předpokládané zvýšení radiosenzitizačního efektu) vhodnější nanočástice s menší velikostí. Za tímto účelem byly připraveny dva nanočásticové systémy s rozdílnými velikostmi kovových zlatých nanočástic 5 nm (BS) a 50 nm (ZA), které byly následně stabilizovány. Pro plánovanou funkcionalizaci připravených nanočástic signálními peptidy byla nejdříve ověřována velikostní závislost hydrodynamického průměru připravených nanočástic na množství použitého stabilizačního činidla (mPEG-SH) ve snaze ponechat volný povrch na nanočásticích pro vazbu signálních peptidů. Pro zvýšení uptake nanočástic buňkami byly mPEG-SH stabilizované nanočástice dále funkcionalizovány signálními peptidy. Pro cílený transport do cytoplasmy pomocí signálního peptidu CPP a do buněčného jádra pomocí NLS. Nízká toxicita připravených nanočásticových systému byla potvrzena pomocí MTS assay.

Uvedenými postupy byly připraveny nanočástice o požadované velikosti kolem 5 nm a 50 nm (TEM). Na osteosarkomových buněčných liniích 143B byl ověřován uptake funkcionalizovaných i nefunkcionalizovaných nanočástic.

Dle TEM snímků je patrný vyšší spontánní uptake u nefunkcionalizovaných nanočástic ZA (50 nm).

Uptake zlatých nanočástic je zvýšen jejich funkcionalizací pomocí peptidu CPP. Nanočástice funkcionalizované oběma signálními peptidy CPP a NLS pronikají jadernými póry až do buněčného jádra. Při testech toxicity nebyl po expozici nanočásticím zaznamenán pokles viability testovaných buněk.

Zdá se, že nejvhodnějšími pro cílený transport nanočástic do osteosarkomových buněk 143B jsou nanočástice ZA o velikosti 50 nm. Uplatňuje se u nich vyšší spontánní uptake a po funkcionalizaci CPP se jejich schopnost penetrovat do buňky ještě zvyšuje. Nanočástice ZA funkcionalizované pomocí CPP a NLS jsou poté schopny průniku až do jader buněk.

Uvedená metoda nabízí relativně jednoduchý postup přípravy funkcionalizovaných zlatých nanočástic požadované velikosti, jež jsou stabilní v roztocích o různé iontové síle, pH a v přítomnosti proteinů buněčného media. Tyto nanočástice by mohly najít využití pro cílený transport léčiv (chemoterapeutik) do nádorových buněk, resp. pro jejich radiosenzitizaci. Nabízí se i jejich využití pro testování v podmínkách *in vivo*. Penetrace zlatých nanočástic do buněčného jádra nádorových buněk by mohla zvýšit biologický účinek radiační léčby právě u radiorezistentních nádorů typu osteosarkomu.

7 Seznam literatury

- (1) Modena, M. M.; Rühle, B.; Burg, T. P.; Wuttke, S. Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Adv. Mater.* **2019**, *31* (32), 1901556. <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>.
- (2) Mody, V. V.; Siwale, R.; Singh, A.; Mody, H. R. Introduction to Metallic Nanoparticles. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2010**, *2* (4), 282. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>.
- (3) Salata, O. V. Applications of Nanoparticles in Biology and Medicine. *J. Nanobiotechnology* **2004**, *2*, 3. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>.
- (4) Appenzeller, T. The Man Who Dared to Think Small. *Science* **1991**, *254* (5036), 1300–1300. <https://doi.org/10.1126/science.254.5036.1300>.
- (5) Siddiqi, K. S.; Husen, A.; Rao, R. A. K. A Review on Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Their Biocidal Properties. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16* (1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>.
- (6) Ogunsona, E. O.; Muthuraj, R.; Ojogbo, E.; Valerio, O.; Mekonnen, T. H. Engineered Nanomaterials for Antimicrobial Applications: A Review. *Appl. Mater. Today* **2020**, *18*, 100473. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100473>.
- (7) Buzea, C.; Pacheco, I. I.; Robbie, K. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases* **2007**, *2* (4), MR17–MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>.
- (8) Bhat, M.; Nayak, B.; Nanda, A. Nanotechnology, Metal Nanoparticles, and Biomedical Applications of Nanotechnology; 2014; pp 116–155. <https://doi.org/10.4018/978-1-4666-6304-6.ch005>.
- (9) Burlec, A. F.; Corciova, A.; Boev, M.; Batir-Marin, D.; Mircea, C.; Cioanca, O.; Danila, G.; Danila, M.; Bucur, A. F.; Hancianu, M. Current Overview of Metal Nanoparticles' Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, with a Focus on Silver and Gold Nanoparticles. *Pharmaceuticals* **2023**, *16* (10), 1410. <https://doi.org/10.3390/ph16101410>.
- (10) Taton, T. A. Nanostructures as Tailored Biological Probes. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20* (7), 277–279. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01973-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01973-X).
- (11) Abbasi, R.; Shineh, G.; Mobaraki, M.; Doughty, S.; Tayebi, L. Structural Parameters of Nanoparticles Affecting Their Toxicity for Biomedical Applications: A Review. *J. Nanoparticle Res.* **2023**, *25* (3), 43. <https://doi.org/10.1007/s11051-023-05690-w>.
- (12) Mikhailova, E. O. Gold Nanoparticles: Biosynthesis and Potential of Biomedical Application. *J. Funct. Biomater.* **2021**, *12* (4), 70. <https://doi.org/10.3390/jfb12040070>.
- (13) Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C. The Lycurgus Cup — A Roman Nanotechnology. *Gold Bull.* **2007**, *40* (4), 270–277. <https://doi.org/10.1007/BF03215599>.
- (14) *Epistemic Artifacts: Michael Faraday's Search for the Optical Effects of Gold* | SpringerLink. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-0605-8_17 (accessed 2024-11-29).
- (15) *11.6: Colloids*. Chemistry LibreTexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Chemistry_1e_\(OpenSTAX\)/11%3A_Solutions_and_Colloids/11.06%3A_Colloids](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Chemistry_1e_(OpenSTAX)/11%3A_Solutions_and_Colloids/11.06%3A_Colloids) (accessed 2024-11-29).
- (16) Mokrushin, S. G. Thomas Graham and the Definition of Colloids. *Nature* **1962**, *195* (4844), 861–861. <https://doi.org/10.1038/195861a0>.
- (17) Wisniak, J. Thomas Graham. II. Contributions to Diffusion of Gases and Liquids, Colloids, Dialysis, and Osmosis. *Educ. Quím.* **2013**, *24*, 506–515. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)72521-7](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72521-7).
- (18) Jamkhande, P. G.; Ghule, N. W.; Bamer, A. H.; Kalaskar, M. G. Metal Nanoparticles Synthesis: An Overview on Methods of Preparation, Advantages and Disadvantages, and

- Applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 101174.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>.
- (19) Tuominen, M.; Schultz, E. Environmental Aspects Related to Nanomaterials. *Finn. Environ.* **2010**, *2010* (26).
 - (20) Panahi, Y.; Mohammadhosseini, M.; Nejati-Koshki, K.; Abadi, A. J. N.; Moafi, H. F.; Akbarzadeh, A.; Farshbaf, M. Preparation, Surface Properties, and Therapeutic Applications of Gold Nanoparticles in Biomedicine. *Drug Res.* **2016**, *11*, 77–87.
<https://doi.org/10.1055/s-0042-115171>.
 - (21) Iravani, S. Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Green Chem.* **2011**, *13* (10), 2638. <https://doi.org/10.1039/c1gc15386b>.
 - (22) Shahzadi, S.; Zafar, N.; Sharif, R.; Shahzadi, S.; Zafar, N.; Sharif, R. Antibacterial Activity of Metallic Nanoparticles. In *Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control*; IntechOpen, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72526>.
 - (23) Kim, M.; Osone, S.; Kim, T.; Higashi, H.; Seto, T. Synthesis of Nanoparticles by Laser Ablation: A Review. *KONA Powder Part. J.* **2017**, *advpub*.
<https://doi.org/10.14356/kona.2017009>.
 - (24) Nam, N. H.; Luong, N. H. Nanoparticles: Synthesis and Applications. *Mater. Biomed. Eng.* **2019**, 211–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102814-8.00008-1>.
 - (25) AbuDalo, M. A.; Al-Mheidat, I. R.; Al-Shurafat, A. W.; Grinham, C.; Oyanedel-Craver, V. Synthesis of Silver Nanoparticles Using a Modified Tollens' Method in Conjunction with Phytochemicals and Assessment of Their Antimicrobial Activity. *PeerJ* **2019**, *7*, e6413. <https://doi.org/10.7717/peerj.6413>.
 - (26) Michalcová, A.; Machado, L.; Marek, I.; Martinec, M.; Sluková, M.; Vojtěch, D. Properties of Ag Nanoparticles Prepared by Modified Tollens' Process with the Use of Different Saccharide Types. *J. Phys. Chem. Solids* **2018**, *113*, 125–133.
<https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2017.10.011>.
 - (27) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11* (0), 55–75.
<https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.
 - (28) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. The Formation of Colloidal Gold. *J. Phys. Chem.* **1953**, *57* (7), 670–673. <https://doi.org/10.1021/j150508a015>.
 - (29) Malassis, L.; Dreyfus, R.; Murphy, R. J.; Hough, L. A.; Donnio, B.; Murray, C. B. One-Step Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles with Ascorbic Acid and Their Versatile Surface Post-Functionalization. *RSC Adv.* **2016**, *6* (39), 33092–33100.
<https://doi.org/10.1039/C6RA00194G>.
 - (30) Sirajuddin; Mechler, A.; Torriero, A. A. J.; Nafady, A.; Lee, C.-Y.; Bond, A. M.; O'Mullane, A. P.; Bhargava, S. K. The Formation of Gold Nanoparticles Using Hydroquinone as a Reducing Agent through a Localized pH Change upon Addition of NaOH to a Solution of HAuCl₄. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2010**, *370* (1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.08.041>.
 - (31) Huang, Y.; Xia, K.; He, N.; Lu, Z.; Zhang, L.; Deng, Y.; Nie, L. Size-Tunable Synthesis of Gold Nanorods Using Pyrogallol as a Reducing Agent. *Sci. China Chem.* **2015**, *58* (11), 1759–1765. <https://doi.org/10.1007/s11426-015-5437-3>.
 - (32) Wu, Y.-Z.; Tsai, Y.-Y.; Chang, L.-S.; Chen, Y.-J. Evaluation of Gallic Acid-Coated Gold Nanoparticles as an Anti-Aging Ingredient. *Pharm. Basel Switz.* **2021**, *14* (11), 1071. <https://doi.org/10.3390/ph14111071>.
 - (33) Whitehead, C. B.; Özkar, S.; Finke, R. G. LaMer's 1950 Model of Particle Formation: A Review and Critical Analysis of Its Classical Nucleation and Fluctuation Theory Basis, of Competing Models and Mechanisms for Phase-Changes and Particle Formation, and

- Then of Its Application to Silver Halide, Semiconductor, Metal, and Metal-Oxide Nanoparticles. *Mater. Adv.* **2021**, 2 (1), 186–235. <https://doi.org/10.1039/D0MA00439A>.
- (34) Schladt, T. D.; Schneider, K.; Schild, H.; Tremel, W. Synthesis and Bio-Functionalization of Magnetic Nanoparticles for Medical Diagnosis and Treatment. *Dalton Trans.* **2011**, 40 (24), 6315–6343. <https://doi.org/10.1039/C0DT00689K>.
 - (35) Thanh, N. T. K.; Maclean, N.; Mahiddine, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (15), 7610–7630. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>.
 - (36) Polte, J. Fundamental Growth Principles of Colloidal Metal Nanoparticles – a New Perspective. *CrystEngComm* **2015**, 17 (36), 6809–6830. <https://doi.org/10.1039/C5CE01014D>.
 - (37) Ji, Y.; Yang, S.; Guo, S.; Song, X.; Ding, B.; Yang, Z. Bimetallic Ag/Au Nanoparticles: A Low Temperature Ripening Strategy in Aqueous Solution. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2010**, 372 (1), 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.10.028>.
 - (38) Lee, Y.; Oh, S.-G. Ostwald Ripening and Control of Ag Ion Reduction Degree by Ammonium Hydroxide in Alcohol Reduction Process. *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**, 21, 768–771. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.04.010>.
 - (39) Nathanael, K.; Cheng, S.; Kovalchuk, N. M.; Arcucci, R.; Simmons, M. J. H. Optimization of Microfluidic Synthesis of Silver Nanoparticles: A Generic Approach Using Machine Learning. *Chem. Eng. Res. Des.* **2023**.
 - (40) Pathiraja, G.; Obare, S.; Rathnayake, H.; Pathiraja, G.; Obare, S.; Rathnayake, H. Oriented Attachment Crystal Growth Dynamics of Anisotropic One-Dimensional Metal/Metal Oxide Nanostructures: Mechanism, Evidence, and Challenges. In *Crystal Growth and Chirality - Technologies and Applications*; IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.107463>.
 - (41) Khalil, A. T.; Ovais, M.; Iqbal, J.; Ali, A.; Ayaz, M.; Abbas, M.; Ahmad, I.; Devkota, H. P. Microbes-Mediated Synthesis Strategies of Metal Nanoparticles and Their Potential Role in Cancer Therapeutics. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, 86, 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.006>.
 - (42) Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S. V.; Zolfaghari, B. Synthesis of Silver Nanoparticles: Chemical, Physical and Biological Methods. *Res. Pharm. Sci.* **2014**, 9 (6), 385–406.
 - (43) Ovais, M.; Khalil, A. T.; Ayaz, M.; Ahmad, I.; Nethi, S. K.; Mukherjee, S. Biosynthesis of Metal Nanoparticles via Microbial Enzymes: A Mechanistic Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19 (12), 4100. <https://doi.org/10.3390/ijms19124100>.
 - (44) Shrestha, S.; Wang, B.; Dutta, P. Nanoparticle Processing: Understanding and Controlling Aggregation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, 279, 102162. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102162>.
 - (45) KVÍTEK, Libor; PANÁČEK, Aleš. *Základy Koloidní Chemie*; Univerzita Palackého v Olomouci: Olomouc, 2007.
 - (46) Wall, S. The History of Electrokinetic Phenomena. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, 15 (3), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.12.005>.
 - (47) Javed, R.; Zia, M.; Naz, S.; Aisida, S. O.; Ain, N. ul; Ao, Q. Role of Capping Agents in the Application of Nanoparticles in Biomedicine and Environmental Remediation: Recent Trends and Future Prospects. *J. Nanobiotechnology* **2020**, 18 (1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00704-4>.
 - (48) Gentili, D.; Ori, G. Reversible Assembly of Nanoparticles: Theory, Strategies and Computational Simulations. *Nanoscale* **2022**, 14 (39), 14385–14432. <https://doi.org/10.1039/D2NR02640F>.

- (49) Amina, S. J.; Guo, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 9823–9857. <https://doi.org/10.2147/IJN.S279094>.
- (50) Yang, Y.; Zhu, T.; Shen, L.; Liu, Y.; Zhang, D.; Zheng, B.; Gong, K.; Zheng, J.; Gong, X. Recent Progress in the All-Solid-State Flexible Supercapacitors. *SmartMat* **2022**, *3* (3), 349–383. <https://doi.org/10.1002/smm2.1103>.
- (51) Sujith, S. V.; Kim, H.; Lee, J. A Review on Thermophysical Property Assessment of Metal Oxide-Based Nanofluids: Industrial Perspectives. *Metals* **2022**, *12* (1), 165. <https://doi.org/10.3390/met12010165>.
- (52) Piacenza, E.; Presentato, A.; Turner, R. J. Stability of Biogenic Metal(Loid) Nanomaterials Related to the Colloidal Stabilization Theory of Chemical Nanostructures. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2018**, *38* (8), 1137–1156. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1440525>.
- (53) *How Much Ionic Strength is Too Much?* | *PCI Magazine*. <https://www.pcimag.com/articles/110424-how-much-ionic-strength-is-too-much> (accessed 2024-12-04).
- (54) Javed, R.; Sajjad, A.; Naz, S.; Sajjad, H.; Ao, Q. Significance of Capping Agents of Colloidal Nanoparticles from the Perspective of Drug and Gene Delivery, Bioimaging, and Biosensing: An Insight. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (18), 10521. <https://doi.org/10.3390/ijms231810521>.
- (55) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (3), 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- (56) Wang, X.; Cao, Y. Characterizations of Absorption, Scattering, and Transmission of Typical Nanoparticles and Their Suspensions. *J. Ind. Eng. Chem.* **2020**, *82*, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.10.030>.
- (57) Kasani, S.; Curtin, K.; Wu, N. A Review of 2D and 3D Plasmonic Nanostructure Array Patterns: Fabrication, Light Management and Sensing Applications. *Nanophotonics* **2019**, *8* (12), 2065–2089. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2019-0158>.
- (58) Lowry, G. V.; Hill, R. J.; Harper, S.; Rawle, A. F.; Hendren, C. O.; Klaessig, F.; Nobbmann, U.; Sayre, P.; Rumble, J. Guidance to Improve the Scientific Value of Zeta-Potential Measurements in nanoEHS. *Environ. Sci. Nano* **2016**, *3* (5), 953–965. <https://doi.org/10.1039/C6EN00136J>.
- (59) *Achievements in Public Health, 1900-1999: Control of Infectious Diseases*. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4829a1.htm> (accessed 2024-12-17).
- (60) Diggins, F. W. The True History of the Discovery of Penicillin, with Refutation of the Misinformation in the Literature. *Br. J. Biomed. Sci.* **1999**, *56* (2), 83–93.
- (61) SHAMBAUGH, G. E., JR. History of Sulfonamides. *Arch. Otolaryngol.* **1966**, *83* (1), 1–2. <https://doi.org/10.1001/archotol.1966.00760020003001>.
- (62) *Prontosil - an overview* | *ScienceDirect Topics*. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/prontosil> (accessed 2024-12-16).
- (63) Cook, M.; Molto, E.; Anderson, C. Fluorochrome Labelling in Roman Period Skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *Am. J. Phys. Anthropol.* **1989**, *80* (2), 137–143. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330800202>.
- (64) Huh, A. J.; Kwon, Y. J. “Nanoantibiotics”: A New Paradigm for Treating Infectious Diseases Using Nanomaterials in the Antibiotics Resistant Era. *J. Controlled Release* **2011**, *156* (2), 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>.

- (65) Huh, A. J.; Kwon, Y. J. “Nanoantibiotics”: A New Paradigm for Treating Infectious Diseases Using Nanomaterials in the Antibiotics Resistant Era. *J. Controlled Release* **2011**, *156* (2), 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>.
- (66) Alabresm, A.; Chandler, S. L.; Benicewicz, B. C.; Decho, A. W. Nanotargeting of Resistant Infections with a Special Emphasis on the Biofilm Landscape. *Bioconj. Chem.* **2021**, *32* (8), 1411–1430. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00116>.
- (67) Lushniak, B. D. Antibiotic Resistance: A Public Health Crisis. *Public Health Reports®* **2014**, *129* (4), 314–316. <https://doi.org/10.1177/003335491412900402>.
- (68) Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharm. Ther.* **2015**, *40* (4), 277–283.
- (69) Aguilar-Garay, R.; Lara-Ortiz, L. F.; Campos-López, M.; Gonzalez-Rodriguez, D. E.; Gamboa-Lugo, M. M.; Mendoza-Pérez, J. A.; Anzueto-Ríos, Á.; Nicolás-Álvarez, D. E. A Comprehensive Review of Silver and Gold Nanoparticles as Effective Antibacterial Agents. *Pharmaceuticals* **2024**, *17* (9), 1134. <https://doi.org/10.3390/ph17091134>.
- (70) Rahman, S.; Sadaf, S.; Hoque, M. E.; Mishra, A.; Mubarak, N. M.; Malafaia, G.; Singh, J. Unleashing the Promise of Emerging Nanomaterials as a Sustainable Platform to Mitigate Antimicrobial Resistance. *RSC Adv.* **2024**, *14* (20), 13862–13899. <https://doi.org/10.1039/d3ra05816f>.
- (71) Jiang, H.; Li, L.; Li, Z.; Chu, X. Metal-Based Nanoparticles in Antibacterial Application in Biomedical Field: Current Development and Potential Mechanisms. *Biomed. Microdevices* **2024**, *26* (1), 12. <https://doi.org/10.1007/s10544-023-00686-8>.
- (72) Sánchez-López, E.; Gomes, D.; Esteruelas, G.; Bonilla, L.; Lopez-Machado, A. L.; Galindo, R.; Cano, A.; Espina, M.; Ettcheto, M.; Camins, A.; Silva, A. M.; Durazzo, A.; Santini, A.; Garcia, M. L.; Souto, E. B. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials* **2020**, *10* (2), 292. <https://doi.org/10.3390/nano10020292>.
- (73) Moradi, F.; Ghaedi, A.; Fooladfar, Z.; Bazrgar, A. Recent Advance on Nanoparticles or Nanomaterials with Anti-Multidrug Resistant Bacteria and Anti-Bacterial Biofilm Properties: A Systematic Review. *Heliyon* **2023**, *9* (11), e22105. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22105>.
- (74) Skłodowski, K.; Chmielewska-Deptuła, S. J.; Piktel, E.; Wolak, P.; Wollny, T.; Bucki, R. Metallic Nanosystems in the Development of Antimicrobial Strategies with High Antimicrobial Activity and High Biocompatibility. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (3), 2104. <https://doi.org/10.3390/ijms24032104>.
- (75) Luo, L.; Huang, W.; Zhang, J.; Yu, Y.; Sun, T. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: A Review. *ACS Appl. Nano Mater.* **2024**, *7* (3), 2529–2545. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c05615>.
- (76) Tamayo, L. A.; Zapata, P. A.; Vejar, N. D.; Azócar, M. I.; Gulppi, M. A.; Zhou, X.; Thompson, G. E.; Rabagliati, F. M.; Páez, M. A. Release of Silver and Copper Nanoparticles from Polyethylene Nanocomposites and Their Penetration into *Listeria Monocytogenes*. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *40*, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.037>.
- (77) Zhang, S.; Li, Z.; Xu, Z.; Tang, Y.; Duan, C.; Dai, H.; Dai, X.; Wei, X.; Liu, Y.; Xu, C.; Han, B. Reactive Oxygen Species-Based Nanotherapeutics for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Mater. Des.* **2022**, *223*, 111194. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111194>.
- (78) Shi, Y.; Pillozzi, A. R.; Huang, X. Exposure of CuO Nanoparticles Contributes to Cellular Apoptosis, Redox Stress, and Alzheimer’s A β Amyloidosis. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **2020**, *17* (3), 1005. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031005>.

- (79) Slavin, Y. N.; Asnis, J.; Häfeli, U. O.; Bach, H. Metal Nanoparticles: Understanding the Mechanisms behind Antibacterial Activity. *J. Nanobiotechnology* **2017**, *15* (1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>.
- (80) Mukha, Iu. P.; Eremenko, A. M.; Smirnova, N. P.; Mikhienkova, A. I.; Korchak, G. I.; Gorchev, V. F.; Chunikhin, A. Yu. Antimicrobial Activity of Stable Silver Nanoparticles of a Certain Size. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2013**, *49* (2), 199–206. <https://doi.org/10.1134/S0003683813020117>.
- (81) Dong, Y.; Zhu, H.; Shen, Y.; Zhang, W.; Zhang, L. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles of Different Particle Size against *Vibrio Natriegens*. *PloS One* **2019**, *14* (9), e0222322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222322>.
- (82) Hussain, A.; Alajmi, M. F.; Khan, M. A.; Pervez, S. A.; Ahmed, F.; Amir, S.; Husain, F. M.; Khan, M. S.; Shaik, G. M.; Hassan, I.; Khan, R. A.; Rehman, Md. T. Biosynthesized Silver Nanoparticle (AgNP) From Pandanus Odorifer Leaf Extract Exhibits Anti-Metastasis and Anti-Biofilm Potentials. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00008>.
- (83) Khorsandi, K.; Keyvani-Ghamsari, S.; Khatibi Shahidi, F.; Hosseinzadeh, R.; Kanwal, S. A Mechanistic Perspective on Targeting Bacterial Drug Resistance with Nanoparticles. *J. Drug Target.* **2021**, *29* (9), 941–959. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2021.1895818>.
- (84) Bednář, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*, 1996th ed.; Marvil.
- (85) Ph.D, D. P. B. *What are the Differences between Eukaryotes and Prokaryotes?*. AZoLifeSciences. <https://www.azolifesciences.com/article/What-are-the-Differences-between-Eukaryotes-and-Prokaryotes.aspx> (accessed 2024-12-17).
- (86) Tripathi, N.; Sapra, A. Gram Staining. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2024.
- (87) *Bacterial Growth Curve - Phases, & its Factors*. GeeksforGeeks. <https://www.geeksforgeeks.org/bacterial-growth-curve-phases-its-factors/> (accessed 2024-12-22).
- (88) Enache-Angoulvant, A.; Hennequin, C. Invasive *Saccharomyces* Infection: A Comprehensive Review. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41* (11), 1559–1568. <https://doi.org/10.1086/497832>.
- (89) Ballet, N.; Renaud, S.; Roume, H.; George, F.; Vandekerckove, P.; Boyer, M.; Durand-Dubief, M. *Saccharomyces Cerevisiae*: Multifaceted Applications in One Health and the Achievement of Sustainable Development Goals. *Encyclopedia* **2023**, *3* (2), 602–613. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia3020043>.
- (90) Allison, D. L.; Willems, H. M. E.; Jayatilake, J. A. M. S.; Bruno, V. M.; Peters, B. M.; Shirtliff, M. E. *Candida–Bacteria Interactions: Their Impact on Human Disease*. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4* (3), 10.1128/microbiolspec.vmbf-0030–2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0030-2016>.
- (91) Kabir, M. A.; Hussain, M. A.; Ahmad, Z. *Candida Albicans: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens*. *ISRN Microbiol.* **2012**, *2012*, 538694. <https://doi.org/10.5402/2012/538694>.
- (92) Parambath, S.; Dao, A.; Kim, H. Y.; Zawahir, S.; Alastruey Izquierdo, A.; Tacconelli, E.; Govender, N.; Oladele, R.; Colombo, A.; Sorrell, T.; Ramon-Pardo, P.; Fusire, T.; Gigante, V.; Sati, H.; Morrissey, C. O.; Alffenaar, J.-W.; Beardsley, J. *Candida Albicans—A Systematic Review to Inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List*. *Med. Mycol.* **2024**, *62* (6), myae045. <https://doi.org/10.1093/mmy/myae045>.
- (93) CUNHA, F. A.; MAIA, K. R.; MALLMAN, E. J. J.; CUNHA, M. da C. dos S. O.; MACIEL, A. A. M.; de SOUZA, I. P.; MENEZES, E. A.; FECHINE, P. B. A. SILVER

NANOPARTICLES-DISK DIFFUSION TEST AGAINST *Escherichia Coli* ISOLATES. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **2016**, 58, 73. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658073>.

- (94) Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibensouda, S. K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, 6 (2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- (95) Smaill, F. Antibiotic Susceptibility and Resistance Testing: An Overview. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2000**, 14 (10), 382415. <https://doi.org/10.1155/2000/382415>.
- (96) Duval, R. E.; Gouyau, J.; Lamouroux, E. Limitations of Recent Studies Dealing with the Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles: Fact and Opinion. *Nanomaterials* **2019**, 9 (12), 1775. <https://doi.org/10.3390/nano9121775>.
- (97) *Průručka pro bakaláře 3. LF UK*. <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/mikrobiologie-nova/Prukaz-primy/Prukaz-kultivacni/Antibiotika/Dilucni-metoda> (accessed 2024-12-17).
- (98) Baker, C. N.; Stocker, S. A.; Culver, D. H.; Thornsberry, C. Comparison of the E Test to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **1991**, 29 (3), 533–538. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.3.533-538.1991>.
- (99) Chung, E.; Ren, G.; Johnston, I.; Matharu, R. K.; Ciric, L.; Walecka, A.; Cheong, Y.-K. Applied Methods to Assess the Antimicrobial Activity of Metallic-Based Nanoparticles. *Bioengineering* **2023**, 10 (11), 1259. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10111259>.
- (100) Pan, H.; Zhang, Y.; He, G.-X.; Katagori, N.; Chen, H. A Comparison of Conventional Methods for the Quantification of Bacterial Cells after Exposure to Metal Oxide Nanoparticles. *BMC Microbiol.* **2014**, 14 (1), 222. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0222-6>.
- (101) Loo, Y. Y.; Rukayadi, Y.; Nor-Khaizura, M.-A.-R.; Kuan, C. H.; Chieng, B. W.; Nishibuchi, M.; Radu, S. In Vitro Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-Negative Foodborne Pathogens. *Front. Microbiol.* **2018**, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01555>.
- (102) Ruparelia, J. P.; Chatterjee, A. K.; Duttagupta, S. P.; Mukherji, S. Strain Specificity in Antimicrobial Activity of Silver and Copper Nanoparticles. *Acta Biomater.* **2008**, 4 (3), 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>.
- (103) Okkeh, M.; Bloise, N.; Restivo, E.; De Vita, L.; Pallavicini, P.; Visai, L. Gold Nanoparticles: Can They Be the Next Magic Bullet for Multidrug-Resistant Bacteria? *Nanomaterials* **2021**, 11 (2), 312. <https://doi.org/10.3390/nano11020312>.
- (104) Xing, X.; Ma, W.; Zhao, X.; Wang, J.; Yao, L.; Jiang, X.; Wu, Z. Interaction between Surface Charge-Modified Gold Nanoparticles and Phospholipid Membranes. *Langmuir* **2018**, 34 (42), 12583–12589. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01700>.
- (105) Zhou, Y.; Kong, Y.; Kundu, S.; Cirillo, J. D.; Liang, H. Antibacterial Activities of Gold and Silver Nanoparticles against *Escherichia Coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. *J. Nanobiotechnology* **2012**, 10 (1), 19. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-19>.
- (106) Badwaik, V. D.; Vangala, L. M.; Pender, D. S.; Willis, C. B.; Aguilar, Z. P.; Gonzalez, M. S.; Paripelly, R.; Dakshinamurthy, R. Size-Dependent Antimicrobial Properties of Sugar-Encapsulated Gold Nanoparticles Synthesized by a Green Method. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, 7 (1), 623. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-623>.
- (107) Jia, Y.-P.; Ma, B.-Y.; Wei, X.-W.; Qian, Z.-Y. The *in Vitro* and *in Vivo* Toxicity of Gold Nanoparticles. *Chin. Chem. Lett.* **2017**, 28 (4), 691–702. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2017.01.021>.

- (108) Alkilany, A. M.; Murphy, C. J. Toxicity and Cellular Uptake of Gold Nanoparticles: What We Have Learned so Far? *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12* (7), 2313–2333. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>.
- (109) Kytsya, A.; Bazylyak, L.; Hrynda, Y.; Horechyy, A.; Medvedevdkikh, Y. The Kinetic Rate Law for the Autocatalytic Growth of Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles. *Int. J. Chem. Kinet.* **2015**, *47* (6), 351–360. <https://doi.org/10.1002/kin.20913>.
- (110) Chapa González, C.; González García, L. I.; Burciaga Jurado, L. G.; Carrillo Castillo, A. Bactericidal Activity of Silver Nanoparticles in Drug-Resistant Bacteria. *Braz. J. Microbiol.* **2023**, *54* (2), 691–701. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00991-7>.
- (111) Liao, C.; Li, Y.; Tjong, S. C. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (2), 449. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>.
- (112) Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Size-Controlled Silver Nanoparticles Synthesized over the Range 5–100 Nm Using the Same Protocol and Their Antibacterial Efficacy. *RSC Adv.* **2013**, *4* (8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>.
- (113) Mughal, S.; Abbas, F.; Tahir, M.; Ayub, A.; Javed, H.; Mamtaz, M.; Iram, H. Role of Silver Nanoparticles in Colorimetric Detection of Biomolecules. *Biomed. Nurs.* **2019**, *5* (4). <https://doi.org/10.7537/marsbnj050419.04>.
- (114) Fayaz, A. M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Yadav, R.; Kalaichelvan, P. T.; Venketesan, R. Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Synergistic Effect with Antibiotics: A Study against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, *6* (1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.006>.
- (115) Fathil, M. A. M.; Katas, H. Antibacterial, Anti-Biofilm and Pro-Migratory Effects of Double Layered Hydrogels Packaged with Lactoferrin-DsiRNA-Silver Nanoparticles for Chronic Wound Therapy. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (3), 991. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030991>.
- (116) Rodriguez-Garraus, A.; Azqueta, A.; Vettorazzi, A.; López de Cerain, A. Genotoxicity of Silver Nanoparticles. *Nanomaterials* **2020**, *10* (2), 251. <https://doi.org/10.3390/nano10020251>.
- (117) Jin, J.-C.; Wu, X.-J.; Xu, J.; Wang, B.-B.; Jiang, F.-L.; Liu, Y. Ultrasmall Silver Nanoclusters: Highly Efficient Antibacterial Activity and Their Mechanisms. *Biomater. Sci.* **2017**, *5* (2), 247–257. <https://doi.org/10.1039/C6BM00717A>.
- (118) Ermini, M. L.; Voliani, V. Antimicrobial Nano-Agents: The Copper Age. *ACS Nano* **2021**, *15* (4), 6008–6029. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10756>.
- (119) Suramwar, N. V.; Thakare, S. R.; Khaty, N. T. One Pot Synthesis of Copper Nanoparticles at Room Temperature and Its Catalytic Activity. *Arab. J. Chem.* **2016**, *9*, S1807–S1812. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.034>.
- (120) Lu, R.; Hao, W.; Kong, L.; Zhao, K.; Bai, H.; Liu, Z. A Simple Method for the Synthesis of Copper Nanoparticles from Metastable Intermediates. *RSC Adv.* **2023**, *13* (21), 14361–14369. <https://doi.org/10.1039/D3RA01082A>.
- (121) Shehabeldine, A. M.; Amin, B. H.; Hagraas, F. A.; Ramadan, A. A.; Kamel, M. R.; Ahmed, M. A.; Atia, K. H.; Salem, S. S. Potential Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Copper Oxide Nanoparticles: Time-Kill Kinetic Essay and Ultrastructure of Pathogenic Bacterial Cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2023**, *195* (1), 467–485. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04120-2>.
- (122) Gawande, M. B.; Goswami, A.; Felpin, F.-X.; Asefa, T.; Huang, X.; Silva, R.; Zou, X.; Zboril, R.; Varma, R. S. Cu and Cu-Based Nanoparticles: Synthesis and Applications in Catalysis. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (6), 3722–3811. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00482>.
- (123) Lai, M.-J.; Huang, Y.-W.; Chen, H.-C.; Tsao, L.-I.; Chang Chien, C.-F.; Singh, B.; Liu, B. R. Effect of Size and Concentration of Copper Nanoparticles on the Antimicrobial

- Activity in Escherichia Coli through Multiple Mechanisms. *Nanomaterials* **2022**, *12* (21), 3715. <https://doi.org/10.3390/nano12213715>.
- (124) Anima, B.; Mondal, P.; Gurusubramanian, G.; Roy, V. K. Mechanistic Study of Copper Nanoparticle (CuNP) Toxicity on the Mouse Uterus via Apelin Signaling. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2023**, *30* (38), 88824–88841. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28746-9>.
 - (125) Akhuli, A.; Chakraborty, D.; Agrawal, A. K.; Sarkar, M. Probing the Interaction of Bovine Serum Albumin with Copper Nanoclusters: Realization of Binding Pathway Different from Protein Corona. *Langmuir* **2021**, *37* (5), 1823–1837. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c03176>.
 - (126) Packirisamy, V.; Pandurangan, P. Interaction of Atomically Precise Thiolated Copper Nanoclusters with Proteins: A Comparative Study. *ACS Omega* **2022**, *7* (46), 42550–42559. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06011>.
 - (127) McNamara, K.; Tofail, S. A. M. Nanoparticles in Biomedical Applications. *Adv. Phys. X* **2017**, *2* (1), 54–88. <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1254570>.
 - (128) Shah, M. A.; Bhat, M. A.; Davim, J. P. *Nanotechnology Applications for Improvements in Energy Efficiency and Environmental Management*; IGI Global, 1AD.
 - (129) Khan, A. K.; Rashid, R.; Murtaza, G.; Zahra, A. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. *Trop. J. Pharm. Res.* **2014**, *13* (7), 1169–1177. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i7.23>.
 - (130) Hu, J.; Wang, Z.; Li, J. Gold Nanoparticles With Special Shapes: Controlled Synthesis, Surface-Enhanced Raman Scattering, and The Application in Biodetection. *Sensors* **2007**, *7* (12), 3299–3311.
 - (131) Singh, P.; Pandit, S.; Mokkaapati, V. R. S. S.; Garg, A.; Ravikumar, V.; Mijakovic, I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (7), 1979. <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>.
 - (132) Ning, L.; Zhu, B.; Gao, T. Gold Nanoparticles: Promising Agent to Improve the Diagnosis and Therapy of Cancer. *Curr. Drug Metab.* **18** (11), 1055–1067. <https://doi.org/10.2174/1389200218666170925122513>.
 - (133) Dykman, L. A.; Khlebtsov, N. G. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae* **2011**, *3* (2), 34–55.
 - (134) Le, W.; Cui, S.; Chen, X.; Zhu, H.; Chen, B.; Cui, Z. Facile Synthesis of Gd-Functionalized Gold Nanoclusters as Potential MRI/CT Contrast Agents. *Nanomaterials* **2016**, *6* (4), 65. <https://doi.org/10.3390/nano6040065>.
 - (135) Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Focella, T. M.; Smilowitz, H. M. Gold Nanoparticles: A New X-Ray Contrast Agent. *Br. J. Radiol.* **2006**, *79* (939), 248–253. <https://doi.org/10.1259/bjr/13169882>.
 - (136) Wang, S.; Lu, G.; Wang, S.; Lu, G. Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Imaging and Treatment. In *Noble and Precious Metals - Properties, Nanoscale Effects and Applications*; IntechOpen, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70901>.
 - (137) *Cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed 2024-10-07).
 - (138) Zhao, C.-Y.; Cheng, R.; Yang, Z.; Tian, Z.-M. Nanotechnology for Cancer Therapy Based on Chemotherapy. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2018**, *23* (4), 826. <https://doi.org/10.3390/molecules23040826>.
 - (139) Jain, S.; Coulter, J. A.; Hounsell, A. R.; Butterworth, K. T.; McMahon, S. J.; Hyland, W. B.; Muir, M. F.; Dickson, G. R.; Prise, K. M.; Currell, F. J.; O’Sullivan, J. M.; Hirst, D. G. Cell-Specific Radiosensitization by Gold Nanoparticles at Megavoltage Radiation Energies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2011**, *79* (2), 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.08.044>.

- (140) Maeda, H. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41* (1), 189–207. [https://doi.org/10.1016/S0065-2571\(00\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2571(00)00013-3).
- (141) Dai, Y.; Xu, C.; Sun, X.; Chen, X. Nanoparticle Design Strategies for Enhanced Anticancer Therapy by Exploiting the Tumour Microenvironment. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (12), 3830–3852. <https://doi.org/10.1039/C6CS00592F>.
- (142) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (143) Hirsch, L. R.; Stafford, R. J.; Bankson, J. A.; Sershen, S. R.; Rivera, B.; Price, R. E.; Hazle, J. D.; Halas, N. J.; West, J. L. Nanoshell-Mediated near-Infrared Thermal Therapy of Tumors under Magnetic Resonance Guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (23), 13549–13554. <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.2232479100>.
- (144) Hussein, E. A.; Zagho, M. M.; Nasrallah, G. K.; Elzatahry, A. A. Recent Advances in Functional Nanostructures as Cancer Photothermal Therapy. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 2897–2906. <https://doi.org/10.2147/IJN.S161031>.
- (145) Cheng, Y.; Samia, A. C.; Meyers, J. D.; Panagopoulos, I.; Fei, B.; Burda, C. Highly Efficient Drug Delivery with Gold Nanoparticle Vectors for in Vivo Photodynamic Therapy of Cancer. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (32), 10643–10647. <https://doi.org/10.1021/ja801631c>.
- (146) Lucky, S. S.; Soo, K. C.; Zhang, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (4), 1990–2042. <https://doi.org/10.1021/cr5004198>.
- (147) Seo, S.-H.; Kim, B.-M.; Joe, A.; Han, H.-W.; Chen, X.; Cheng, Z.; Jang, E.-S. NIR-Light-Induced Surface-Enhanced Raman Scattering for Detection and Photothermal/Photodynamic Therapy of Cancer Cells Using Methylene Blue-Embedded Gold nanorod@SiO₂ Nanocomposites. *Biomaterials* **2014**, *35* (10), 3309–3318. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.066>.
- (148) Su, X.-Y.; Liu, P.-D.; Wu, H.; Gu, N. Enhancement of Radiosensitization by Metal-Based Nanoparticles in Cancer Radiation Therapy. *Cancer Biol. Med.* **2014**, *11* (2), 86–91. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.02.003>.
- (149) Mesbahi, A. A Review on Gold Nanoparticles Radiosensitization Effect in Radiation Therapy of Cancer. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **2010**, *15* (6), 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2010.09.001>.
- (150) Kwatra, D.; Venugopal, A.; Anant, S. Nanoparticles in Radiation Therapy: A Summary of Various Approaches to Enhance Radiosensitization in Cancer. *Transl. Cancer Res.* **2013**, *2* (4). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.06>.
- (151) Jeremic, B.; Aguerri, A. R.; Filipovic, N. Radiosensitization by Gold Nanoparticles. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **2013**, *15* (8), 593–601. <https://doi.org/10.1007/s12094-013-1003-7>.
- (152) Yasui, H.; Takeuchi, R.; Nagane, M.; Meike, S.; Nakamura, Y.; Yamamori, T.; Ikenaka, Y.; Kon, Y.; Murotani, H.; Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Inanami, O. Radiosensitization of Tumor Cells through Endoplasmic Reticulum Stress Induced by PEGylated Nanogel Containing Gold Nanoparticles. *Cancer Lett.* **2014**, *347* (1), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.02.005>.
- (153) Dorsey, J. F.; Sun, L.; Joh, D. Y.; Witztum, A.; Zaki, A. A.; Kao, G. D.; Alonso-Basanta, M.; Avery, S.; Tsourkas, A.; Hahn, S. M. Gold Nanoparticles in Radiation Research: Potential Applications for Imaging and Radiosensitization. *Transl. Cancer Res.* **2013**, *2* (4). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.09>.

- (154) Carter, J. D.; Cheng, N. N.; Qu, Y.; Suarez, G. D.; Guo, T. Nanoscale Energy Deposition by X-Ray Absorbing Nanostructures. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (40), 11622–11625. <https://doi.org/10.1021/jp075253u>.
- (155) Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **2006**, *6* (4), 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>.
- (156) Cho, E. C.; Au, L.; Zhang, Q.; Xia, Y. The Effects of Size, Shape, and Surface Functional Group of Gold Nanostructures on Their Adsorption and Internalization by Cells. *Small Wein. Bergstr. Ger.* **2010**, *6* (4), 517–522. <https://doi.org/10.1002/sml.200901622>.
- (157) Ma, Z.; Xia, H.; Liu, Y.; Liu, B.; Chen, W.; Zhao, Y. Applications of Gold Nanorods in Biomedical Imaging and Related Fields. *Chin. Sci. Bull.* **2013**, *58* (21), 2530–2536. <https://doi.org/10.1007/s11434-013-5720-7>.
- (158) Perrault, S. D.; Walkey, C.; Jennings, T.; Fischer, H. C.; Chan, W. C. W. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Lett.* **2009**, *9* (5), 1909–1915. <https://doi.org/10.1021/nl900031y>.
- (159) Kaul, G.; Amiji, M. Long-Circulating Poly(Ethylene Glycol)-Modified Gelatin Nanoparticles for Intracellular Delivery. *Pharm. Res.* **2002**, *19* (7), 1061–1067. <https://doi.org/10.1023/A:1016486910719>.
- (160) Jones, S. W.; Christison, R.; Bundell, K.; Joyce, C. J.; Brockbank, S. M. V.; Newham, P.; Lindsay, M. A. Characterisation of Cell-Penetrating Peptide-Mediated Peptide Delivery. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145* (8), 1093–1102. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706279>.
- (161) Habault, J.; Poyet, J.-L. Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies. *Molecules* **2019**, *24* (5), 927. <https://doi.org/10.3390/molecules24050927>.
- (162) Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, U.; Futaki, S.; Gräslund, A. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *J. Biophys. Hindawi Publ. Corp. Online* **2011**, *2011*, 414729. <https://doi.org/10.1155/2011/414729>.
- (163) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. The Transport of Molecules between the Nucleus and the Cytosol. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*; Garland Science, 2002.
- (164) Tomáš, T.; Janíček, P.; Pazourek, L.; Mahdal, M. Osteosarkom. *Onkologie* **2017**, *11* (6), 294–298. <https://doi.org/10.36290/xon.2017.054>.
- (165) Mottl, H.; Kruseová, J.; Schovanec, J. Osteosarkom: současné možnosti diagnostiky a léčby. *Onkologie* **2011**, *5* (2), 96–98.
- (166) Adámková Krákorová D. Léčba kostních sarkomů z pohledu onkologa. *Onkológia* **2011** (6), 81–85.
- (167) Mamo, T.; Mladek, A. C.; Shogren, K. L.; Gustafson, C.; Gupta, S. K.; Riester, S. M.; Maran, A.; Galindo, M.; van Wijnen, A. J.; Sarkaria, J. N.; Yaszemski, M. J. Inhibiting DNA-PKCS Radiosensitizes Human Osteosarcoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *486* (2), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.033>.
- (168) McAllister, R. M.; Gardner, M. B.; Greene, A. E.; Bradt, C.; Nichols, W. W.; Landing, B. H. Cultivation in Vitro of Cells Derived from a Human Osteosarcoma. *Cancer* **1971**, *27* (2), 397–402. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197102\)27:2<397::AID-CNCR2820270224>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197102)27:2<397::AID-CNCR2820270224>3.0.CO;2-X).
- (169) Botter, S. M.; Arlt, M. J. E.; Born, W.; Fuchs, B. Chapter 30 - Mammalian Models of Bone Sarcomas. In *Bone Cancer (Second Edition)*; Heymann, D., Ed.; Academic Press: San Diego, 2015; pp 349–363. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416721-6.00030-3>.

- (170) MTS Cell Proliferation Colorimetric Assay KIT - Data Sheet, Biovision, Inc., 2019.
<https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/data/datasheet/BVN/K300.pdf>.
- (171) Ah, C.; Tc, O.; Ja, B.; Jg, C. Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth Assays in Culture. *Cancer Commun.* **1991**, 3 (7).
<https://doi.org/10.3727/095535491820873191>.
- (172) Bureš, Z. Příprava a charakterizace nanozlata a nanostříbra. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2010.
- (173) Khan, S.; Rukayadi, Y.; Jaafar, A. H.; Ahmad, N. H. Antibacterial Potential of Silver Nanoparticles (SP-AgNPs) Synthesized from Syzygium Polyanthum (Wight) Walp. against Selected Foodborne Pathogens. *Heliyon* **2023**, 9 (12).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22771>.
- (174) Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test | OECD.
https://www.oecd.org/en/publications/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en.html (accessed 2024-12-21).
- (175) McGillicuddy, E.; Murray, I.; Kavanagh, S.; Morrison, L.; Fogarty, A.; Cormican, M.; Dockery, P.; Prendergast, M.; Rowan, N.; Morris, D. Silver Nanoparticles in the Environment: Sources, Detection and Ecotoxicology. *Sci. Total Environ.* **2017**, 575, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>.
- (176) Courtois, P.; Rorat, A.; Lemiere, S.; Guyoneaud, R.; Attard, E.; Levard, C.; Vandenbulcke, F. Ecotoxicology of Silver Nanoparticles and Their Derivatives Introduced in Soil with or without Sewage Sludge: A Review of Effects on Microorganisms, Plants and Animals. *Environ. Pollut.* **2019**, 253, 578–598.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.053>.
- (177) Wang, F.; Richards, V. N.; Shields, S. P.; Buhro, W. E. Kinetics and Mechanisms of Aggregative Nanocrystal Growth. *Chem. Mater.* **2014**, 26 (1), 5–21.
<https://doi.org/10.1021/cm402139r>.
- (178) Asadi, A.; Pourfattah, F.; Miklós Szilágyi, I.; Afrand, M.; Żyła, G.; Seon Ahn, H.; Wongwises, S.; Minh Nguyen, H.; Arabkoohsar, A.; Mahian, O. Effect of Sonication Characteristics on Stability, Thermophysical Properties, and Heat Transfer of Nanofluids: A Comprehensive Review. *Ultrason. Sonochem.* **2019**, 58, 104701.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104701>.
- (179) Glaubitz, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Balog, S.; Petri-Fink, A. Designing the Ultrasonic Treatment of Nanoparticle-Dispersions via Machine Learning. *Nanoscale* **14** (35), 12940–12950. <https://doi.org/10.1039/d2nr03240f>.
- (180) Grouchko, M.; Popov, I.; Uvarov, V.; Magdassi, S.; Kamysny, A. Coalescence of Silver Nanoparticles at Room Temperature: Unusual Crystal Structure Transformation and Dendrite Formation Induced by Self-Assembly. *Langmuir* **2009**, 25 (4), 2501–2503.
<https://doi.org/10.1021/la803843k>.
- (181) Castillo-Henríquez, L.; Alfaro-Aguilar, K.; Ugalde-Álvarez, J.; Vega-Fernández, L.; Montes de Oca-Vásquez, G.; Vega-Baudrit, J. R. Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles from Plant Extracts and Their Possible Applications as Antimicrobial Agents in the Agricultural Area. *Nanomaterials* **2020**, 10 (9), 1763.
<https://doi.org/10.3390/nano10091763>.
- (182) Rivera, A.; Viñado, B.; Benito, N.; Docobo-Pérez, F.; Fernández-Cuenca, F.; Fernández-Domínguez, J.; Guinea, J.; López-Navas, A.; Moreno, M. Á.; Larrosa, M. N.; Oliver, A.; Navarro, F. Recommendations of the Spanish Antibiogram Committee (COESANT) for *in Vitro* Susceptibility Testing of Antimicrobial Agents by Disk Diffusion. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clin. Engl. Ed* **2023**, 41 (9), 571–576.
<https://doi.org/10.1016/j.eimce.2022.12.009>.

- (183) Oprsal, J.; Bures, Z.; Vlcek, M.; Knotek, P.; Pouzar, M.; Benes, L. A Study of Silver Nanoparticles Behavior in Liquid Media for Ecotoxicity Tests. *Adv. Sci. Eng. Med.* **2013**, *5* (6), 589–592. <https://doi.org/10.1166/ase.2013.1318>.
- (184) Falagan-Lotsch, P.; Grzincic, E. M.; Murphy, C. J. One Low-Dose Exposure of Gold Nanoparticles Induces Long-Term Changes in Human Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113* (47), 13318–13323. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616400113>.
- (185) Xiao, Y.; Zhang, E.; Fu, A. Promotion of SH-SY5Y Cell Growth by Gold Nanoparticles Modified with 6-Mercaptopurine and a Neuron-Penetrating Peptide. *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, *12* (1), 641. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2417-x>.

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Porovnání velikosti nanomateriálů (v logaritmické škále) s biologickými objekty a definice velikostí "nano" a "mikro". ¹¹	15
Obrázek 2: Běžně využívané syntetické metody nanočástic „top-down“ a „bottom-up“ přístupy. ^{11,21}	17
Obrázek 3: Příprava nanočástic laserovou ablací. ²³	18
Obrázek 4: LaMerův graf ilustrující oddělenou nukleaci a růst během syntézy monodisperzních nanočástic. S a Sc označují přesycení a kritické přesycení. ³⁴	20
Obrázek 5: Schematické znázornění Ostwaldova zrání při syntéze nanočástic stříbra redukcí ethanolem v amoniakálním prostředí – rozpouštění menších částic doprovázené růstem větších nanočástic. ³⁸	21
Obrázek 6: Tvorba stříbrné nanočástice popsána jednotlivými kroky: redukce stříbrných iontů na stříbrné atomy, nukleace, kde se tvoří nejmenší termodynamicky stabilní shluky a jejich růst za vzniku stříbrných nanočástic – Finke-Watzkyho model. ³⁹	23
Obrázek 7: Schéma orientovaného připojení – jednotlivé krystality koloidu (a) se vzájemně uspořádávají za účelem správné orientace krystalových faset (b), tak aby mohlo dojít k jejich sloučení (c) za vzniku krystalu (d). ⁴⁰	23
Obrázek 8: Diagram biogenní syntézy kovových nanočástic. ⁴¹	25
Obrázek 9: Úloha NADH a na NADH dependentních enzymů v syntéze kovových nanočástic Ag a Au. ⁴³	26
Obrázek 10: Schématické znázornění působení Van der Waalsových přitažlivých sil a elektrostatických odpuzivých sil na koloidní částice a jejich vyjádření pomocí průběhu interakčního potenciálu v závislosti na mezičásticové vzdálenosti. ⁴⁴	27
Obrázek 11: Schématické znázornění: (a) celkového interakčního potenciálu mezi částicemi, ukazujícího primární a sekundární minimum a energetickou bariéru; (b) přitažlivých a odpuzivých sil a jejich příspěvků k interakčnímu potenciálu; (c) nevratné agregace v primárním minimu; a (d) vratné agregace v sekundárním minimu. Hloubka sekundárního minima je kvalitativně zvýrazněna světle modrým kruhem vzhledem k tepelné energii (vyjádřené jako $k_B T$, kde k_B je Boltzmannova konstanta a T je teplota). ⁴⁸	29
Obrázek 12: Příklad spojení elektrostatické a sterické stabilizace. Zlaté nanočástice obklopují iontové povrchově aktivní molekuly s polárními konci a prodlouženými postranními řetězci. Oblast s vysokou lokální koncentrací stabilizátoru brání aglomeraci nanočástic. ⁴⁹	30
Obrázek 13: (A) Helmholtzův, (B) Gouy–Chapmanův a (C) Sternův model elektrické dvojvrstvy vytvořené na kladně nabitých elektrodě ve vodném elektrolytu. ⁵⁰	31
Obrázek 14: Potenciál ζ na povrchu částice – Sternův model. Vnější vrstva elektrické dvojvrstvy se skládá z těsně přiléhající plošné – Sternovy vrstvy, která je tvořena ionty vázanými k vnitřní vrstvě převážně adsorpčními silami (mají oproti elektrostatickým silám krátký dosah) o plošné hustotě náboje menší nežli je plošný náboj vnitřní vrstvy, a z difuzní vrstvy, tvořené ionty vázanými elektrostatickými silami, které neutralizují zbytek náboje vnitřní vrstvy. Potenciál dvojvrstvy klesá nejprve prudce na hodnotu potenciálu Sternovy vrstvy a pak pozvolna k nule. ⁵¹	32
Obrázek 15: Schématické znázornění průběhu křivky potenciálu ζ v závislosti na pH koloidního roztoku nanočástic, znázorňující izoelektrický bod, který určuje míru stability koloidu $pH(pzc) - pH$ v bodě nulového náboje. ⁵¹	33
Obrázek 16: Stabilizace pomocí elektrické dvojvrstvy – při překrytí elektrických dvojvrstev stejně nabitých částic dochází k jejich oddálení vlivem odpuzivých elektrostatických sil. ⁵²	34
Obrázek 17: Stlačení elektrické dvojvrstvy přidávkou elektrolytu – vzrůst iontové síly. ⁵³	35

Obrázek 18: <i>Stérická stabilizace polymerními řetězci (a) a přemostění polymerních řetězců vedoucí k agregaci nanočástic (b).</i> ⁴⁴	37
Obrázek 19: <i>Schematické znázornění elektrostérické stabilizace pomocí iontového polymeru.</i> ⁵²	39
Obrázek 20: <i>Schéma kolektivní oscilace plasmonu (elektronový mrak) pro kulovou částici, znázorňující posun vodivého elektronového náboje vzhledem k jádru.</i> ⁵⁵	40
Obrázek 21: <i>(A) LSPR – oscilace elektronů jsou ve fázi s frekvencí dopadajícího světla na nanočástici (menší, než je vlnová délka dopadajícího světla). Kolektivní oscilace vedou k zesílení lokálního elektromagnetického pole a ostré spektrální odezvě (rozptyl a absorpce). (B) U nanočástic menších než 15 nm je spektrální odezvou dominantně absorpce. (C) U nanočástic větších než 15 nm je spektrální odezvou dominantně rozptyl.</i> ⁵⁷	41
Obrázek 22: <i>Schematické znázornění interakce světla s koloidem kovových nanočástic – rozptyl a absorpce, transmise.</i> ⁵⁶	41
Obrázek 23: <i>UV–VIS spektra různých nanočástic s velikostí částic 50 nm.</i> ⁵⁶	42
Obrázek 24: <i>Charakterizace velikosti nanočástic. a) Kulovité částice jsou popsány jediným parametrem velikosti. Pro charakterizaci neseferických nanočástic, je k úplnému popisu třeba několika rozměrů; b) hodnota efektivního poloměru nanočástice závisí na vlastnosti nanočástic a použité metodě charakterizace; c) různé střední velikosti nanočástic dle zvolené distribuce – početně a objemově vážená distribuce.</i> ¹	46
Obrázek 25: <i>Charakterizace tvaru nanočástic. TEM sice poskytuje nanometrové rozlišení, ale měřený tvar je pouhou 2D projekcí morfologie nanočástic závisící na relativní orientaci nanočástice k elektronovému paprsku. Techniky pracující na základě rozptylu poskytují pouze kvalitativní informaci o tvaru nanočástic.</i> ¹	48
Obrázek 26: <i>Schéma rozložení elektrického náboje na negativně nabitě holé částici, nabitě částici se silnou negativně nabitou polyelektrolytovou vrstvou a nabitě částici s tenkou negativně nabitou polyelektrolytovou. V klasickém modelu holých částic (vlevo) se náboje v kompaktní Sternově vrstvě uvnitř kluzné roviny pohybují spolu s částicí. Náboje mimo kluznou rovinu zůstávají v objemové kapalině. Elektrostatický potenciál v této idealizované kluzné rovině se označuje jako „zeta potenciál“. U potažené částice, pokud je makromolekulární vrstva negativně nabitá (polyelektrolyt) a silná (schéma uprostřed), dosahuje Donnanův potenciál (Ψ_d) přibližně hodnotě zjevného zeta potenciálu. U tenké polyelektrolytové vrstvy se stejnou negativní hustotou náboje (vpravo) je zjevný zeta potenciál menší než Ψ_d. Je třeba poznamenat, že jsou zobrazeny tři zdroje náboje: negativní náboj pocházející ze samotné částice, negativní náboj odvozený od polyelektrolytu spojený s deprotonovanými skupinami na polymeru a náboj pocházející z roztoku související s rozpuštěnými aniony a kationy (kladné a záporné náboje v bílých kroužcích).</i> ⁵⁸	49
Obrázek 27: <i>Schematické srovnání transmisní a skenovací elektronové mikroskopie.</i> ¹	51
Obrázek 28: <i>Interakce kovových nanočástic s bakteriální buňkou.</i> ⁷¹	59
Obrázek 29: <i>Porovnání eukaryotické a prokaryotické buňky.</i> ⁸⁵	63
Obrázek 30: <i>Rozdílná stavba buněčné stěny gramnegativních a grampozitivních bakterií.</i> ⁶	64
Obrázek 31: <i>Růstová křivka bakteriální populace.</i> ⁸⁷	66
Obrázek 32: <i>Různé přístupy modifikace zlatých nanočástic v použití jako antimikrobiálních agens.</i> ¹⁰³	70
Obrázek 33: <i>Schema dvoustupňové syntézy nanočástic stříbra s využitím redukčního činidla NaBH₄ a koredukčního a stabilizačního činidla citronanu sodného.</i> ¹¹³	73
Obrázek 34: <i>Vlastnosti nanočástic – variabilita velikostí a tvarů, funkcionalizace povrchu nanočástic, optické vlastnosti a biokompatibilita.</i> ¹³¹	79

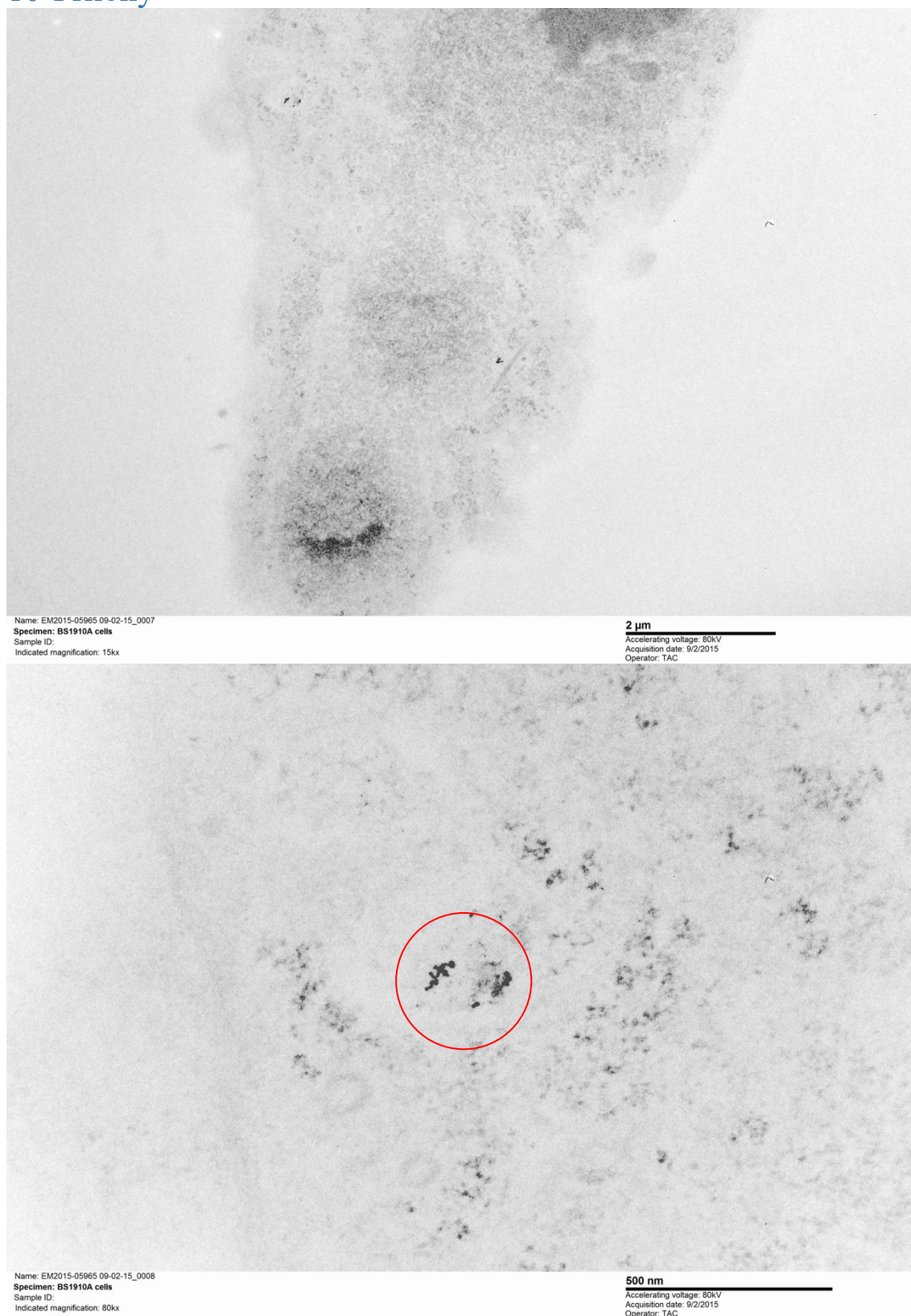
Obrázek 35: Efekt zvýšené permeability a retence, nanočástice pronikají fenestracemi v nádorových cévách a zvýšeně se v nádoru akumulují. ¹⁴¹	81
Obrázek 36: Schematická ilustrace přeměny fotonu elektromagnetického záření na teplo: I) excitace kovové nanočástice absorbovaným fotonem způsobí oscilaci nanočástice a separaci náboje, II) konverze fotonu na teplo procesem elektron-elektronové a elektron – fononové relaxace vede k tvorbě „horké“ krystalové mřížky, III) ochlazení kovové struktury pomocí elektron-fononového couplingu a fonon – fononové relaxace, disipace tepla do okolí. ¹⁴⁴	82
Obrázek 37: Různé způsoby využití zlatých nanočástic v diagnostice a léčbě nádorů. ¹³¹	83
Obrázek 38: Interakce vysokoenergetického ionizujícího záření se zlatou nanočásticí. ¹⁵⁰	84
Obrázek 39: Schématická ilustrace znázorňující lokální depozici energie zprostředkovanou nanočásticemi zlata v těsné blízkosti DNA při ozařování vysokoenergetickými fotony rentgenového záření (100 kVp). Dopadající záření ionizuje molekuly vody, dochází k uniformní produkci radikálů (modré kuličky), sekundární elektrony (Augerovy, fotoelektrony) pocházející z interakce s nanočásticemi vytváří vyšší koncentraci radikálů v jejich blízkosti (červené kuličky). Radikály vznikající v blízkosti 0,5 nm od DNA způsobují jednoduché zlomy (SSB) DNA s 25% účinností. ¹⁵⁴	85
Obrázek 40: Závislost uptake zlatých nanočástic savčími buňkami na jejich velikosti. ¹⁵⁵	86
Obrázek 41: I) Tvorba proteinové korony na povrchu nanočástice při kontaktu s krevní plasmou a jejich vychytávání ve slezině a játrech, II) částečná vazba plasmatických proteinů na povrchu PEG-ylovaných nanočástic prodlužuje dobu cirkulace v krevním řečišti, III) nanočástice funkcionalizované polysorbátem a následná vazba apolipoproteinu E umožňující prostup přes hematoencefalickou bariéru do mozku. ¹³¹	87
Obrázek 42: Schéma možných mechanismů internalizace CPP do buňky. ¹⁶¹	88
Obrázek 43: Aplikace připravených koloidů zlata (vínové) a stříbra (žluté) na agarové plotny s inokulovaným kmenem bakterií.	100
Obrázek 44: 6jamková sterilní destička s Aclar filmem, adherovanými buňkami 143B, připravená pro inkubaci s nanočásticemi BS a ZA.	109
Obrázek 45: Průběh absorpčních křivek pro nanočástice zlata ZA1 s použitím různých stabilizátorů.	110
Obrázek 46: Připravené koloidy nanočástic zlata ZA1 s různými stabilizátory	111
Obrázek 47: Distribuční křivky pro nanočástice Au1.	112
Obrázek 48: Nanočástice Au1 v SEM.	113
Obrázek 49: Hydrodynamický průměr nanočástic stříbra Ag v závislosti na čase.	117
Obrázek 50: AFM topogramy připravených nanočástic stříbra.	117
Obrázek 51: Distribuční křivky velikostí nanočástic AC.	118
Obrázek 52: XRD difraktogram – nafitovaná data pro nanočástice stříbra připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným = Ag3_PVP, glukosou = AG a citronanem sodným.	119
Obrázek 53: Distribuční křivky velikostí nanočástic CI – polydispersní systém.	120
Obrázek 54: Časová závislost nárůstu hydrodynamického průměru D_h nanočástic AG při jejich ředění demineralizovanou vodou (koncentrace 1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).	128
Obrázek 55: Časová závislost ζ potenciálu nanočástic AG při jejich ředění demineralizovanou vodou (koncentrace 1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).	129
Obrázek 56: Časová závislost hydrodynamického průměru D_h nanočástic AG při jejich ředění médiem 203 (koncentrace 1-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).	129
Obrázek 57: Časová závislost hydrodynamického průměru D_h nanočástic AG o koncentraci 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, ředění roztoky o různé iontové síle.	131
Obrázek 58: Distribuční křivka stabilizovaných zlatých nanočástic ZA.	134
Obrázek 59: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující AuNPs (ZA), velikosti 17,3 – 57, 2 nm, přítomné jsou i nanotyčinky (Mayo Clinic, Rochester, MN).	135

Obrázek 60: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující AuNPs (BS) o velikosti 5,4 – 5,8 nm (Mayo Clinic, Rochester, MN).	135
Obrázek 61: Distribuční křivka nestabilizovaných zlatých nanočástic BS po 3 dnech od přípravy ($D_h = 13$ nm).	136
Obrázek 62: Viabilita osteosarkomových buněk 143B po 24hodinové inkubaci se zlatými nanočásticemi o různé koncentraci (0,1, 0,4, 0,8, 4, 8 mmol.dm ⁻³).	137
Obrázek 63: Závislost hydrodynamického průměru zlatých nanočástic AuNPs (BS) a AuNPs.(ZA) na množství přidaného mPEG-SH	138
Obrázek 64: Koloidní roztoky nanočástic AuNPs (BS), barevná změna v závislosti na množství přidaného mPEG-SH, zleva 0, 5, 10, 50, 100, 200, 500 nmol mPEG-SH	139
Obrázek 65: Koloidní roztoky nanočástic AuNPs (ZA), barevná změna v závislosti na množství přidaného mPEG-SH, zleva 0, 5, 10, 50, 100, 200, 500 nmol mPEG-SH	139
Obrázek 66: Absorpční spektrum koloidu zlatých nanočástic BS.	139
Obrázek 67: Absorpční spektrum koloidu zlatých nanočástic ZA.	140
Obrázek 68: Viabilita osteosarkomových buněk 143B po 24hodinové inkubaci se funkcionalizovanými zlatými nanočásticemi (0,4 nmol.dm ⁻³).	141
Obrázek 69: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci s nefunkcionalizovanými AuNPs (BS), různé zvětšení, přítomnost nanočástic v cytoplasmě, (Mayo Clinic, Rochester, MN)	165
Obrázek 70: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci s nefunkcionalizovanými AuNPs (ZA), různé zvětšení, přítomnost nanočástic v cytoplasmě, (Mayo Clinic, Rochester, MN)	166
Obrázek 71: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci AuNPs (BS) funkcionalizovanými CPP, různé zvětšení, (Mayo Clinic, Rochester, MN)	167
Obrázek 72: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci AuNPs (ZA) funkcionalizovanými CPP, různé zvětšení, (Mayo Clinic, Rochester, MN)	168
Obrázek 73: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci AuNPs (BS) funkcionalizovanými CPP+NLS, různé zvětšení, (Mayo Clinic, Rochester, MN)	169
Obrázek 74: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci AuNPs (ZA) funkcionalizovanými CPP+NLS, různé zvětšení, nanočástice přítomné v buněčném jádře, (Mayo Clinic, Rochester, MN)	170

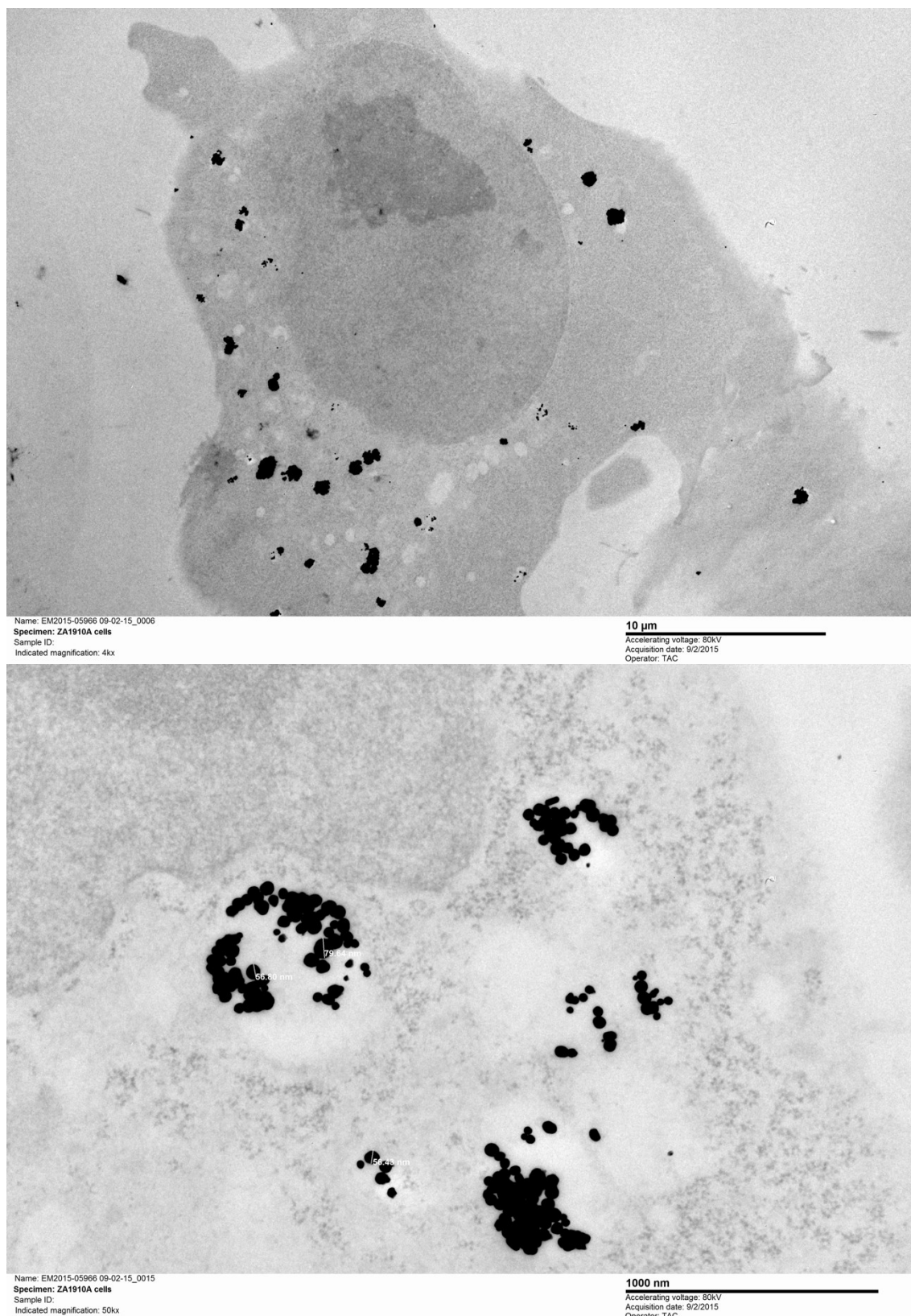
9 Seznam tabulek

Tabulka 1: <i>Síly ovlivňující stabilitu nanočástic v roztoku.</i> ⁴⁴	27
Tabulka 2: <i>Poměry výchozích látek pro přípravu nanočástic zlata ZA.</i>	94
Tabulka 3: <i>Poměry výchozích látek pro přípravu nanočástic stříbra Ag1 – Ag3.</i>	95
Tabulka 4: <i>Poměry výchozích látek pro přípravu nanočástic mědi C1 – C3.</i>	96
Tabulka 5: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Au.</i>	111
Tabulka 6: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Au_PVP.</i>	112
Tabulka 7: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Au po 10 min. působení ultrazvuku.</i>	113
Tabulka 8: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Au_PVP po 10 min. působení ultrazvuku.</i>	114
Tabulka 9: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic stříbra Ag.</i>	114
Tabulka 10: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic stříbra Ag_PVP.</i>	115
Tabulka 11: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Ag po 10 min. působení ultrazvuku.</i>	115
Tabulka 12: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic zlata Ag_PVP po 10 min. působení ultrazvuku.</i>	116
Tabulka 13: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic stříbra AC a AG.</i>	116
Tabulka 14: <i>Parametry nanočástic stříbra získané pomocí AFM.</i>	118
Tabulka 15: <i>Hydrodynamický průměr a ζ potenciál nanočástic mědi C.</i>	120
Tabulka 16: <i>Hodnoty inhibičních zón testovaných nanočástic pro jednotlivé testované mikroorganismy.</i>	122
Tabulka 17: <i>pH testovaných koloidů nanočástic</i>	123
Tabulka 18: <i>Testované koloidy nanočástic – Staphylococcus aureus</i>	124
Tabulka 19: <i>Testované koloidy nanočástic – Escherichia coli</i>	125
Tabulka 20: <i>Testované koloidy nanočástic – Staphylococcus aureus MPB</i>	125
Tabulka 21: <i>Testované koloidy nanočástic – Escherichia coli MPB</i>	126
Tabulka 22: <i>Hydrodynamické průměry připravených nanočástic</i>	133
Tabulka 23: <i>Efekt přídavku mPEG-SH na hodnotu D_h zlatých nanočástic BS.</i>	138
Tabulka 24: <i>Změna polohy absorpčního maxima při modifikaci povrchu nanočástic mPEG-SH.</i>	140

10 Přílohy



Obrázek 69: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci s nefunkcionalizovanými AuNPs (BS), různé zvětšení, přítomnost nanočástic v cytoplasmě, (Mayo Clinic, Rochester, MN)

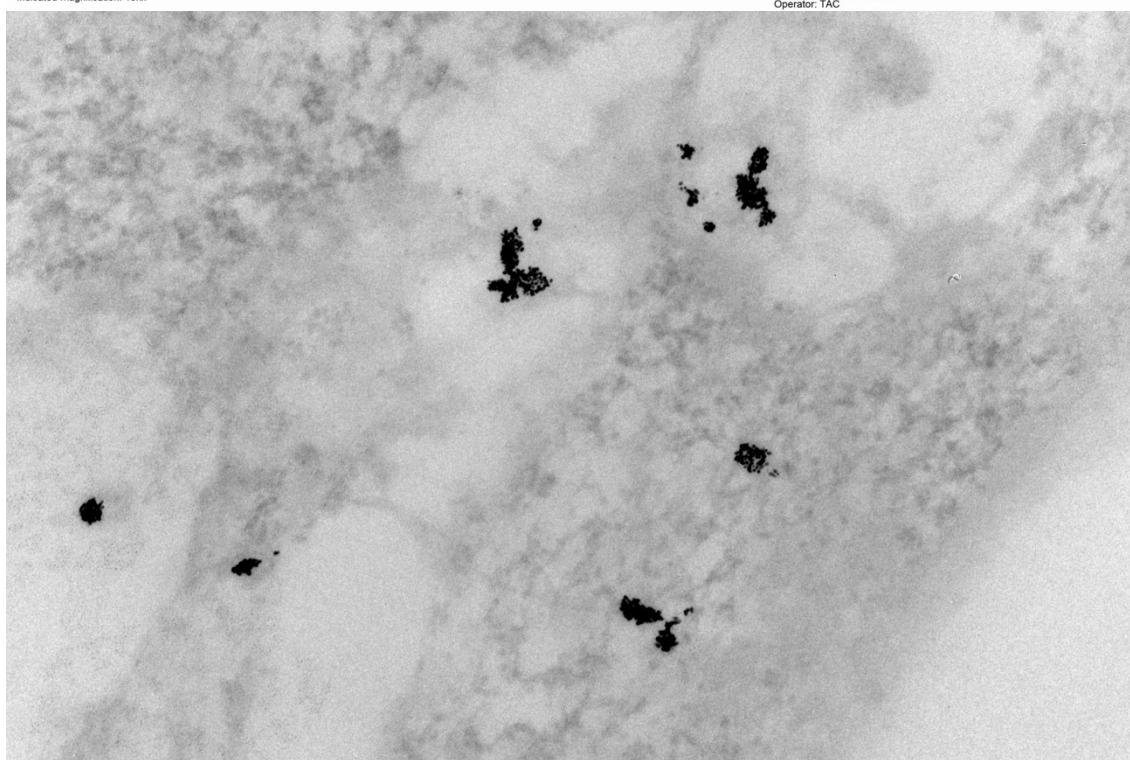


Obrázek 70: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci s nefunkcionalizovanými AuNPs (ZA), různé zvětšení, přítomnost nanočástic v cytoplasmě, (Mayo Clinic, Rochester, MN)



Name: EM2015-06198 9-11-15_0005
Specimen: BS CPP
Sample ID: Block #1
Indicated magnification: 15kx

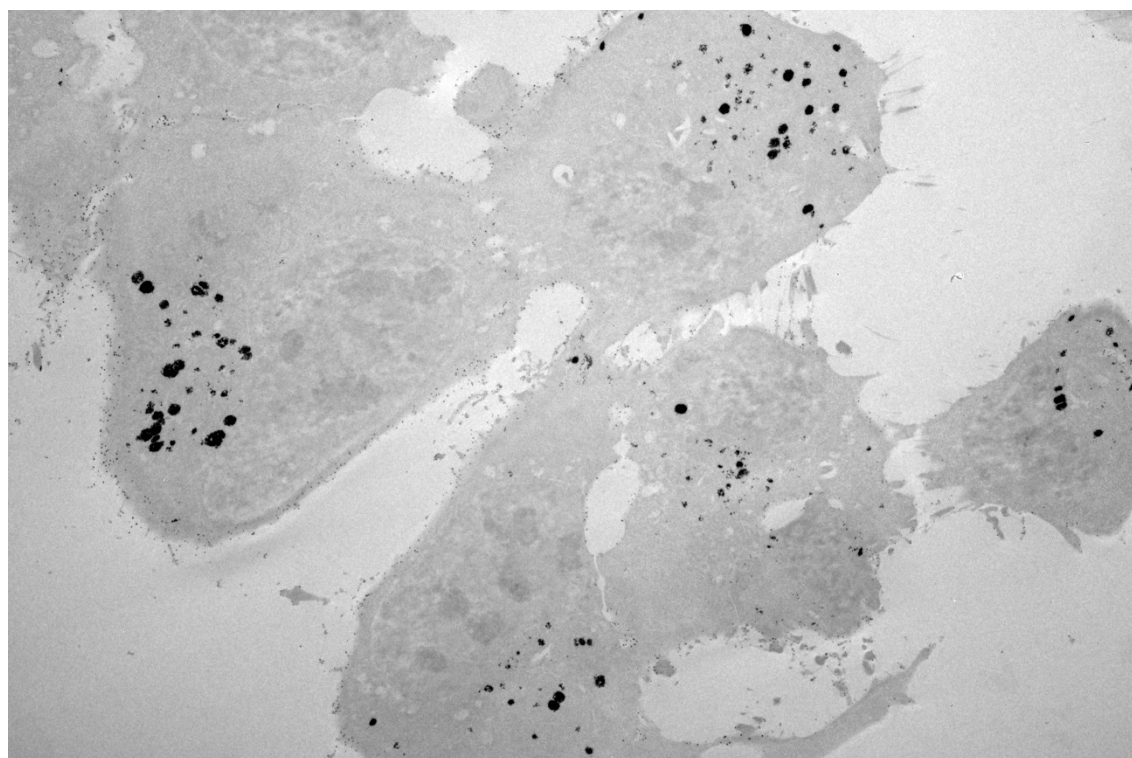
2 μm
Accelerating voltage: 80kV
Acquisition date: 9/11/2015
Operator: TAC



Name: EM2015-06198 9-11-15_0005
Specimen: BS CPP
Sample ID: Block #1
Indicated magnification: 80kx

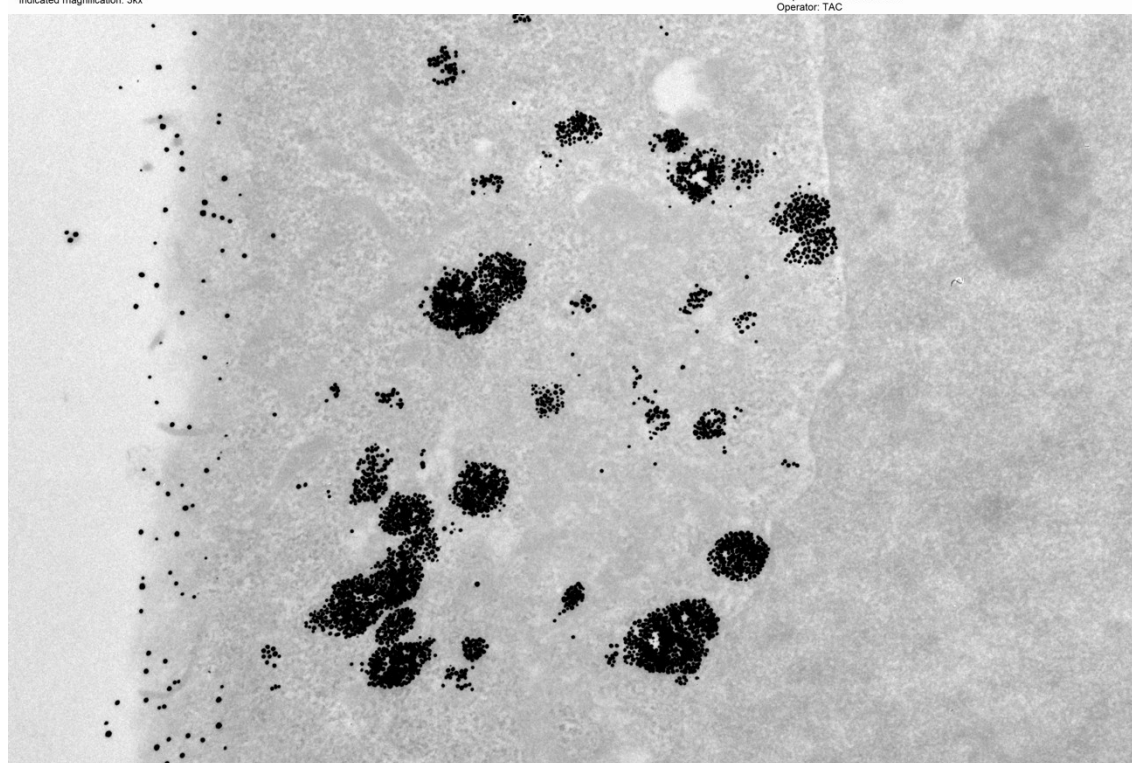
500 nm
Accelerating voltage: 80kV
Acquisition date: 9/11/2015
Operator: TAC

Obrázek 71: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci AuNPs (BS) funkcionalizovanými CPP, různé zvětšení, (Mayo Clinic, Rochester, MN)



Name: EM2015-06196 9-11-15_0010
Specimen: ZA CPP
Sample ID: Block #1
Indicated magnification: 3kx

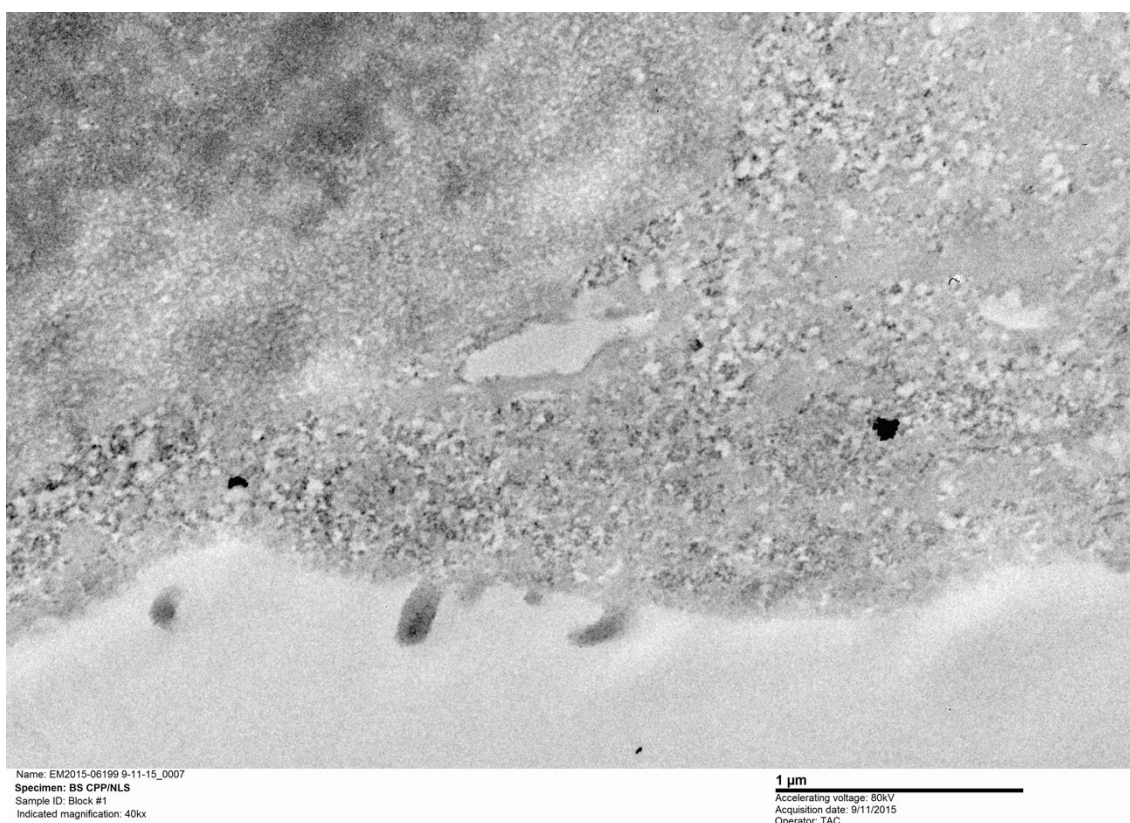
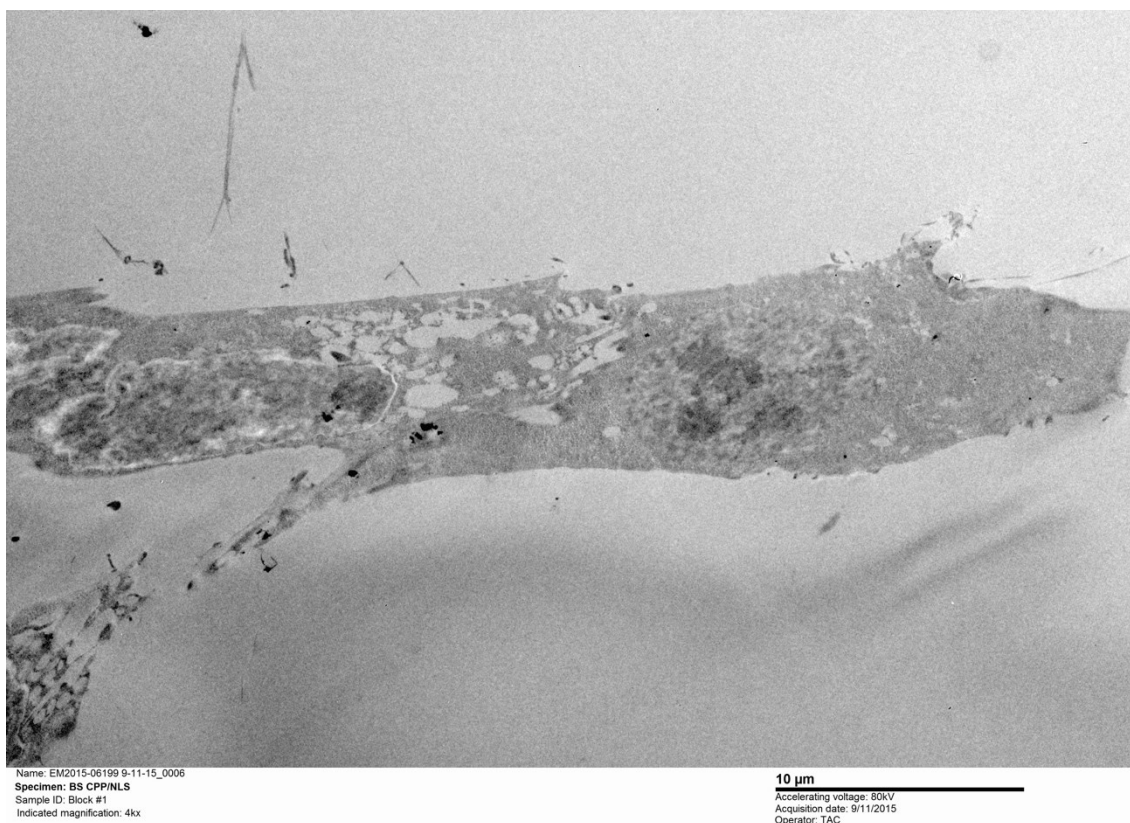
10 μ m
Accelerating voltage: 80kV
Acquisition date: 9/11/2015
Operator: TAC



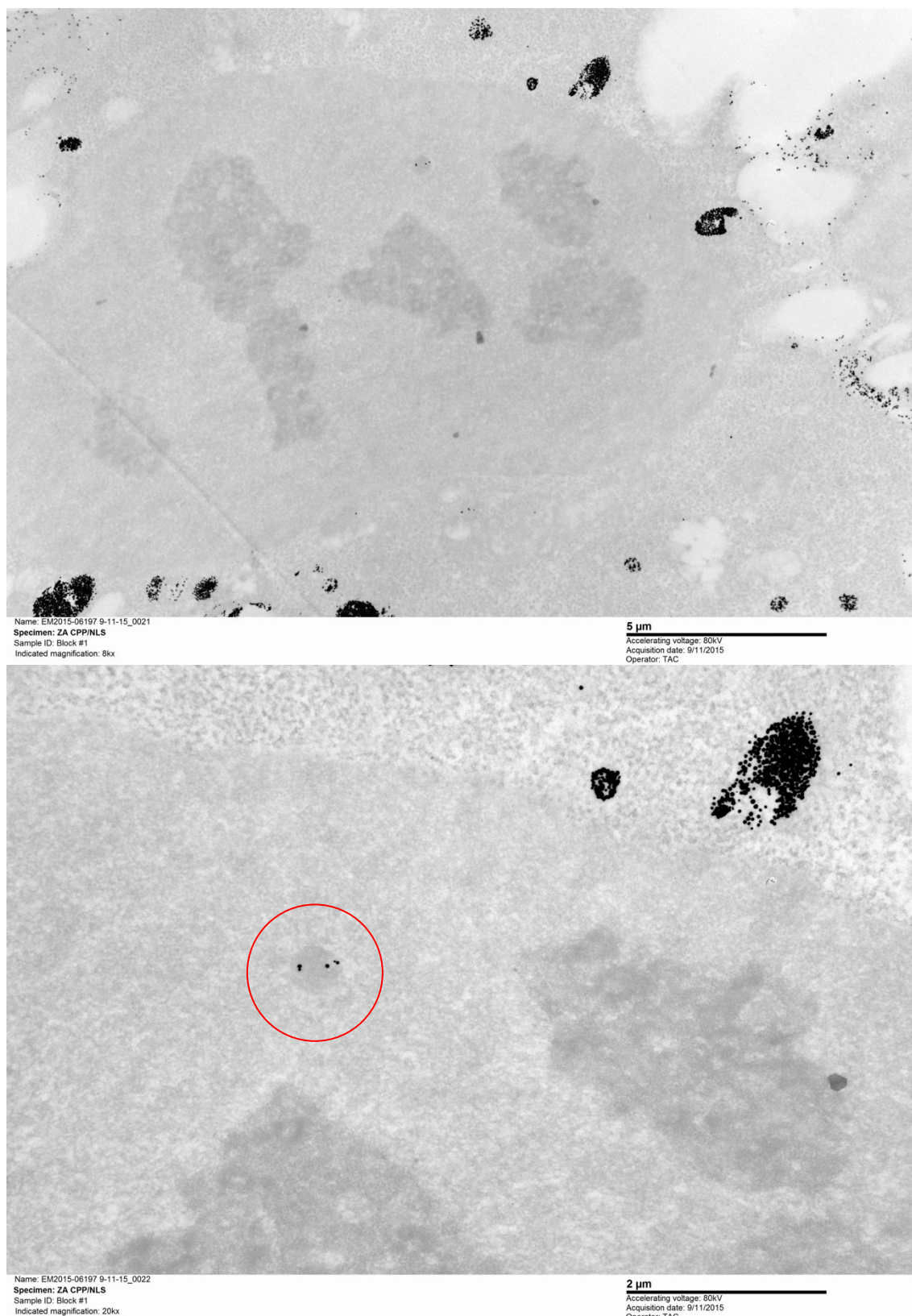
Name: EM2015-06196 9-11-15_0011
Specimen: ZA CPP
Sample ID: Block #1
Indicated magnification: 15kx

2 μ m
Accelerating voltage: 80kV
Acquisition date: 9/11/2015
Operator: TAC

Obrázek 72: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci AuNPs (ZA) funkcionalizovanými CPP, různé zvětšení, (Mayo Clinic, Rochester, MN)



Obrázek 73: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci AuNPs (BS) funkcionalizovanými CPP+NLS, různé zvětšení, (Mayo Clinic, Rochester, MN)



Obrázek 74: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu znázorňující
 osteosarkomové buňky 143B po 24 hod. inkubaci AuNPs (ZA)
 funkcionalizovanými CPP+NLS, různé zvětšení,
 nanočástice přítomné v buněčném jádře, (Mayo Clinic, Rochester, MN)