

Univerzity Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



ZNAČENÍ NANOČÁSTIC STRÍBRA FLUORESCENČNÍMI BARVIVY

Diplomová práce

Autor:	Bc. Jiří Hošek
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Materiálová chemie

Olomouc

2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré informace a podkladové materiály, které jsem při práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto poděkoval svému vedoucímu práce doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D., za cenné rady, trpělivost, ochotu, věnovaný čas a za TEM snímky. Za snímky myších fibroblastů z fluorescenčního mikroskopu děkuji paní Mgr. Šárce Hradilové, Ph.D., a paní Mgr. Renatě Večeřové, Ph.D. děkuji za poskytnuté vzorky bakterií. Paní laborantce Karle Slavičkové děkuji za vstřícný přístup a výpomoc. Dále mé poděkování patří Katedře fyzikální chemie PřF UP v Olomouci za umožnění provedení potřebných experimentů. V neposlední řadě bych tímto chtěl poděkovat mé rodině (i bytové) a kamarádům za jejich podporu a trpělivost během studia.

Bibliografická identifikace:

Autor:	Bc. Jiří Hošek
Název práce:	Značení nanočástic stříbra fluorescenčními barvivy
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta UP
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph. D.
Rok obhajoby práce:	2019
Abstrakt:	<p>Cílem této diplomové práce je syntéza a fluorescenční značení nanočástic stříbra pomocí Rhodaminu B isothiokyanátu za účelem následné detekce takto značených nanočástic stříbra v biologických systémech pomocí fluorescenční mikroskopie. Nanočástice stříbra byly charakterizovány pomocí UV/Vis spektrofotometrie, atomové absorpční spektrometrie a transmisní elektronové mikroskopie. Následně byly připravené nanočástice s navázaným fluoroforem použity ke sledování jejich interakce s buňkami kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, bakterií <i>Escherichia coli</i> a <i>Staphylococcus aureus</i>, a také myších fibroblastů prostřednictvím fluorescenční mikroskopie.</p>
Klíčová slova:	nanočástice stříbra, rhodamin B isothiokyanát, fluorescence, fluorescenční mikroskopie
Počet stran:	69
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author: Bc. Jiri Hosek

Title: Labeling of silver nanoparticles by fluorescent dyes

Type of thesis: Master

Department: Department of physical chemistry, Faculty of science,
Palacky University, Czech Republic

Supervisor: doc. RNDr. Ales Panacek, Ph. D.

The year of presentation: 2019

Abstract: The aim of this thesis is the synthesis and fluorescence labeling of silver nanoparticles with Rhodamine B isothiocyanate for the purpose of subsequent detection of such labeled silver nanoparticles in biological systems using fluorescence microscopy. Silver nanoparticles were characterized by UV / Vis spectrophotometry, atomic absorption spectrometry and transmission electron microscopy. Subsequently, prepared fluorophore-bound nanoparticles were used to monitor their interaction with yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*, bacterias *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and mouse fibroblasts by fluorescence microscopy.

Keywords: silver nanoparticles, rhodamin B isothiocyanate, fluorescence, fluorescence microscopy.

Number of pages: 69

Number of appendices: 0

Language: Czech

OBSAH

Úvod	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Nanomateriály, nanočástice.....	9
1.1. Příprava nanomateriálů.....	11
1.2. Optické vlastnosti koloidů	13
1.3. Elektrické vlastnosti koloidů	14
2. Nanočástice stříbra	16
2.1. Vlastnosti nanočástic stříbra	16
2.1.1. Toxicita nanočástic	18
2.2. Syntéza nanočástic stříbra	19
2.2.1. Fyzikální syntéza	20
2.2.2. Chemická syntéza.....	20
2.2.3. Biologická syntéza.....	21
2.3. Aplikace	22
2.3.1. Biomedicínské aplikace	23
2.3.2. Nanosenzory	24
2.3.3. Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie	25
2.3.4. Dekontaminační technologie	26
3. Fluorescence.....	27
3.1. Fluorescenční mikroskopie.....	29
3.2. Fluorescenční barviva.....	30
3.2.1. Rhodamin B isothiokyanát	31
3.3. Vazba fluoroforů na nanočástice	31
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4. Materiály a přístrojové vybavení	34
4.1. Chemikálie	34

4.2.	Přístrojové vybavení a pomůcky.....	34
4.3.	Příprava fluorescenčně značených nanočástic stříbra	35
4.4.	Fluorescenční mikroskopie kvasinek vystavených nanočásticím stříbra	37
4.5.	Fluorescenční mikroskopie bakterií vystavených nanočásticím stříbra	38
4.6.	Fluorescenční mikroskopie fibroblastů vystavených nanočásticím stříbra	38
5.	Výsledky a diskuze.....	39
5.1.	Fluorescenčně značené nanočástice stříbra.....	39
5.2.	Fluorescenční mikroskopie kvasinek	44
5.3.	Fluorescenční mikroskopie bakterií.....	48
5.4.	Fluorescenční mikropsie fibroblastů.....	55
6.	Závěr	62
7.	Summary	63
	Seznam použité literatury	64

Úvod

Nanotechnologie se staly neodmyslitelnou součástí našeho života. V současné době je téměř nemožné se s nimi nepotkat. Přes počáteční zkoumání v laboratořích, si nanotechnologie vydobily své zasloužené místo a můžeme se s nimi setkat jak v průmyslu, tak i v každodenním životě. S trochou nadsázky lze říct, že v dnešní době neexistuje odvětví nebo obor, kde by nenašly uplatnění nanotechnologie. Nanotechnologie zkrátka ovlivňují a do budoucna budou nadále měnit nebo posouvat téměř všechny vědní obory.

Nanomateriály vykazují odlišné vlastnosti od svých odvozených objemných struktur. Tyto jedinečné vlastnosti jsou důsledkem zejména zvýšení povrchu částice k jejímu objemu a také vysokou reaktivitou nanočástic. Jedinečné vlastnosti nanomateriálů, jako mohou být například optické, biologické, katalytické nebo magnetické vlastnosti, mají veliký aplikační potenciál a jejich potenciální využití je v mnoha oblastech lidské činnosti.

Mezi nejznámější studované a využívané nanomateriály patří nanočástice stříbra, které jsou známy především díky svým antibakteriálním a optickým vlastnostem. Jejich aplikace je velmi různorodá. Od aplikací v medicíně, kde se mohou nanášet na medicínské vybavení nebo hrají důležitou roli při léčbě popálenin, přes používání v obalových materiálech potravin po různé aplikace v optice, v elektronice nebo také v katalýze.

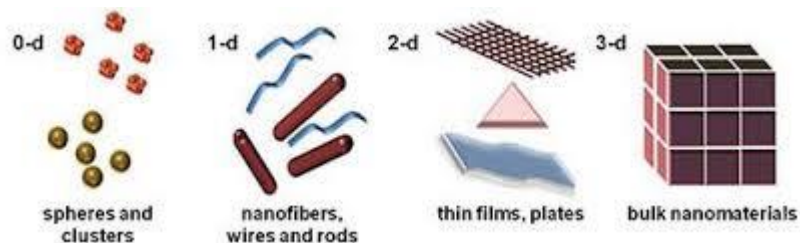
Vzhledem k neustále se navyšující aplikaci nanostříbra jak v průmyslu, tak i v domácnostech, je nezbytné prostudovat stříbrné nanočástice z pohledu jejich nežádoucích účinků, jejich interakcí s buňkami či případného působení v buňce. Tématem této diplomové práce je syntéza fluorescenčně značených částic stříbra s cílem sledovat jejich interakce s vybranými buňkami pomocí fluorescenční mikroskopie. V rámci experimentální práce jsem se zaměřil na studium imobilizace Rhodaminu B isothiokyanátu na povrch nanočástic stříbra připravených redukcí borohydridem a stabilizovaných polyakrylovou kyselinou. Následně došlo k pozorování interakce úspěšně modifikovaných nanočástic stříbra s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*, bakteriemi *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* a myšimi fibroblasty.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Nanomateriály, nanočástice

Pojem nanomateriál označuje objekt, jehož minimálně jeden rozměr se pohybuje v rámci 1 až 100 nm. Předpona nano potom udává rozměr 10^{-9} m a nanomateriál díky těmto rozměrům se může lišit vlastnostmi od materiálu z něhož je odvozen, jelikož základní fyzikálně-chemická pravidla nejsou plně aplikovatelná na nanosvět.

Vzhledem k velkému výskytu nanomateriálů je můžeme třídit podle dimenze na 0D-, 1D-, 2D- a 3D- struktury. Jako příklad struktur lze uvést kvantové tečky, nanodráty či nanovlákná, dále pak různé nanofilmy či nanočástice. [1, 2, 3]



Obrázek č. 1: Příklad různých forem nanomateriálů podle jejich dimenze. [4]

Fyzikální a chemické vlastnosti nanomateriálů, případně nanočástic, závisí nejenom na složení, ale také na velikosti a tvaru částic. V současné době je příprava nanomateriálů vhodné velikosti a morfologie je dobře známá a existuje mnoho způsobů přípravy.

Nanočástice lze pak rozdělit do několika různých kategorií podle morfologie, velikosti částic nebo chemických vlastností. Na základě fyzikálně-chemických vlastností je možné rozdělit nanočástice do několika kategorií. Možné je uvést například uhlíkové, kovové, keramické, polovodičové, polymerické případně lipidové nanočástice, které se využívají pro cílený transport léčiv. [1, 2]

Koloidy jsou disperzní soustavy, které se skládají z disperzního prostředí, v němž je rozptýlena disperzní fáze ve formě částic, jejichž rozměr není větší než 10^{-6} m a zároveň není menší než 10^{-9} m.

Jedná se o mikroheterogenní soustavy, jež mohou být z pohledu termodynamiky stálé i nestálé. Mohou se filtrovat přes ultrafiltry a probíhá u nich slabá difúze i osmóza. Jejich význam spočívá v unikátních fyzikálně chemických vlastnostech, jako je například závislost absorpce světla na velikost částic, a je mimo jiné způsoben velkou plochou fázového rozhraní mezi disperzní fází a disperzním prostředím v porovnání s vlastním objemem.

Jestliže soustava obsahuje částice stejné velikosti nazýváme ji monodisperzní a pokud je tvořena částicemi různými velikosti, tak je nazývána polydisperzní soustavou. Stupeň disperzity pak vyjadřuje velikost částic disperzní soustavy a vyjadřuje se jako převrácená hodnota lineárního rozměru částice. Případně je možné rozdělení podle tvaru částic, je-li soustava homodisperzní pak obsahuje částice stejného tvaru a pokud ne, pak je označována jako heterodisperzní soustava.

Koloidní soustavy lze rozdělit do několika skupin dle různých kritérií. Pokud je dělení založeno na skupenském stavu disperzní fáze i disperzního prostředí je možné rozlišit osm skupin – více v Tabulce č. 1. Obecné označení koloidů jsou soly, jestliže jsou s plynným disperzním prostředím pak jsou označovány za aerosoly a pokud jsou s kapalným disperzním prostředím, pak nesou označení lyosoly. [3]

Tabulka č. 1: Klasifikace koloidních soustav podle fázového složení. [3]

disperzní prostředí	disperzní fáze	označení
pevné	pevné	tuhé soly
	kapalné	tuhé emulze
	plynné	tuhé pěny
kapalné	pevné	lyosoly
	kapalné	emulze
	plynné	pěny
plynné	pevné	aerosoly
	kapalné	aerosoly
	plynné	netvoří koloid

Další možná klasifikace je na základě vlastností fázového rozhraní – lyofobní, lyofilní a asociativní koloidní soustavy. Lyofobní soustavy jsou soustavy s ostře vymezeným fázovým rozhraním. Vyznačují se termodynamickou nestabilitou a neobejdou se bez stabilizace. Většinou jsou tvořeny

anorganickými látkami. Pokud je disperzní prostředí tvořeno vodou, pak jsou nazývány hydrofobní a je-li tvořeno organickou kapalinou, tak organosoly.

Soustavy lyofilní se definují jako soustavy s široce rozprostřeným fázovým rozhraním. Charakterizují se jako termodynamicky stálé a vznikají z vysokomolekulárních látek. Často bývají nazývány jako koloidní roztoky. Je-li disperzní prostředí tvořeno vodou pak nese označení jako hydrofilní koloidní soustava. Asociativní koloidy jsou pak poslední skupina. Vznikají spojováním molekul povrchově aktivních látek a vyznačují se jasně neurčeným fázovým rozhraním, jelikož v nich probíhá neustálá výměna molekul povrchově aktivních látek mezi koloidní částicí a disperzním prostředím. Gely jsou zvláštní případ koloidních soustav díky schopnosti přecházet z kapalné do pevné formy. [3]

1.1. Příprava nanomateriálů

Základní přípravu nanomateriálů lze rozdělit obecně do dvou možných kategorií – a to na metody dispergační, anglicky označované TOP-DOWN methods a na metody kondenzační, anglicky označované jako BOTTOM-UP methods.

Dispergační metody spočívají v destruktivním přístupu, jenž se využívají v pevné fázi, a postupuje se směrem k menším a menším rozměrům, až vznikne částice spadající do kategorie nanočástice. Řadí se sem například mechanické procesy jako mletí nebo využití ultrazvuku, elektrického výboje nebo také laserová ablace. Mletí lze rozdělit na suché a mokré. Při suchém mletí je pevná látka mleta v důsledku šoku, stlačení nebo tření, a je využit tryskový, válcový nebo bubnový mlýn. Problém této přípravy je pak velikost částic a kondenzace malých částic, jelikož dochází ke zvyšování povrchové energie částic při mletí. Pro mletí pevné látky za mokra se využívá například vibrační kulový mlýn nebo mokrá tryskový mlýn. V porovnání se suchým způsobem je „mokrá proces“ vhodný pro zabránění shlukování/kondenzace takto vytvořených nanočástic, a tak je možné získat vysoce rozptýlené nanočástice. [2, 5, 6]

Kondenzační metody jsou charakterizovány tvorbou nové fáze zformované do koloidní částice. K zformování nové fáze je vyžadováno značné přesycení roztoku, jelikož nově vzniklé zárodky vykazují nižší stabilitu než větší částice stejné látky. K přesycení lze využít změnu fyzikálně chemických podmínek, jako je například teplota, tlak, nebo snížení rozpustnosti analyticky disperzního podílu nebo také přeměna rozpuštěné látky na nerozpustnou látku v daném disperzním prostředí. [6, 7]

Kondenzační metody lze rozdělit na dvě větší skupiny podle fáze, z nichž vychází příprava. Jedná se o tzv. metody plynné a kapalně fáze. Metody plynné fáze pracují zejména s chemickou depozicí z plynné fáze (CVD) a fyzikální depozicí z plynné fáze (PVD). Metoda CVD spočívá v chemické reakci při vysokých teplotách, kde je potřeba určitého zdroje tepla. Na rozdíl od metody PVD, která způsobuje odpaření pevného nebo tekutého materiálu, se pak výsledná pára rychle ochladí a získají se požadované nanočástice. Pro dosažení odpařování materiálu lze použít metodu obloukového výboje. I přes to, že tento způsob přípravy zabraňuje přítomnosti organických nečistot, převládá nevýhoda vysokých pořizovacích nákladů i nízká produktivita.

Metody kapalně fáze byly již mnoho let hlavními metodami přípravy nanočástic; mohou být rozděleny na kapalně metody a sedimentační metody. Chemická redukce kovových iontů je typickým příkladem kapalně metody, jejíž hlavní výhodou je snadná výroba částic různých tvarů, jako jsou trubičky, drátky, koule, trojúhelníky nebo také duté nanočástice. Metodou chemické redukce je možné ovlivnit tvar i velikost nanočástic změnou redukčního činidla, dispergačního činidla, reakčním časem nebo i teplotou. Metoda chemické redukce provádí chemickou redukci kovových iontů do jejich nultého oxidačního stavu; proces využívá nekomplikované zařízení nebo nástroje a může v krátké době přinést velké množství nanočástic za nízkou cenu. Zvláštní zájem v tomto ohledu je použití mikrovlnného záření jako zdroje tepla, které mohou v krátké době produkovat vysoce kvalitní nanočástice. [2, 5]

Kromě metody chemické redukce, ve které je přidáváno redukční činidlo (metoda přímého redukování), jsou známy i další metody redukce, jako je fotoredukce za použití gama paprsků, ultrazvukové vlny a kapalně plazmy, které lze použít k přípravě nanočástic. Tyto metody, které nepoužívají chemicky redukující látky, mají atraktivní rys, že se do nanočástic nepřidávají žádné cizí nečistoty. Další metody, jako je například sušení rozprašováním, rozprašovací pyrolýza, solvotermální syntéza, jsou známy také jako superkritické metody. Obecná technika v sedimentační metodě je sol-gel proces, který byla použita značně pro výrobu nanočástic oxidů kovů. Tento postup transformuje roztok alkoxidu kovu do solu hydrolyzou a následovanou polykondenzací na gel.

Mokrý proces (metoda kapalně fáze) zaručuje vysokou dispergaci nanočástic ve srovnání se suchou metodou. Avšak pokud jsou výsledné nanočástice vysušeny, brzy následuje agregace částic. V tomto případě může být redispersace provedena podle postupu použitého v pevně fázi. [2, 5]

1.2. Optické vlastnosti koloidů

Jedny z důležitých vlastností koloidních systémů jsou optické vlastnosti. Mezi nejvýznačnější jevy řadíme absorpci a rozptyl světla. Tyto efekty jsou především závislé na velikosti částic.

Princip absorpce spočívá ve změně energetických stavů valenčních a vazebných elektronů v důsledku pohlcení energetického kvanta elektromagnetického záření. Dochází tedy ke zvýšení vnitřní energie molekul, jenž se přemění v tepelnou energii.

Absorpci lze popsat Lambert-Beerovým zákonem:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d;$$

kde A vyjadřuje absorpci světla látkou, I_0 je intenzita dopadajícího světla na látku, ε je absorpční koeficient, c je koncentrace látky a d je tloušťka vrstvy, kterou prochází paprsek.

Nicméně platnost Lambert-Beerova zákona je komplikována faktem, že absorpce je závislá na velikosti částic disperze.[3]

Rozptyl záření se odlišuje od absorpce v tom, že nedochází k pohlcení energie ale k emitování záření náhodnými směry, aniž by došlo ke změně vlnové délky. Tento jev lze označit za elastický odraz fotonu od částice. Rozptyl lze označit, za složitý jev, jenž v sobě zahrnuje vzhledem k okolnostem interferenci, lom, odraz a ohyb světla. Mechanismus tohoto jevu lze pak popsat, jako indukci elektrického dipólu v částici způsobenou elektromagnetickým polem dopadajícího záření. Emitované záření dipólem má stejnou vlnovou délku jako dopadající záření. Pro kvantitativní popis podíl rozptylu světla na zeslabení intenzity dopadajícího záření ve směru pozorování slouží rovnice podobná Lambert-Beerově rovnici:

$$-\log \frac{I}{I_0} = \tau \cdot d;$$

přičemž τ je označováno jako turbidita soustavy. Turbidita vyjadřuje míru úhrnné energie, která se při průchodu paprsku světla vrstvou suspenze o určité tloušťce rozptýlí na všechny strany od tohoto paprsku. Je velmi závislá na stupni disperzity.

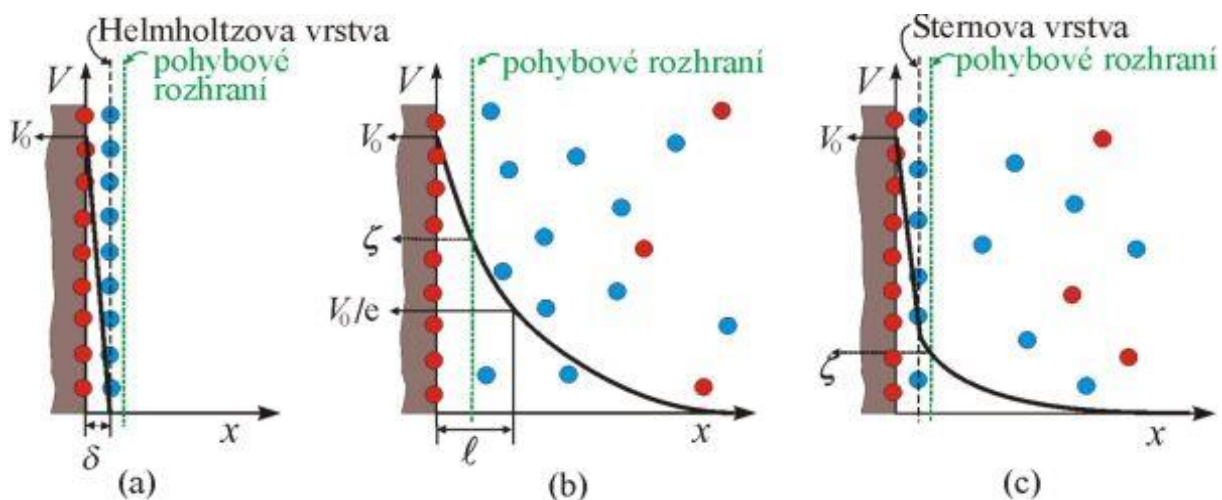
Jedna z charakterizačních technik pro stanovení distribuce velikosti koloidních částic, která využívá dynamický rozptyl světla, nese anglické označení Dynamic Light Scattering – DLS. Principem tohoto jevu je interference rozptýleného záření, jestliže došlo k použití laseru, a s ní spojené kolísání intenzity

rozptýleného záření v čase okolo průměrné hodnoty. Časový průběh kolísání intenzity slouží k výpočtu rychlosti pohybu částice v prostředí a následně z ní lze vypočítat rozměr částice. [3, 6]

1.3. Elektrické vlastnosti koloidů

Elektrický náboj, který se vyskytuje na povrchu koloidní částice je důležitou veličinou/vlastností pro stabilitu koloidu, ale i pro chování nabitých částic v elektrickém poli. Za elektrokinetické jevy jsou označovány ty jevy, kdy se elektricky nabitá částice disperzní fáze pohybuje vůči disperznímu prostředí. Řadí se sem elektroforéza, elektroosmóza, sedimentační potenciál a potenciál proudění. V případě prvních dvou je podstata jevu v pohybu částice vlivem vnějšího pole. U sedimentačního potenciálu a potenciálu proudění je to pak pohyb částic, který vyvolává elektrické pole. Všechny tyto jevy jsou podmíněny existencí elektrického náboje na fázovém rozhraní mezi disperzním prostředím a fází, kde dochází k uspořádání nábojů v blízkosti rozhraní. Takto nabitá vrstva pak nese označení elektrická dvojvrstva.

První popisy struktury elektrické dvojvrstvy byly publikovány H. Helmholtzem, který pracoval s modelem k sobě přiléhajících rovnoběžných desek nabitého kondenzátoru. Nedostatkem této teorie je předpoklad nehybnosti, což je v rozporu vůči tepelnému pohybu molekul disperzního prostředí. Teorie difuzní vrstvy byla vypracována Gouyem a Chapmanem. Popisuje vázání iontů a protiiontů do vnitřní a vnější vrstvy, jelikož ionty nejsou schopné navázat stejné množství protiiontů, tudíž vážou určité množství a zbytek je rozptýlen na základě difúze.



Obrázek č. 2: Modely elektrických dvojvrstvy

(a) Helmholtzův m.; (b) Gouy-Chapmanův m.; (c) Sternův m. [8]

Nicméně i tato teorie selhávala, jelikož autoři nepočítali se skutečnými rozměry iontů a pouze pracovali s aproximací bodových nábojů. Také ji nebylo možné aplikovat na vysoce koncentrované systémy.

Nejpřesnější model, který popisuje elektrickou dvojrstvu, navrhnul Stern. Jeho teorie struktury elektrické dvojrstvy zahrnovala konečné rozměry iontů i specifické interakce iontů. K vnitřní vrstvě iontů jsou přitahovány ionty opačného znaménka v důsledku elektrostatických a adsorpčních sil dle Sterna. Tzv. Sternova vrstva se definuje jako těsně přiléhající vrstva protiiontů k povrchu a částice jsou vázány především adsorpčními silami. Spolu s ionty navázanými na povrch částice tvoří kompaktní vnitřní vrstvu. Vzdálenější ionty jsou přitahovány elektrostatickými silami a patří do vnější tzv. difúzní vrstvy. Pojem pohybové rozhraní nám pak rozděluje elektrickou dvojrstvu na pohyblivou a nepohyblivou část, kdy dochází k pohybu vnitřní vrstvy iontů s pohybem částic a zároveň nedochází k pohybu vnější difúzní vrstvy. A právě v téhle vzdálenosti od povrchu částice existuje potenciál, tzv. elektrokinetický potenciál, známý též jako ζ -potenciál. Tento potenciál je zodpovědný za interakci s vnějším polem. Jeho velikost je určena adsorbovanými ionty i iontovou silou roztoku. Po přidání elektrolytu dochází k zvýšení jeho koncentrace a tím ke zmenšení vnější difúzní vrstvy v důsledku přechodu opačně nabitých iontů z vnější do vnitřní vrstvy. Naopak při ředění systému dochází k růstu ζ -potenciálu, protože se difúzní vrstva zvětšuje. [3, 6]

2. Nanočástice stříbra

Může se zdát, že nanotechnologie je záležitost posledních let, ale není úplně tomu tak. Jedna z prvních známých aplikací nanočástic jsou Lykurgovy poháry, které se datují do 4. století našeho letopočtu. Jedná se o pohár, který je z dichroického skla, tedy mění barvu v závislosti na pozorování vůči světlu. Tohoto efektu bylo docíleno použitím stříbrných a zlatých nanočástic. Dalším velmi známým použitím stříbra je například barvení středověkých vitráží. Nicméně doba seriózního zkoumání nastává až v 19. století díky práci Michaela Faradaye.

Nanočástice stříbra mají široký aplikační potenciál díky svým unikátním vlastnostem. Ať už se jedná o chemicko-fyzikální vlastnosti – optické, elektromagnetické nebo katalytické vlastnosti, nebo biologické vlastnosti, jako je antibakteriální, antivirální nebo antifungální efekt. [3, 9, 10]

2.1. Vlastnosti nanočástic stříbra

Nanostříbro se vyznačuje svými jedinečnými vlastnostmi, ať už se jedná o fyzikálně-chemické vlastnosti nebo biologickou aktivitu nanočástic. Výjimečné vlastnosti jsou pak utvářeny na základě velikosti, tvaru a povrchu částic, dále také optickými nebo antibakteriálními vlastnostmi případně dalšími vlastnostmi nebo modifikacemi částic.

Velikost a tvar částic jsou jedním z nejdůležitějších kritérií pro interakci s buňkou. Čím je menší velikost částice, tím je dosaženo vyššího poměru povrchu k objemu, které tyto částice mohou mít. Velikost nanočástic stříbra je velmi důležitý parametr pro interakci s buňkou, například s bakteriemi. Některé studie se zabývaly porovnáním závislosti velikosti částic nanostříbra na antimikrobiální aktivitu. Z provedených studií vyplynulo, že ze zkoumaného velikostního rozpětí, například od 5 do 100 nanometrů, nejvyššího antibakteriálního účinku bylo dosaženo pro velikost 5 nanometrů a také za nejkratší čas. [9, 10] Což se potvrdilo dalším zkoumáním, jak uvádí například Panáček a kol., kdy byly zkoušeny různé varianty příprav nanočástic stříbra. Vždy došlo k závěru, že ze zkoumaných velikostí je největšího antibakteriálního efektu je dosaženo nejmenší částicí. [11]

Sadeghi a kol. zkoumali vliv různých tvarů na antibakteriální působení vůči *Escheirichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Porovnávali působení kulovitých, tyčinkovitých a destičkovitých nanočástic na studované bakterie a z testování vyplynulo, že destičkovité nanočástice stříbra vykazovali nejvyšší účinnosti vůči bakteriím. Dospěl k závěru, že to bylo způsobeno největší plochu povrchu, jelikož

poskytla největší kontaktní plochu pro interakci s buněčnou stěnou bakterií, následně ji poškodila, a nakonec usmrtila samotnou buňku. [12] Jeho závěry potvrzuje práce Van Dong a kol., kdy porovnávali působení nanostříbra, které bylo připraveno více metodami. Srovnávali antibakteriální efekt na *E. coli*, přičemž vycházeli z různě připravených nanočástic, jež se odlišovaly i morfologií. Nejlepších výsledků dosahovali nanočástice trojúhelníkového tvaru, které měly ostré hrany. Z kulovitých pak nejlépe vyšly nanočástice stříbra připravené redukcí tetrahydridoboritanu sodného. [13]

U nanočástic stříbra byly prokázány také antifungální a antivirální účinky vůči studovaným organismům. Porovnáním působení nanočástic stříbra s antifungálními přípravky vůči *Candida* spp. bylo ověřeno, že nanočástice stříbra dosahují srovnatelné a v některých případech lepší hodnoty MIC (minimální inhibiční koncentrace) než konvenční antifungální přípravky. [14] Nanočástice stříbra, jejichž povrch je modifikovaný PVP, byly použity k inhibici viru HIV-1. Podle autorů spočívá interakce nanočástic s virem v navázání nanočástic na vnější glykoproteinovou část, která je nezbytná pro navázání na hostitelskou buňku, kdy se zaměřuje hlavně na disulfidovou vazbu a celkově vede k inhibici vazby na hostitelskou buňku. Inhibovat mohou také herpetické viry, respektive jeden jeho druh Herpes simplex virus 1 (zkr. HSV-1), kdy interakce spočívá v blokování navázání na hostitelskou buňku. Virus hepatitidy B (zkr. HBV) může být také inhibován nanočásticemi stříbra, které interagují s dvouřetězcovou DNA a dochází k inhibici replikace viru. [15]

Důležité je také zmínit, že různě tvarované nanočástice se od sebe odlišují absorpčními píky v jejich spektru. Pokud například porovnáme UV/VIS absorpční spektrum kulovité a trojúhelníkové nanočástice, bude se odlišovat jinými absorpčními pásy. U kulovitých dochází k absorpci záření okolo 400 nm a u trojúhelníkových nanočástic okolo 780 nm. To je způsobeno povrchovým plasmonem. Pozoruhodné optické vlastnosti stříbrných nanočástic vyplývají z jejich charakteristické interakce se světlem, což způsobuje kolektivní koherentní oscilaci jejich elektronů s volným vodivým pásmem. Tato lokalizovaná oscilace náboje se nazývá lokalizovaná povrchová plazmonová rezonance (LSPR) a tato kolektivní oscilace má za následek rozptyl a absorpci světla na dílčí frekvenci. LSPR stříbrných nanočástic závisí na mnoha faktorech jakou jsou například velikost, tvar, dielektrické prostředí a vzájemné elektromagnetické interakce mezi částicemi v těsné blízkosti. Oscilace volných elektronů má za následek buď radiační rozpad se silným viditelným rozptylem světla, nebo neradiační rozpad, který způsobuje přeměnu fotonové energie na tepelnou energii. Tyto dva rozpadové mechanismy byly snadno využity při biodiagnostických a zobrazovacích metodách (jak při využití radiačního SPR rozpadu), tak při terapeutických aplikacích (využívajících neradiačních SPR rozpadů). [16, 17, 18]

Další z důležitých vlastností je katalytický účinek nanočástic stříbra. Toho je dosaženo právě díky jejich malé velikosti a specifické ploše povrchu. Nejčastěji se využívají ke katalytickým redukčním různým organickým látek a barviv, které se využívají v čištění kontaminovaných vod. Představuje výzvu, jak efektivně využít nanočástice k čištění znečištěných vod, tak aby to nepředstavovalo další znečištění pro životní prostředí. Obvykle bývají nanočástice stříbra připraveny spolu s další látkou, která podporuje stabilitu matrice materiálu – například křemík, grafén oxid, různé polymery a další. Tento postup zabraňuje agregaci samotných nanočástic stříbra, která je způsobena vysokými hodnotami specifické plochy povrchu. [19, 20, 21]

2.1.1. Toxicita nanočástic

Toxicita nanomateriálů závisí na jejich velikosti, tvaru, povrchu a typu organismu/patogenu na kterých je zkoumána jejich toxicita. Nanočástice jsou relativně toxičtější v porovnání se svým objemovým materiálem. Mohou být toxické na buněčné, tak i na subceluární úrovni. Nanočástice syntetizované biologickou metodou jsou obecně více toxické než ty, které byly získány jak fyzikální nebo chemickou metodou. [22]

Mechanismus působení nanočástic není prozatím zcela známý. Existuje několik teorií. Nicméně se většinou pracuje se dvěma základní principy proniknutí nanočástic do buňky, difúze a adsorpce. [23]

Prvním je difúze, která umožňuje pronikání nanočástic do buňky prostřednictvím pórů, přičemž důležitým parametrem je velikost. Velmi malé nanočástice mohou do buňky vstupovat přes její buněčnou membránu difúzí. Také je možný transport do buňky prostřednictvím membránových váčků, tzv. vezikul. Jakmile dojde k transportu vezikuly do buňky, zvýšený osmotický tlak způsobí proniknutí vody do vezikuly, což vede k jejímu prasknutí. Poté dojde k reakci uvolněných nanočástic stříbra s thiolovými skupinami proteinů, čímž dojde k jejich inaktivaci a ukončení důležitých metabolických drah v buňce. Druhým principem je pak adsorpce, kdy se nanočástice mohou naadsorbovat na povrch buňky a poté difundují ionty do buňky. Tento mechanismus je charakteristický také pro malé částice o velikosti jednotek nanometrů, u nichž dochází k produkci významného množství stříbrných iontů.

Toxicita nanočástic je založena na tvorbě volných radikálů, jako je ROS – reaktivní forma kyslíku. Dochází ke snížení hladiny glutathionu (antioxidant) a zvýšení hladiny ROS. Pokud je ROS je produkován, může způsobit poškození membrány. Dochází k interakci s membránovými lipidy a následně jejich disociaci, poškození, a nakonec dojde k pozastavení vývoje a následné replikace.

Nicméně, tento proces může být zpožděn v přítomnosti antioxidantu, jako například enzym nebo neenzymatické složky, která zachycuje volné radikály. [22, 23]

V současnosti se diskutuje a srovnává toxicita nanočástic a iontů. Nicméně není jednoduché určit, co vykazuje větší toxicitu. Některé studie poukazují na toxicitu stříbrných nanočástic, zatímco jiné přisuzovaly toxicitu iontům stříbra uvolněným z nanočástic stříbra. Také je důležité vzít do úvahy, že dochází k uvolňování stříbrného kationtu ze stříbrných nanočástic. Další studie pak došla k závěru, že stejná množství stříbrných nanočástic a stříbrných iontů vykazují identickou hodnotu inhibice růstu *E. coli* a *S. aureus*. Nelze tedy obecně určit, který mechanismus je pro stříbro charakteristický. Předpokládá se, že dochází k synergickému působení nanočástic a iontů. Důležitými parametry pro toxicitu nanočástic jsou velikost a také tvar. S klesající velikostí částice vykazují větší toxicitu a některé tvary, například tvary trojúhelníku vykazují větší toxicitu na studované organismy. Stříbrné ionty mohou proniknout do bakterie přes buněčnou stěnu, následkem toho může dojít k prasknutí buněčné stěny a dojde k denaturaci proteinu a k apoptóze buňky. Protože ionty stříbra jsou kladně nabitě a mnohem menší, než neutrální nanočástice mohou snadno reagovat s biomolekulami bohatými na elektrony v bakteriální buněčné stěně obsahující zejména síru, fosfor nebo dusík. [9, 15, 22-24]

2.2. Syntéza nanočástic stříbra

V dnešní době je příprava nanočástic stříbra velmi prozkoumaná a není problém připravit nanočástice stříbra různé velikosti, odlišné morfologie nebo například s různou modifikací povrchu.

Obecně lze rozdělit syntézu nanočástic stříbra na metody dispergační (TOP-DOWN) a kondenzační (BOTTOM-UP). Dispergační metody pracují s materiálem větší velikosti a pomocí různých metod se dostávají do požadované menší velikosti. Lze k tomu využít mechanické procesy jako mletí, leptání, řezání, míchání nebo využití laserové ablace či ultrazvuku. Kondenzační metody využívají tvorbu nové fáze ve formě nanočástic, kdy dochází ke vzniku na základě chemické reakce nebo změnou fyzikálně-chemických podmínek, například teploty.

Syntézu nanočástic lze rozdělit také na tři možné přístupy – fyzikální, chemická a biologická (též zelená) syntéza. Jednotlivé přístupy mají svoje klady i zápory, které zahrnují náročnost metody, výtěžnost metody, velikost částic, energetickou náročnost případně možnou toxicitu používaných chemikálií a šetrnost k životnímu prostředí. [3, 7, 25, 26]

2.2.1. Fyzikální syntéza

Přípravy fyzikální syntézou spočívají v rozmělnování hmoty do koloidních částic a jsou podmíněny překonáním kohezních sil. K jejich překonání je potřeba dodat práci, konkrétně dochází k přeměně mechanické, elektrické energie nebo z energie záření na povrchovou energii. Částice lze připravit mletím v kulových mlýnech, rozmělněním málo pevných látek pomocí ultrazvuku případně využitím elektrického proudu, kdy dochází k elektrickému rozprašování částic materiálu elektrod v důsledku elektrického oblouku mezi elektrodami. Další možnou variantu pak představuje působení laserového paprsku na povrch materiálu, tzv. laserová ablace, kdy dojde k lokálnímu přehřátí, které způsobí vznik vysokého tlaku odtrhávající částice z povrchu materiálu. Příprava nanočástic stříbra požadované velikosti nepředstavuje problém, záleží pouze na volbě vlnové délky laseru a délce ozařování. S klesající vlnovou délkou laseru lze připravit menší částice. [3, 7, 25]

2.2.2. Chemická syntéza

Chemické metody pro syntézu nanočástic stříbra lze rozdělit na chemickou redukci, elektrochemické techniky, chemické metody podporované ozářením a pyrolytické metody. Hlavní výhody chemických metod jsou snadnost výroby, nízká cena a vysoký výtěžek, na rozdíl od fyzikálních metod, které mají nízké výtěžky a jsou náročnější na energii. Nicméně chemické metody mají taky své omezení, a to je spojeno s používáním redukčních činidel, které jsou škodlivé pro živé organismy. [15, 26]

Syntéza nanočástic stříbra chemickou redukcí obvykle obsahuje tři hlavní složky: prekurzor kovu, redukční činidlo a stabilizační činidla, aby se předešlo možné agregaci. Redukce stříbrných solí je v podstatě dvoustupňový proces. Tento proces zahrnuje v první fázi nukleaci a v druhé fázi dochází k následnému růstu. Často používaná redukční činidla jsou tetrahydridoboritan sodný, citrát sodný, kyselina askorbová a hydrazinové sloučeniny. Obvykle, prostřednictvím optimalizace různých parametrů, jako jsou teplota, pH, prekurzory, redukce a další experimentální podmínky, lze připravit nanočástice stříbra charakteristických vlastností. [24, 26]

Jedna z velmi používaných syntéz je Tollensova metoda, případně modifikace této metody. Podstatou této reakce je redukce amonného komplexu stříbra $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ Tollensovým činidlem, aldehydem. V případě modifikace této metody dochází k redukci stříbrných iontů Ag^+ cukrem, například maltózou nebo glukózou, v přítomnosti amoniaku. Jedná se o jednoduchou, efektivní přípravu, která probíhá

v jednom reakčním kroku. Touto metodou lze připravit částice okolo 25 nm až 400 nm. V závislosti na reakčních podmínkách lze připravit různé nanočástice. Například byla provedena studie, kdy se použily různé cukry jako redukční činidla (glukóza, galaktóza, maltóza a laktóza), odlišné koncentrace amoniaku a také pH. Velikost částic se pohybovala v rozmezí 25 nm až 400 nm vzhledem k reakčním podmínkám. S vzrůstající koncentrací amoniaku, došlo k nárůstu velikosti částic. Dále, částice vzniklé při pH 11,5 byly menší než ty při pH 12,5 a zároveň s klesajícím pH došlo k poklesu polydisperzity. Maltóza poskytla stříbrné nanočástice s nejužší velikostní distribucí a nejmenší průměrnou velikostí 25 nm. [11, 27]

Další možnou metodou přípravy, i když méně významnou, je fotosenzitivní syntéza (fotoredukce) stříbra. Umožňuje přípravu stabilních nanočástic, vzniklých ozářením reakční směsi světelným zdrojem (laserem nebo lampou) v přítomnosti fotoredukujících činidel bez nutnosti zavádění stabilizátorů nebo povrchově aktivních látek. Velikost a potřebná doba pro jejich přípravu jsou přímo úměrné výkonu ozáření světelného zdroje. Tuto metodu lze využít k depozici na určitý druh materiálu (zeolit nebo křemík). Suspenze zeolitu a stříbrných iontů je ozářena lampou Xe-Hg (200 W) v přítomnosti fotoaktivního redukčního činidla (2-hydroxy-2-methylpropiofenonu). Nanočástice stříbra jsou připraveny po velmi krátké době ozáření (5 - 60 s) a rychlejší redukce je dosažena po optimalizaci podmínek procesu při intenzitách vyššího záření. Stříbrné nanočástice se nachází převážně uvnitř mikropórů a mají téměř sférický tvar s průměrem 0,74-1,124 nm. [27, 28]

2.2.3. Biologická syntéza

Nedávno bylo prokázáno, že biologicky zprostředkovaná syntéza nanočástic je jednoduchá, nákladově efektivní, spolehlivá a šetrná k životnímu prostředí. Hodně pozornosti bylo věnováno také produkci vysokých výtěžků stříbrných nanočástic s určitou velikostí a také s použitím různých biologických systémů, včetně bakterií, hub, rostlinných výtažků a malých biomolekul, jako jsou vitamíny a aminokyseliny, jako alternativa k chemické a fyzikální syntéze. Biologickou syntézu je možné využít nejen pro stříbro, ale také pro zlato nebo grafen. [26]

Biologická syntéza nanočástic závisí na třech faktorech: a) rozpouštědlo; (b) redukční činidlo; a (c) netoxický stabilizační činidlo. Hlavní výhodou biologických metod je dostupnost aminokyselin, proteinů nebo sekundárních metabolitů přítomných v procesu syntézy, eliminace dodatečného kroku potřebného pro prevenci agregace částic a použití biologických molekul pro syntézu nanočástic. [26]

Lze rozlišit dvě možné varianty biologické syntézy nanočástic. Extracelulární syntéza spočívá zachycení kovových iontů na povrchu buněk a jejich následné redukci v přítomnosti enzymů nebo biomolekul, zatímco intracelulární syntéza probíhá uvnitř mikrobiálního systému buněk. Extracelulární syntéza je považována za vhodnější variantu přípravy, díky své jednoduchosti, nízkým nákladům a jednoduššímu následnému zpracování. [24]

Extracelulární syntéza nanočástic stříbra byla zkoumána na bakterii *Bacillus sp.*, kdy došlo k syntéze v baňce. Nejdříve byly inkubovány bakterie po dobu 48 hodin, pak tato kultura byla centrifugována a supernatant byl odebrán. Sedlina byla resuspenzována ve vodném roztoku dusičnanu stříbrného v Erlenmayerově baňce. Také supernatant byl smíchán s roztokem dusičnanu stříbrného. Následně došlo k inkubaci na rotačním zařízení při pokojové teplotě po dobu 72 hodin na světle. Byla pozorována extracelulární tvorba nanočástic stříbra během 24 hodin. To bylo potvrzeno vizuálním pozorováním a absorpcí při 450 nm v UV-VIS absorpční spektroskopii. Následná charakterizace nanočástic transmisí elektronovou mikroskopií potvrdila velikost nanočástic stříbra v rozsahu 42–92 nm. [29]

Intracelulární příprava nanočástic stříbra byla provedena na bakteriálním kmenu rezistentním na kovy *Bacillus cereus*. Nejdříve došlo k inkubaci, následné centrifugaci a smíchání bakteriální biomasy ve vodě a roztoku dusičnanu stříbrného. Následně byla provedena inkubace po dobu 120 hodin při teplotě 37°C. Snímky z HRTEM odhalily existenci stříbrných nanočástic s dobře definovanými kulovitými tvary a průměrná velikost částic byla 5 nm. V UV-VIS absorpčním spektru byla zaznamenána nižší absorbance a také posuv k vyšším vlnovým délkám (červený posuv), což poukazyvalo na přítomnost nejen nanočástic stříbra. Měření pomocí FTIR poskytlo důkaz, že nanočástice jsou pokryté bílkovinou, která částice stabilizuje a předchází agregaci částí. V porovnání je intracelulární syntéza méně výhodná, jelikož vyžaduje další kroky, například ošetření ultrazvukem nebo reakce s vhodnými deterenty pro uvolnění syntetizovaných nanočástic stříbra. [24, 30]

2.3. Aplikace

Nanočástice stříbra mají velmi široké uplatnění v současnosti. Aplikace nacházejí své místo jak ve vědeckém výzkumu, tak i v praktických aplikacích pro komerční využití. Jsou využívány díky svým jedinečným antibakteriálním a optickým vlastnostem. S nanostříbrem se tedy můžeme setkat v různých odvětvích jako například v medicíně, farmacii, kosmetice, potravinářství, textilním průmyslu nebo také optice a elektronice. [31]

2.3.1. Biomedicínské aplikace

Stříbrné nanočástice patří mezi nejatraktivnější nanomateriály a jsou hojně používány v řadě biomedicínských aplikací, jako je například diagnostika, léčba, cílený transport léčiv nebo impregnace vybavení. Dochází k využití zejména antibakteriálních vlastností nanostříbra.

K léčbě různých ran na pokožce lze využít přípravky s obsahem nanočástic stříbra. Můžu se jednat o léčbu popálenin, chronických vředů nebo různých druhů ekzémů. Například se podařilo se připravit obvaz obsahující nanočástice stříbra a chitosanu. Obě složky vykazují podobné vlastnosti, a to zejména působení proti mikroorganismům. Tento obvaz významně zvýšil hojivost ran a zároveň vykazoval menší přítomnost iontů stříbra v krvi ve srovnání s vzorkem antibiotika stříbrné soli sulfadiazinu. [27, 32]

Kombinací běžně dostupných biopolymerů, jako například chitosan nebo kolagen, a nanočástic stříbra lze získat materiál, který má obrovský potenciál k zdokonalení a větší účinnosti hojení ran. Acticoat[™] a Bactigras[™] (Smith & Nephew), Aquacel[™] (ConvaTec), PolyMem Silver[™] (Aspen), a Tegaderm[™] (3M) jsou reprezentativní biokompozity modifikované iontovým stříbrem a schválené Úřadem pro potraviny a léčiva (FDA) Spojených států amerických pro aplikace pro obvazy. [33]

Další možné aplikace nanočástic stříbra jsou v impregnaci medicínského vybavení a implantátů. Stříbrné nanočástice v medicínských aplikacích jsou bezpečné a netoxické ve srovnání s kovovým stříbrem. Jedna z možných aplikací je například syntetizovaný kompozitní materiál nanostříbra a uhlíku, jehož struktura je podobná diamantu. Tento materiál vykazuje dobrou hemokompatibilitu a může být využit pro srdeční chlopně nebo stentu. Navíc kompozit vykazoval antibakteriální vlastnosti a antitrombogenní účinek, což představuje velký potenciál v kardiovaskulárních implantátech. [31, 34] Možná aplikace je také impregnování povrchu, kde jsou využívány antibakteriální vlastnosti nanočástic stříbra. Mohou se potahovat katetry, například centrální žilní katetr. Obvykle jsou tyto katetry náchylné k bakteriální infekci, které se může rychle rozšířit a vést k vážným zdravotním komplikacím. Výše zmiňované vlastnosti a zároveň neprokázaná toxicita vůči člověku může vést k využití pro snížení rizika bakteriální infekce a možným komplikacím. V pilotní klinické studii bylo srovnáno použití klasického katetru a nanostříbrem potaženého katetru a došlo se k závěru, že katetry impregnované nanočásticemi stříbra jsou bezpečné a účinné při snižování rizika infekčních komplikací spojených s umístěním katétrů. To také potvrdili další studie. [31, 35, 36]

Jedna z nejzajímavějších oblastí pak představuje spojení nanočástic a antibiotik. Jak je již známo, roste odolnost antibakteriálních kmenů vůči tradičním antibiotikům, což způsobuje, že některé známé

léčebné postupy se staly neefektivní a musí být nahrazeny silnější formou antibiotik. To nicméně představuje začarovaný kruh, který by mohl vyústit v celkovou rezistenci vůči bakteriím. Zde pak přichází v úvaze antibakteriální povaha stříbra, zvýšena ve formě nanočástic, které mají schopnost proniknout do buněčné stěny bakterií a poškodit buněčnou membránu, která vede ke smrti buňky. Lze například využít synergického účinku antibiotik a nanočástic. Nanočástice stříbra byly připraveny biologickou syntézou bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Jednalo se o kulaté nanočástice, jejichž velikost byla okolo 20 nm. Došlo k testování spolu s antibiotiky gentamicinem a chloramfenikolem na bakterii *Enterococcus faecali*, která je rezistentní vůči několika antibiotikům. U obou zkoumaných vzorků antibiotik bylo dosaženo lepšího účinku, pokud byly aplikovány spolu s nanočásticemi stříbra. [31, 37]

Je známo, že dlouhodobým nadužíváním antibiotik stoupá odolnost bakterií. Kromě známé rezistence vůči antibiotikům byla zkoumána možnost tvorby rezistence bakterií vůči nanočásticím stříbra. Studie byla prováděna s bakteriemi (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), které byly vystaveny opakovaným nízkým dávkám nanočástic a mohly vyvinout rezistenci vůči nim. To je způsobeno produkcí proteinu flagelinu bakteriálním bičíkem, který způsobuje agregaci nanočástic. Rezistence je vyvíjena bez jakýkoliv genetických změn a nelze mechanismus rezistence překonat dodatečnou stabilizací nanočástic stříbra použitím povrchově aktivních látek nebo polymerů. Nicméně se jim podařilo silně potlačit produkci flagelinu pomocí extraktu z granátového jablka, který působil jako inhibitor. Tato studie objasnila mechanismus, kterým se může řídit bakteriální rezistence vůči antibakteriálním látkám a bude užitečná při prevenci rezistence vůči bakteriálním lékům i v boji proti infekčním bakteriím. [38]

Další možné aplikace jsou v diagnostice a léčbě rakoviny, dentálních aplikacích nebo by mohly být použity k léčbě zlomené kosti, kdy posilují hojení zlomené kosti. Kombinací nanostříbra a oxidu vanadičného lze vylepšit výkon baterií v nové generaci medicínských přístrojích využívaných v implantacích. [31, 39]

2.3.2. Nanosenzory

V současnosti panuje velký zájem o využití nanočástic ke zlepšení nebo nahrazení současných aplikací. Nanočástice stříbra mohou sehrát důležitou roli při konstrukci analytických a bioanalytických senzorů. Nanotechnologie se staly důležitými ve vývoji nových a účinných diagnostických metod i léčbě v medicíně. Použití nanostříbra v buněčném zobrazování *in vivo* může být velmi užitečné pro studium zánětu, nádorů nebo imunitní reakce a účinků terapie kmenovými buňkami, kdy jsou

kontrastní látky konjugovány nebo enkapsulovány s nanočásticemi přes povrchovou modifikaci. Tato role vyplývá z jejich unikátních optických, chemických a elektrických vlastností. Vykazují vysoké hodnoty specifické plochy povrchu, malé velikosti, schopnost tvořit disperze nebo zesílit Ramanův rozptyl nebo také vysokou antibakteriální aktivitu. [26, 40]

Jedna možná aplikace je nanosenzor, který byl navržen pro enzymatické stanovení glukózy na základě zesílení fluorescence nanočástic stříbra. Toto zesílení je výsledkem oxidace glukózy katalyzovanou enzymem glukózooxidázou. Nanočástice stříbra byly připraveny chemickou redukcí pomocí citrátu trisodného. Experimentální výsledky ukázaly, že vzrůst fluorescence nanočástic byl lineárně úměrný koncentraci glukózy. Díky relativně nízkému detekčnímu limitu, širokému rozsahu detekce a procesu rychlého zjišťování je tento detekční systém slibný pro přímé stanovení glukózy v biologických vzorcích. [40]

Další využití může být jako kolorimetrický senzor pro stanovení rtuťnatých iontů (Hg^{2+}) a peroxidu vodíku. Funguje na základě katalytické redukce Hg^{2+} na elementární rtuť způsobené nanočásticemi a v přítomnosti peroxidu vodíku. Tato redukce způsobuje agregaci a kolorimetrickou odezvu nanočástic stříbra. Toto stanovení je velmi citlivé pro rtuťnaté ionty a peroxid vodíku, což umožňuje stanovení malých koncentrací. Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu využívající katalytické reaktivity nanostříbra, která může být aplikována pro monitorování, například v životním prostředí nebo také v klinických analýzách. [41]

Možné je také připravit citlivý a selektivní fluorimetrický senzor pro stanovení kyseliny askorbové s použitím nanočástic stříbra jako emisního činidla. V této studii byly nanočástice stříbra připraveny reakcí roztoku dusičnanu stříbrného a plynného amoniaku. Velikost nanočástic byla přibližně 10 nm, vykazovaly úzký emisní pás. Posloužily jako fluorescenční sonda pro stanovení kyseliny askorbové, která způsobila zhášení fluorescence nanočástic stříbra. Hlavním důvodem, proč docházelo ke zhášení fluorescence je pravděpodobně komplex mezi kyselinou askorbovou a nanočásticemi stříbra. Za optimálních podmínek byla intenzita zhášené fluorescence lineární s koncentrací kyseliny askorbové. Navrhovaná metoda byla aplikována pro stanovení kyseliny askorbové v zelenině a tabletách vitamínu C. [42]

2.3.3. Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Stříbrné nanočástice mají své uplatnění jako substráty v povrchově zesílené Ramanově spektroskopii, zkr. SERS. Způsobují výrazné zesílení Ramanova rozptylu (typicky $10^4 - 10^6$) pro

molekuly naadsorbované na substrátu. Největší přínos této metody je, že díky extrémnímu povrchovému zesílení lze pracovat s nízkými koncentracemi, které otevírají řadu analytických aplikací dříve pro Ramanovu spektroskopii nedostupných. V nedávné době se podařilo detekovat pouhou jednu molekulu využitím SERS. Důležitou roli hraje také velikost a tvar částice. Využití SERS nachází v biologii, tak i v materiálových vědách. [43] Dosažení vysokého zesílení v Ramanově signálu stříbrnými nanočásticemi bývá podmíněno aktivací například halogenidy, zejména chloridy, které po přidání způsobují agregaci. [44]

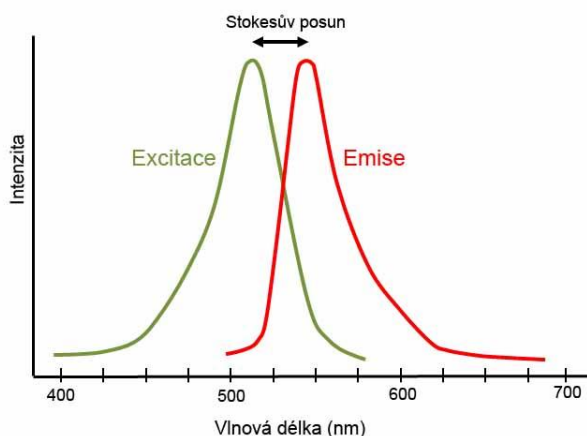
Přípravy nanočástic stříbra využívaných jako substrát pro SERS je mnoho. Velmi účinná, jednoduchá a zároveň šetrná k životnímu prostředí je syntéza založená na redukcí dusičnanu stříbrného s polyethylenglykolem 200 (PEG200). Není potřeba žádného dalšího redukčního nebo stabilizačního činidla. Při laboratorní teplotě se podařilo připravit částice menší než 5 nm. Zvýšení signálu bylo testováno na tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chloridu (Ru(bpy)) a Rhodaminu 6G (R6G) v pevné i kapalně formě. Ukázalo se, že nanočástice stříbra poskytují vysokou SERS aktivitu a došlo ke zvýšení signálů, což dokazuje výhodnost této přípravy substrátů SERS na bázi nanočástic stříbra. [45]

2.3.4. Dekontaminační technologie

Dekontaminační technologie zaznamenaly v poslední době značný zájem, který vedl k vylepšení stávajících metod, případně vedl k novým postupům. Tyto technologie jsou založeny na chemickém rozkladu organických polutantů nebo využívají imobilizaci pomocí aplikace vhodných látek. Největší uplatnění zde našly nanočástice železa, respektive nulamocného železa. Nicméně své zastoupení tu mohou mít i nanočástice stříbra, které se nanáší na povrch a zvyšují reaktivitu železa. [46]

Příkladem může být částice, jejíž jádro je tvořeno nanočásticemi železa (Fe_3O_4) a na povrchu byly navázány nanočástice stříbra s biokompatibilně imobilizovaným myoglobinem. Navrženy byly pro detekci a zachycení zvolených látek (NO_2^- , CN^- a H_2O_2). Imobilizační strategie využívající vazbu myoglobinu a chitosanu, na povrchu částice, přes glutaraldehyd byla funkční a vykazovala vysokou vazebnou afinitu pro malé molekuly, což bylo potvrzeno povrchově zesílenou rezonanční Ramanovou spektroskopií (SERRS). Na základě měření pomocí SERRS bylo možné sledovat a kvantifikovat vazbu zvolených látek s vysokou citlivostí. Bylo dosaženo účinné dekontaminace roztoků, jak bylo prokázáno SERRS. Vzhledem k magnetickým vlastnostem mohou být dispergované nanočástice s navázanými polutanty snadno shromážděny externím magnetem, což představuje vhodný způsob dekontaminace s potenciálními aplikacemi v životním prostředí nebo v potravinářství. [47]

U fluorescence nastává emise záření, které je posunuto k vyšším vlnovým délkám než absorpční záření. Tento jev je důsledkem Stokesova zákona, který definuje vlnovou délku emise při fotoluminiscenci větší nebo rovnou vlnové délce excitačního světla.



Obrázek č. 4: Zrcadlová symetrie excitačního (absorpčního) a emisního spektra látky. [52]

Pro velké množství organických molekul platí zrcadlová symetrie absorpčního a emisního pásu, jak je tomu u obrázku č. 4. Tato symetrie je způsobena stejnou rovnovážnou vibrační strukturou základního i excitovaného stavu. Stokesův posun je rozdíl energií maxim absorpčního a emisního pásu. Tento rozdíl je způsoben vibrační relaxací do rovnovážné vibrační hladiny excitovaného stavu. [48, 50]

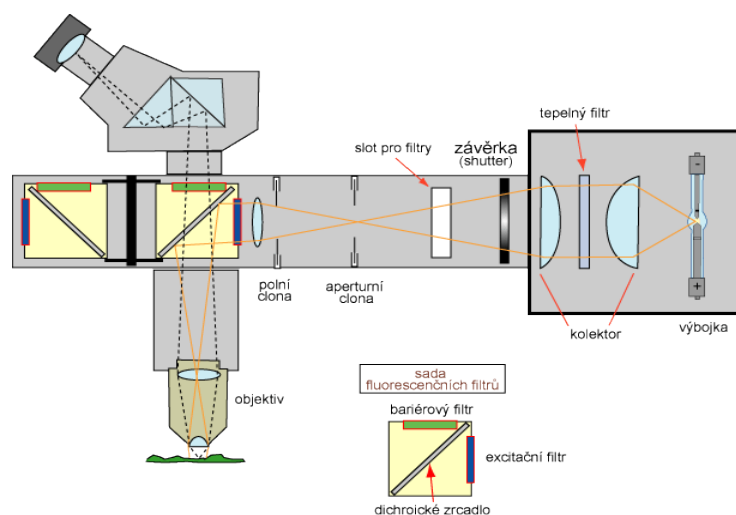
Kvantový výtěžek lze definovat jako poměr počtu světelných kvant emitovaných a absorbovaných fluoroforem za sekundu. Nepřímo ho pak lze definovat jako poměr pozorované střední doby dohasínání fluorescence a vnitřní doby života excitovaného stavu bez zhášecích mechanismů. [48]

Zhášení fluorescence je bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence beze změny fluorescenčního emisního spektra. Srážkové, též dynamické zhášení probíhá, když dojde k deaktivaci fluoforu, tj. navrací se nezářivě do základního stavu, při srážce s molekulou zhášedla. Široká škála molekul může působit jako kolizní zhášedlo. Například kyslík, halogeny nebo aminy. Nedochází k chemickým změnám molekul. Statické zhášení se pak právě odlišuje tím, že po kontaktu fluoforu a zhášedla dojde k vytvoření nefluorescenčního komplexu. Může také dojít k samozhášení, což znamená zhášení fluoforu jím samotným. To může nastat při jeho vysokých koncentracích případně při vysoké hustotě značení. [48, 50]

3.1. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence je nesmírně důležitá technika pro studium biomolekul, ale také i pro materiálové vědy. Při fluorescenční mikroskopii biologických vzorků dochází k navázání velkého počtu fluorescenčních molekul na proteiny, nukleové kyseliny a membrány živých buněk a poté dochází k zobrazení distribuce fluorescenční intenzity na ozářené ploše. Některé molekuly, jako je například chlorofyl nebo flavin, vykazují silnou fluorescenci ve srovnání s většinou součástí stavebních proteinů nebo nukleových kyselin. Fluorescenční mikroskopie umožňuje pozorovat fluorescenci dvou- a třírozměrných mikroskopických objektů. [48, 49]

Fluorescenční mikroskopie může pracovat ve dvou režimech – epifluorescence a diafluorescence. Epifluorescence je pozorování v odraženém světle. Diafluorescence je pozorování v procházejícím světle a v současnosti se tato metoda téměř nepoužívá. Fluorescenční mikroskop je optický mikroskop, který využívá schopnosti fluorescence látek. Mikroskop je vybaven rtuťovou nebo xenonovou výbojkou, která slouží jako druhý zdroj světla. Další důležitá součást je fluorescenční filtr, který je konstruován ve tvaru kostky a je tvořen excitačním filtrem, bariérovým filtrem a dichroickým zrcadlem. Excitační filtr propouští pouze to světlo, které je potřebné pro fluorescenci vzorku. Bariérový filtr pohlcuje excitační záření, které nebylo využito k fluorescenci vzorku.



Obrázek č. 5: Schéma epifluorescenčního mikroskopu. [54]

Dichroické zrcadlo umožňuje odrážet světlo určitého rozsahu vlnových délek a také propouštět jiný rozsah vlnových délek. Tedy excitační záření se odráží do objektivu a emisní záření do okuláru. Vzniklý obraz pak lze pozorovat pomocí okuláru a je možné ho zaznamenávat pomocí speciálních CCD kamer. CCD kamery je možné nahradit využitím digitálního fotoaparátu. [53, 54]

3.2. Fluorescenční barviva

Většina organických molekul nevykazuje fluorescenci. Některé však ano, jedná se například o polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly. Sloučeniny, které vykazují intenzivní fluorescenci se nazývají fluorescenční barviva, též fluorofory. Mezi typické fluorofory se řadí chinin, fluorescein, rhodamin B nebo antracen.

Fluorofory se rozdělují do dvou skupin. První skupina je nazývána vnitřní (vlastní) fluorofory a jejich výskyt je přirozený. Vnější (nevlastní) fluorofory jsou pak druhá skupina a jsou přidávány k těm vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti. [48]

Vlastní fluorescenci buněk vykazují zejména proteiny (fluorescence v UV oblasti), dále redukované formy nikotinamidadeninukleotidu (NADH), nikotinamidadeninukleotid fosfátu (NADPH), oxidované formy flavoproteinů a vitamínu A, které vykazují fluorescenci ve viditelné oblasti (modrá až žlutá). Nebo také cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin, chlorofyl vykazující fluorescenci ve viditelné oblasti (červená). Hlavními fluorofory v proteinech jsou aromatické aminokyseliny fenylalanin, tryptofan a tyrozin. Jejich absorpční pás se nachází v oblasti 240 až 300 nm. Nicméně dominantní roli má tryptofan, respektive indolová skupina, který se může požit pro pozorování konformačních změn proteinů díky jeho velké citlivosti na vlastnosti okolí. Své zastoupení zde mají i nanočástice. Vlastní fluorescenci vykazují kvantové tečky, nanočástice platiny nebo selenu, které se mohou využít pro pozorování biologických vzorků. [48, 55]

Nevlastní fluorofory se využívají mnohem více. Jsou aplikovány ke studovanému vzorku a pokud se na něj kovalentně vážou, jsou označovány jako fluorescenční značky, pokud se váží nekovalentně, pak jsou označovány jako fluorescenční sondy. [48]

Fluorescenční značky se používají zejména k fluorescenčnímu značení proteinů. Kovalentně se vážou na jejich aminové, sulfhydrolové nebo také na histidinové boční řetězce. K nejznámějším fluorescenčním značkám patří fluoresceinizoithiokynát (FITC) a tetrametylrhodaminizoithiokyanát (TRITC), které se využívají v imunofluorescenčních metodách. Další zajímavou skupinu fluorescenčních značek představují BODIPY, kdy fluorofory obsahuje bór. Jejich výhody jsou vysoké kvantové výtěžky fluorescence, možnost použít různé deriváty s emisí v širokém rozsahu 510 až 675 nm nebo nezávislost na polaritě okolí a na pH. Nevýhodou představuje malý Stokesův posuv. Využívají se pro značení proteinů, nukleotidů nebo fosfolipidů.

Fluorescenční sondy se nekovalentně vážou ke sledované struktuře a mohou přitom měnit své fluorescenční vlastnosti. Iontové fluorofory se využívají například pro studium změn konformace bílkovin, membránového potenciálu nebo tloušťky membrán, přičemž dochází ke změně kvantového výtěžku nebo spektrálních vlastností po navázání na sledovanou strukturu. Typickými fluorescenčními sondami pro polaritu prostředí jsou 1-anilinonaftalén-8-sulfonát (ANS) a 2-ptoluidinonaftalén-6-sulfonát (TNS), kdy v závislosti na polaritě rozpouštědla jsou ovlivňovány fluorescenční vlastnosti (kvantový výtěžek, doba dohasínání nebo emisní maxima). Fluorescenčních sond je opravdu mnoho a lze je využít k specifickým aplikacím. Kromě výše zmíněných se fluorescenční sondy využívají ke značení membrán, membránového potenciálu nebo pro značení nukleových kyselin. [48]

3.2.1. Rhodamin B isothiokyanát

Rhodaminy se řadí do skupiny xanthenových barviv a jsou hojně využívány jako fluorescenční barviva. Rhodamin B isothiokyanát (RBITC) je využíván jako fluorescenční značka v mnoha aplikacích díky svým vlastnostem jako vysoký absorpční koeficient, vysoký kvantový výtěžek nebo fluorescenci ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra. Využití nachází jak v biologických, tak i v materiálových aplikacích. [56, 57]

Isothiokyanáty reagují s nukleofily, jako jsou aminy, thioly nebo hydroxylové skupiny, kvůli přítomnosti elektrofilního uhlovodíku isothiokyanátové sloučeniny. Reakcí s nimi vytváří sloučeniny thiomocoviny, thiokarbamátů nebo karbamátů. [58] Kromě tvorby sloučenin se může také Rhodamin B vázat pomocí vodíkové vazby nebo elektrostaticky v závislosti na reakčních podmínkách. [56]

3.3. Vazba fluoroforů na nanočástice

Vzhledem k rozsáhlému využití metod detekce založených na fluorescenci se věnuje více pozornosti také fluorescenčně značeným nanočásticím.

Byl vyvinut fluorescenční imunosenzor pro detekci viru chřipky H1N1, který obsahoval nanočástice stříbra značené protilátkami chřipky. Okyselením roztoku pak došlo ke vzniku stříbrných iontů, které mohou katalyzovat oxidaci o-fenylendiaminu (OPD) za vzniku fluorescence pro vysoce citlivou detekci. Za optimálně nastavených podmínek je patrný lineární vztah mezi intenzitou fluorescence a

logaritmem koncentrace H1N1. Výsledky ukázaly, že navrhovaná metoda detekce poskytuje dobrou citlivost a jednoduchou operaci pro detekci viru chřipky. Toto uspořádání může být univerzálně aplikováno pro selektivní detekci různých struktur, od DNA až po proteiny a malé molekuly. Tento typ fluorescenčního imunosenzoru by mohl najít uplatnění v oblasti molekulární diagnostiky a dalších vědních oborů. [59]

Další možné provedení je fluorescenční senzor na bázi stříbrných nanočástic a organického fluoroforu, kyseliny 2-[[4-(2H-Nafto [1,2-d] [1,2,3] triazol-2-yl) fenyly] karboxylové (NTPC). Tento senzor slouží k detekci iontů těžkých kovů, včetně iontů paramagnetických kovů. Navázání organického fluoroforu NTPC na povrch nanočástic stříbra proběhlo na základě interakce vodíkových vazeb mezi NTP a nanostříbrem, jehož povrch byl funkcionalizovaný aminokyselinami. Silná a selektivní koordinace fenolických chelatačních ligandů, navázaných na aminokyseliny, s biologicky důležitými ionty kovů, konkrétně Zn^{2+} , Cu^{2+} a Fe^{3+} , oddělovala fluorofor od povrchu nanočástic a umožnila fluorescenci NTPC. Studie koncentrační závislosti ukázaly selektivní detekci iontů kovů Zn^{2+} , Cu^{2+} a Fe^{3+} ve vodném roztoku až do úrovně ppb. Tento přístup demonstruje multifunkční využitelnost kovových nanočástic při vývoji fluorescenčního senzoru pro paramagnetické ionty těžkých kovů ve vodném roztoku. [60]

Dále je možné připravit nanokompozitní materiály, vykazující zvýšenou fluorescenci. Jedná o kompozitní materiál zlata, připravený polymerací kyseliny polyakrylové na nanočásticích zlata modifikovaných vinylem. Zlaté nanočástice byly připraveny redukcí methakrylovou kyselinou, která zároveň v jednom kroku funkcionalizovala povrch nanočástic vinylovými skupinami, následně došlo k vytvoření obalu nanočástice pomocí polymerace polyakrylové kyseliny volnými radikály. Poté došlo k navázání fluorescenčně konjugovaného polymeru PFV pomocí elektrostatických interakcí. Intenzita fluorescence PFV vykazovala závislost na pH. Optimální zvýšení fluorescence bylo pozorováno, když byly nanokompozity v kyselém prostředí. Vzhledem k dobré biokompatibilitě mají fluorescenční nanokompozity potenciální uplatnění v biologii, zejména pro buněčné zobrazování. [61]

Nanočástice oxidu gadolinitého mají potenciální uplatnění v medicíně. Povrch připravených nanočástic byl modifikován polyakrylovou kyselinou, na níž byl přes dusík navázán Rhodamin. Takto modifikované nanočástice našly uplatnění jako kontrastní činidlo v MRI nebo mohou detekovat nádorové buňky. Nanočástice vykazovaly silnější fluorescenci v nádorových buňkách než v normálních díky Rhodaminu, který vzhledem k pH prostředí buňky může poskytovat různou intenzitu fluorescence. [62]

Fluorescenčně značené nanočástice maghemitu byly testovány jako nová kontrastní látka. Nanočástice obsahovaly superparamagnetické jádro, jehož povrch byl funkcionalizován tetramethylamonium perchlorátem v přítomnosti Rhodaminu. Rhodamin byl navázán na povrch částic díky vazbě isothiokyanátu a aminoskupin. Takto připravené částice umožňují citlivou a bezpečnou vizualizaci buněk. Jejich hlavní výhodou je, že nedochází ke kumulaci nanočástic v buňce ve srovnání s nejpoužívanějšími kontrastními látkami v MRI – nanočástice ferumoxidu. [63]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Materiály a přístrojové vybavení

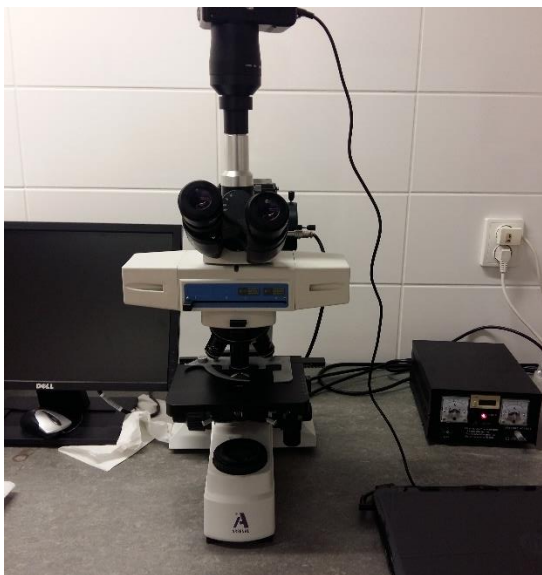
4.1. Chemikálie

Pro přípravu stříbrných nanočástic byly použity následující chemikálie: dusičnan stříbrný (p. a., Fagron), amoniak (vodný roztok hydroxidu amonného 28-30 %, Sigma-Aldrich), sodná sůl polyakrylové kyseliny (Mw - 15 000, 35 w.t. %, Sigma-Aldrich), tetrahydridoboritan sodný (≥ 98 %, Sigma-Aldrich), destilovaná voda. K fluorescenčnímu značení byl použit Rhodamin B isothiokyanát (Sigma-Aldrich, p.a).

4.2. Přístrojové vybavení a pomůcky

Při práci v laboratoři bylo použito běžné laboratorní sklo. Vzorky byly odebírány pomocí automatických pipet značky Eppendorf. K míchání vzorků byly použity magnetické míchačky značky Heidolph typu Hei-Mix S. Měření absorpčních spekter bylo prováděno na spektrofotometru značky Specord S600 výrobce AnalytikJena, který pracuje v rozsahu vlnových délek 190–1050 nm. K separaci vzorků byla použita odstředivka značky Hettich Zentrifugen typu EBA 20. Pro dialýzu byly použity celulózové dialyzační membrány značky Fisherbrand o tloušťce stěny 23 μm (MWCO 15000). Nanočástice stříbra byly charakterizovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEM 2011 (Jeol, Japan) a jejich koncentrace byla stanovena metodou atomové absorpční spektroskopie na přístroji ContrAA 300 (Analytik Jena, Germany) využívající plamenovou ionizaci.

Pro pozorování interakce značených buněk s nanočásticemi stříbra bylo použito fluorescenčního mikroskopu AF5013i T od výrobce Arsenal s.r.o.. Fotky kvasinek byly pořízeny digitálním fotoaparátem Canon G9.



Obrázek č. 6: Fluorescenční mikroskop AF5013i T.

4.3. Příprava fluorescenčně značených nanočástic stříbra

K přípravě nanočástic byl zvolen modifikovaný Tollensův proces, který představuje jednoduchou přípravu. Syntéza nanočástic probíhala za laboratorní teploty v 50ml kádince a při míchání na elektromagnetické míchače podle následujícího postupu.

K 5 ml dusičnanu stříbrného ($c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) byl přidáno 0,6 ml amoniaku ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 12,75 ml vody a 1 ml 0,1% roztoku polyakrylové kyseliny. Na konec bylo přidáno 2,5 ml redukčního činidla–tetrahydridoboritan sodný ($c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Celkový objem reakční směsi činil 25 ml a doba redukce byla 5 minut. Takto připravené nanočástice stříbra byly použity k fluorescenčnímu značení.

K fluorescenčnímu značení nanočástic stříbra bylo použito barvivo Rhodamin B isothiokyanát (RBITC). Navazování barviva RBITC probíhalo dvěma různými způsoby. První varianta přípravy spočívala v navázání barviva na nanočástice po redukci tetrahydridoboritanem sodným. Takto připravené nanočástice jsou v rámci této práce označovány jako Ag-RBITC-I. Druhá varianta přípravy spočívala v přidavku barviva před redukcí tetrahydridoboritanem sodným do reakční směsi. Tyto nanočástice označovat jako Ag-RBITC-II. Koncentrace Rhodaminu v obou způsobech přípravy byly stejné.

Příprava Ag-RBITC-I probíhala podle následujícího postupu. Nejdříve byly připraveny nanočástice stříbra modifikací Tollensovy metody. Do 50ml kádinky bylo odpipetováno 5 ml dusičnanu stříbrného

($c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), následně bylo přidáno 0,6 ml amoniaku ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 11,9 ml vody a 2,5 ml 0,5% sodné soli polyakrylové kyseliny. Vzápětí bylo přidáno 5 ml tetrahydridoboritanu sodného ($c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) jako redukční činidlo. Syntéza probíhala za použití elektromagnetické míchačky při laboratorní teplotě. Objem reakční směsi byl 25 ml. Následně bylo odebráno 9,9 ml koloidu do zkumavky a bylo přidáno 0,1 ml roztoku RBITC ($c = 9,88 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Takto připravená směs se ponechala 1 hodinu inkubovat, aby došlo k navázání barviva.

Příprava druhé varianty, tedy Ag-RBITC-II probíhala následujícím způsobem. Nejdříve byl nachystán 1 ml roztoku barviva, který vznikl smícháním 0,75 ml vody a 0,25 ml roztoku RBITC ($c = 9,88 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Roztok barviva byl přidán do reakční směsi před nástřikem tetrahydridoboritanu. Reakční směs tedy obsahovala 5 ml dusičnanu stříbrného ($c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 0,6 ml amoniaku ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 10,9 ml vody, 2,5 ml 0,5% sodné soli polyakrylové kyseliny, 1 ml barviva a 5 ml tetrahydridoboritanu sodného ($c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Oba připravené vzorky – Ag-RBITC-I a Ag-RBITC-II byly přečištěny pomocí dialýzy, která umožnila zbavit se přebytečného nenavázaného barviva. Dialyzační membrány byly naplněny 10 ml vzorku, následně umístěny do litrové kádinky naplněnou 800 ml destilované vody, která se zalkalizovala hydroxidem sodným na $\text{pH} = 9$ (totožné s pH připravených disperzí nanočástic stříbra). Dialýza byla provedena čtyřikrát v průběhu 24 hodin, přičemž první tři cykly vždy proběhly po hodině a následně došlo k výměně alkalizované vody a poslední cyklus byl ukončen následující den.

Poté vzorky byly přelity do zkumavky a uschovány. Připravené nanočástice značené Rhodaminem B byly charakterizovány pomocí absorpční spektroskopie, transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a rovněž byla stanovena koncentrace stříbra pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS). Distribuce velikosti částic stříbra byla provedena ze snímků z elektronového mikroskopu obrazovou analýzou pomocí programu ImageJ.



Obrázek č. 7: Snímek zachycující dialýzu koloidů nanostříbra.

4.4. Fluorescenční mikroskopie kvasinek vystavených nanočásticím stříbra

Kvasinky byly zvoleny pro fluorescenční mikroskopii díky své dostupnosti a zároveň jednoduchosti buněčné stěny. Vzorek sledovaných potravinářských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byl připraven podle následujícího postupu: 1 g potravinářských kvasnic byl rozmíchán ve 100 ml destilované vody. Do zkumavky bylo odpipetováno takové množství vzorku vzorku Ag-RBITC-I nebo Ag-RBITC-II, které odpovídalo $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ stříbra. Následně byla přidána suspenze kvasinek vždy o objemu 0,1 ml a zbytek tvořil přídavek destilované vody, tak aby výsledný objem vzorku ve zkumavce činil 1 ml. Takto připravené vzorky byly inkubovány po dobu 1, 2 a 3 hodin při laboratorní teplotě. Po uplynutí zvoleného inkubačního času byly kvasinky separovány pomocí centrifugy. Centrifugace probíhala po dobu 2 minut při 2000 otáček za minutu. Supernatant byl vždy odpipetován a usazené kvasinky byly převedeny do suspenze. Kvasinky byly nejdříve promyty fosfátovým pufrům (PBS, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,4$), pak fixovány fixačním činidlem Roti-Histofix ECO Plus. Po fixaci následovalo opět promytí pufrům, a nakonec destilovanou vodou. Poté byly kvasinky resuspendovány v 1 ml destilované vody a nanoseny v objemu $50 \mu\text{l}$ na podložní mikroskopické sklíčko a po zaschnutí sledovány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

4.5. Fluorescenční mikroskopie bakterií vystavených nanočásticím stříbra

K pozorování interakce bakterií se značenými nanočásticemi stříbra byly zvoleny Gram-negativní bakterie *Escherichia coli* a Gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. Suspenze bakterií byly připraveny na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Příprava vzorku proběhla podle následujícího postupu – k testování byly použity namnožené kultury bakterií o koncentraci 10^9 CFU/ml. Do zkumavky bylo odpipetováno množství vzorku Ag-RBITC-I nebo Ag-RBITC-II, které odpovídalo koncentraci $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ stříbra a 0,4 ml suspenze bakterií. Zbytek tvořil přídatek vody tak, aby výsledný objem vzorku ve zkumavce činil 1 ml.

V následujícím kroku experimentu byla pozorována interakce fluorescenčně značených nanočástic stříbra s bakteriemi. Takto připravené vzorky byly inkubovány ve vybraném časovém rozpětí při laboratorní teplotě. Byly zvoleny časy: 30 min, 1 hod., 2 hod. a 3 hodiny. Po uplynutí zvoleného inkubačního času byly vzorky bakterií separovány pomocí centrifugy. Centrifugace probíhala po dobu 3 minut při 3500 otáček za minutu. Supernatant byl vždy odpipetován a usazené bakterie byly převedeny do suspenze přidavkem destilované vody. Vzorek byl nejdříve promyt dvakrát fosfátovým pufrům (PBS, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH = 7,4), pak dvakrát vodou. Následně byly vzorky bakterií naneseny v objemu 50 μl na podložní mikroskopické sklíčko a po zaschnutí sledovány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

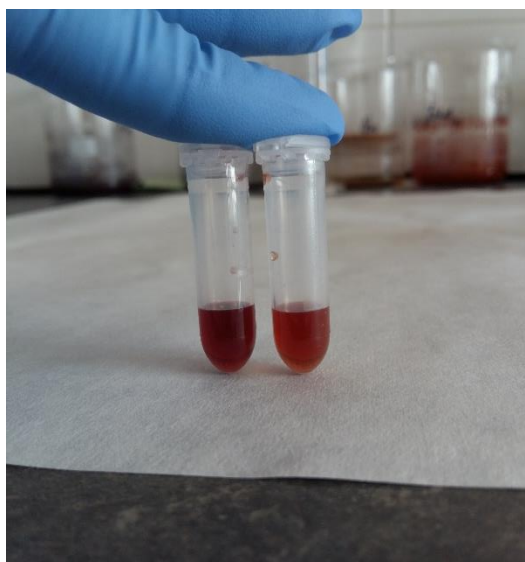
4.6. Fluorescenční mikroskopie fibroblastů vystavených nanočásticím stříbra

Kultivaci myších fibroblastů a jejich následnou fluorescenční mikroskopii po vystavení nanostříbrem provedla Mgr. Šárka Hradilová, Ph.D. na pracovišti Regionální centra pokročilých technologií a materiálů v Olomouci. Pro pozorování byly použity buňky myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC, USA), které byly inkubovány v 96 jamkové titrační destičce po dobu 24 hodin. Interakce nanočástic stříbra o koncentraci $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ s fibroblasty byly pozorovány v následujících časech: 30 minut, 1 hod., 3 hod., 6 hod. a 24 hodin od aplikace značeného nanočástic stříbra pomocí fluorescenční mikroskopie. Před samotným pozorováním byly buňky promyty fosfátovým pufrům (PBS, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH = 7,4).

5. Výsledky a diskuze

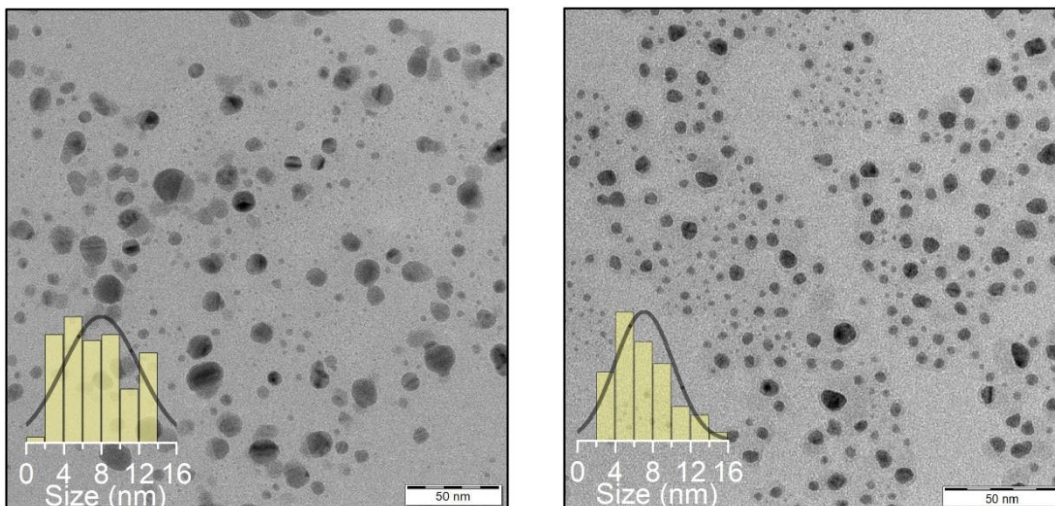
5.1. Fluorescenčně značené nanočástice stříbra

Fluorescenčně značené nanočástice stříbra byly připraveny dvěma odlišnými způsoby, kdy v jednom případě byl Rhodamin přidán před přidavkem redukční látky, a až poté byly vyredukovány nanočástice stříbra. V druhém případě byl Rhodamin přidán do disperze až po vyredukování nanočástic stříbra. V průběhu reakce nebyly pozorovány výrazné rozdíly související se zvoleným postupem přípravy nanočástic. (Obrázek č. 8)



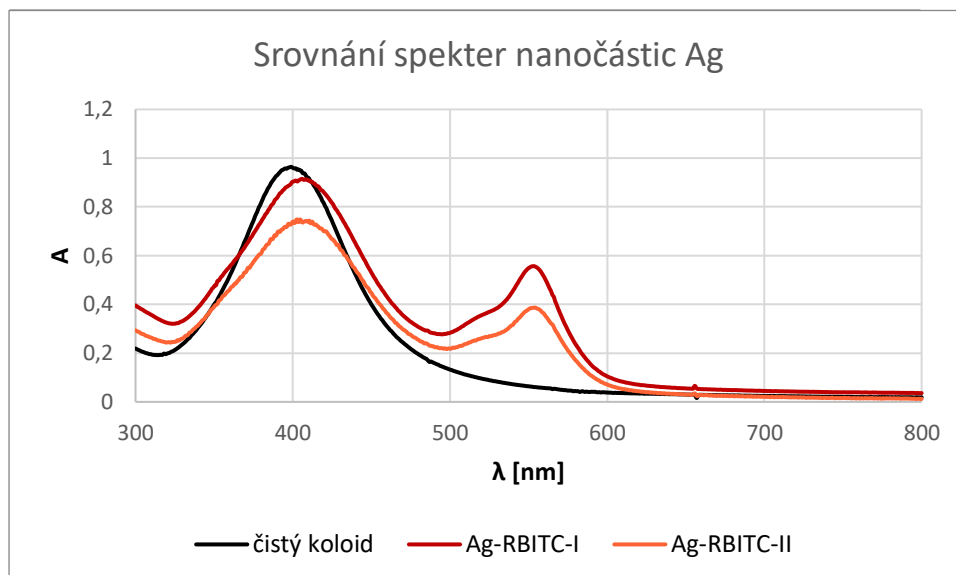
Obrázek č. 8: Připravené vzorky Ag-RBITC-I (vlevo) a Ag-RBITC-II (vpravo).

Velikost nanočástic stříbra byla charakterizována pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Na snímcích je patrné, že pomocí použité metody byly připraveny částice s podobnou průměrnou velikostí cca 8 nm v případě obou vzorků (Obr. 9 a 10). Z obrázků č. 9 a 10 je zřejmé, že se jedná v obou postupech přípravy o polydisperzní koloidy, což potvrdila i provedená distribuční analýza velikosti částic stříbra. Distribuce velikosti částic stříbra ve vzorku Ag-RBITC-I se pohybovala od 1 do 14 nm a u vzorku Ag-RBITC-II od 2 do 16 nm.



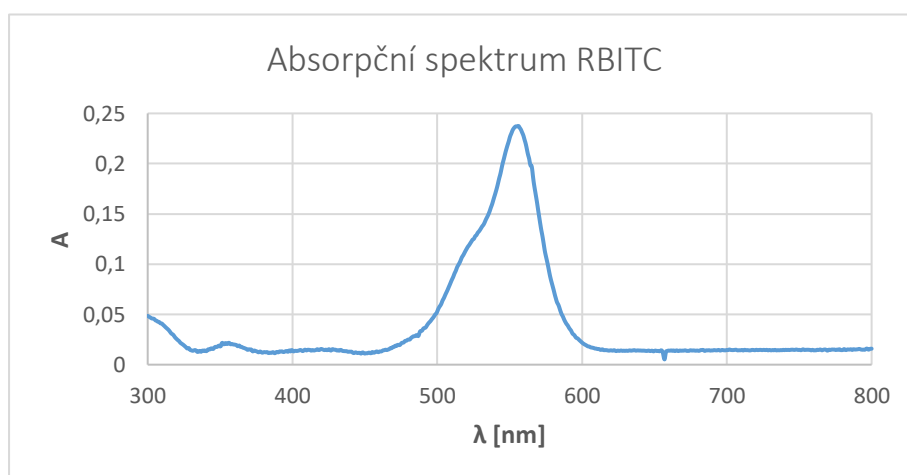
Obrázek č. 9 a 10: TEM snímky vzorku nanočástic Ag-RBITC-I (vlevo) a Ag-RBITC-II (vpravo).

Z absorpčních spekter nanočástic stříbra a obou vzorků značených nanočástic stříbra je zřejmé, že se absorpční maximum nachází v oblasti okolo 400 nm (Obrázek 11). Pro koloid stříbra bez značení Rhodaminem je absorpční maximum patrné při vlnové délce 398 nm, pro Ag-RBITC-I pak 405 nm a pro Ag-RBITC-II 409 nm. Polohy absorpčních maxim koloidu a značených nanočástic se od sebe liší. V případě značených částic stříbra pomocí Rhodaminu B dochází k posunu maxima k vyšším vlnovým délkám, což je pravděpodobně způsobeno navázáním Rhodaminu B na povrch nanočástic. Kromě posunu maxima je na spektrech rovněž patrný pokles absorbance u vzorků modifikovaných Rhodaminem B. V případě vzorku Ag-RBITC-I je pokles způsoben částečným naředěním disperze nanočástic stříbra přídavkem roztoku Rhodaminu B. V případě vzorku Ag-RBITC-II zřejmě nedošlo ke kompletní redukci diaminstříbrného komplexu.



Obrázek č. 11: Absorpční spektra nanočástic Ag, značených nanočástic Ag-RBITC-I a Ag-RBITC-II.

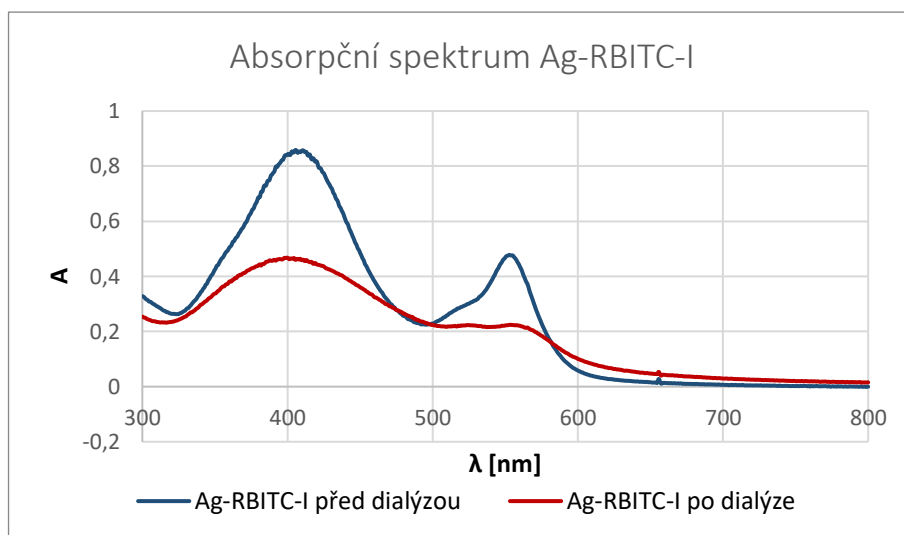
Další absorpční maximum u vzorků Ag-RBITC-II a Ag-RBITC-II leží v oblasti 550 nm. To je způsobeno přítomností fluorescenčního barviva Rhodaminu B isothiokyanátu, jehož absorpční spektrum bylo změřeno samostatně (Obrázek č. 12).



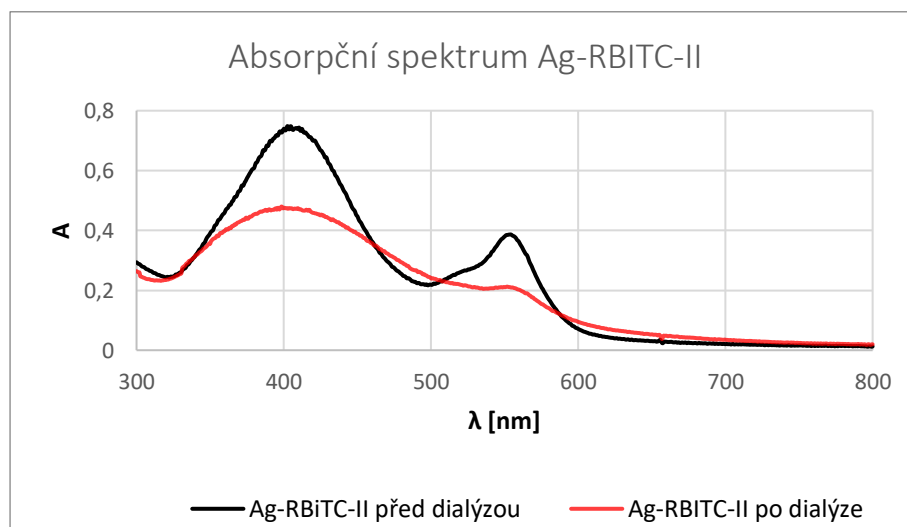
Obrázek č. 12: Absorpční spektrum barviva Rhodaminu B isothiokyanátu ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Po přípravě koloidů a navázání barviva byly vzorky Ag-RBITC-I a Ag-RBITC-II přečištěny pomocí dialýzy, jejímž účelem bylo odstranění nenavázaného barviva. Po dialýze vždy došlo k úbytku jak barviva, tak i nanočástic stříbra. Patrné je to z obrázku č. 13 a 14, kde jsou porovnány absorpční

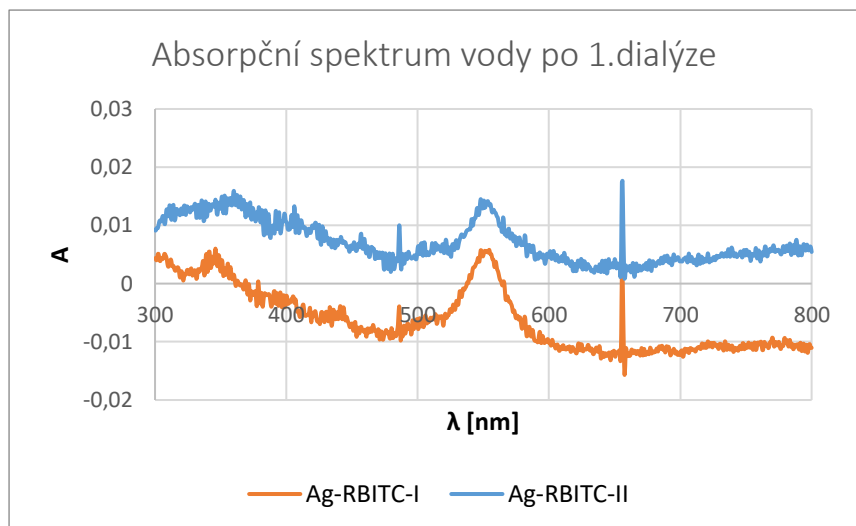
spektra před a po dialýze. V obou případech můžeme pozorovat pokles absorbance jak u absorpčního píku nanočástic stříbra, tak i Rhodaminu. Přečištěné vzorky byly zbaveny nenávaného barviva a barvivo bylo uvolněno do dialyzační vody, což je zřejmé z obrázku č. 15, kde je patrné absorpční maximum v oblasti 550 nm. Nanočástice stříbra nebyly přítomny v dialyzační vodě. Pokles absorpčního maxima nanočástic byl způsoben adsorpcí na vnitřní stěnu dialyzační membrány.



Obrázek č. 13: Absorpční spektrum Ag-RBITC-I před a po dialýze.

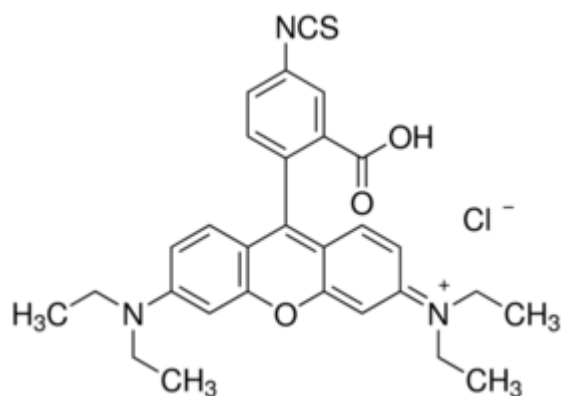


Obrázek č. 14: Absorpční spektrum Ag-RBITC-II před a po dialýze.



Obrázek č. 15: Absorpční spektra dialyzační vody obou vzorků značeného nanošříbra po 1. dialýze.

Konečná koncentrace stříbra po přečištění dialýzou byla stanovena metodou AAS pro Ag-RBITC-I na $83,66 \pm 4,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a pro Ag-RBITC-II na $86,56 \pm 4,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.



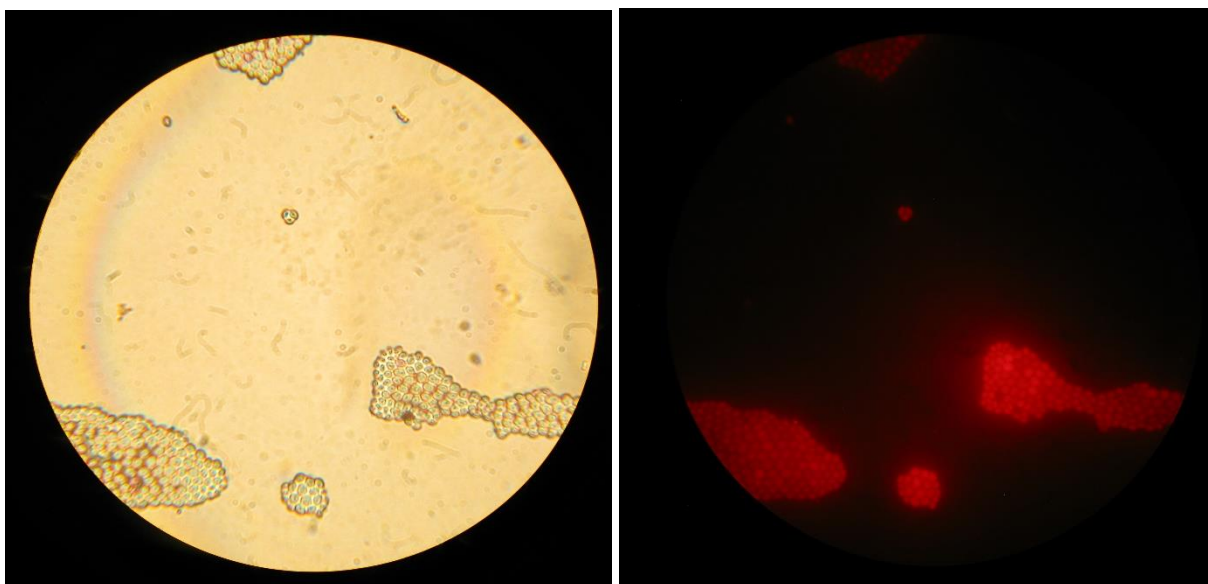
Obrázek č. 16: Rhodamin B isothiokyanát (RBITC, $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$). [64]

Rhodamin B isothiokyanát se s největší pravděpodobností váže na připravené nanočástice stříbra stabilizované polyakrylovou kyselinou pomocí elektrostatických interakcí. Dochází k interakci mezi protonizovaným dusíkem a karboxylovou skupinou, jenž v důsledku ionizace odštěpila vodík.

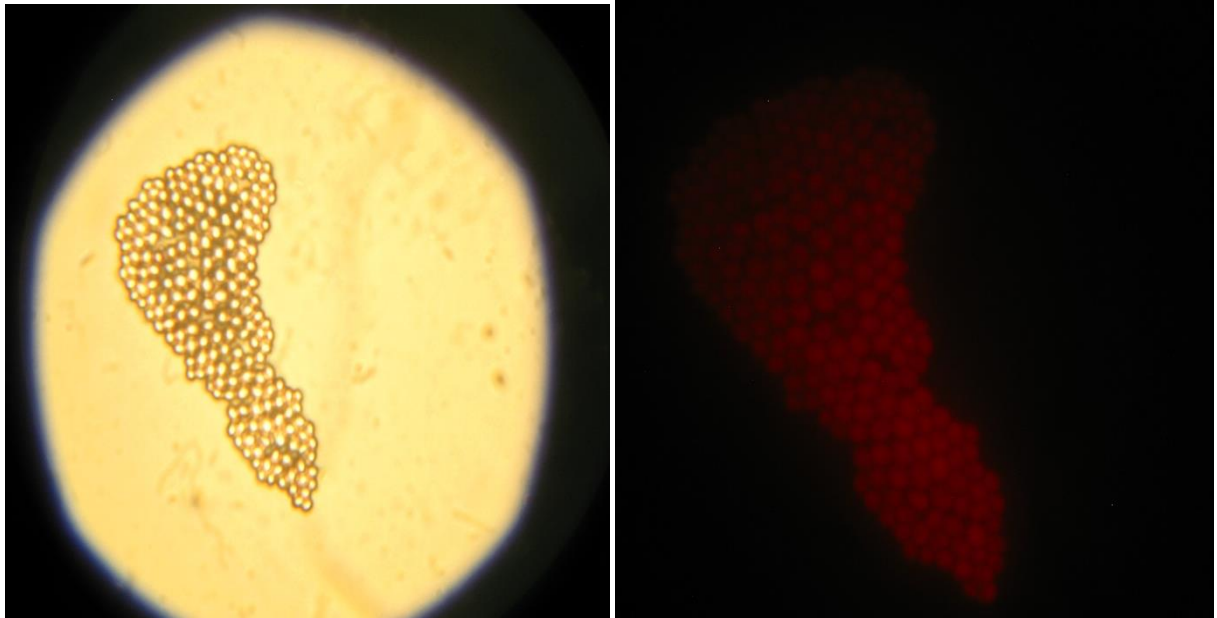
5.2. Fluorescenční mikroskopie kvasinek

Příprava vzorků proběhla podle postupu popsaného výše. Po přečištění a promytí kvasinek vystavených značeným nanočásticím byla patrná růžově zabarvená peletka (sediment buněk) na dně zkumavky, čímž bylo potvrzeno navázání fluorescenčně značených nanočástic stříbra na kvasinky. Následně došlo k pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu a pořízení snímků kvasinek. V případě kvasinek, které byly vystaveny působení čistého Rhodaminu, nebyl po centrifugaci patrný růžový sediment, což potvrzuje, že volný Rhodamin se na buněčnou stěnu kvasinek neváže. Buňky vystavené Rhodaminu bez nanočástic stříbra nevykazovaly fluorescenci a snímky tak nebyly pořizovány.

Z pozorování kvasinek v mikroskopu je patrné, že nanočástice jsou navázány na buněčnou stěnu, která díky tomu vykazuje fluorescenci. Fluorescenci bylo možné pozorovat v obou případech po vystavení kvasinek značeným nanočásticím stříbra. Kvasinky vystavené nanočásticím Ag-RBITC-I a Ag-RBITC-II od sebe při pozorování po 1 hodině nevykazovaly žádné větší odlišnosti. Po jedné hodině působení nanočástic vůči kvasinkám nejsou pozorovány žádné změny na tvaru buněk či poškození buněčné stěny, ale nanočástice s kvasinkou interagují na úrovni buněčné stěny a vykazují fluorescenci (obrázky 17 až 20).

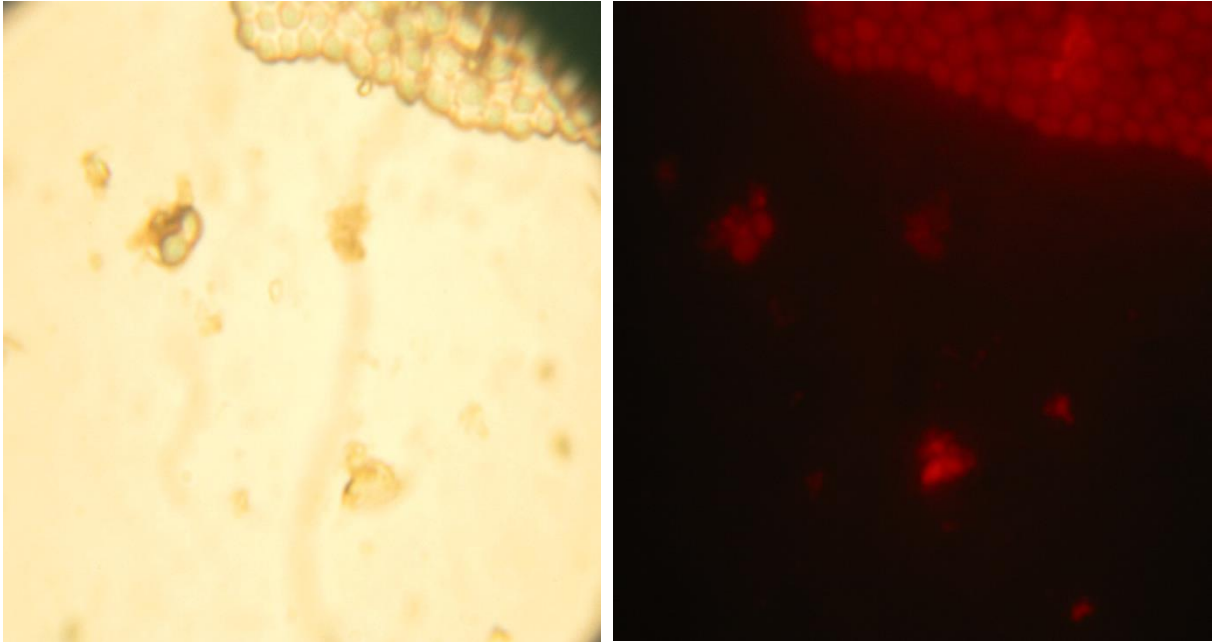


Obrázek č. 17 a 18: Snímek kvasinek z fluorescenčního mikroskopu po 1 hodině inkubace s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v bílém procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

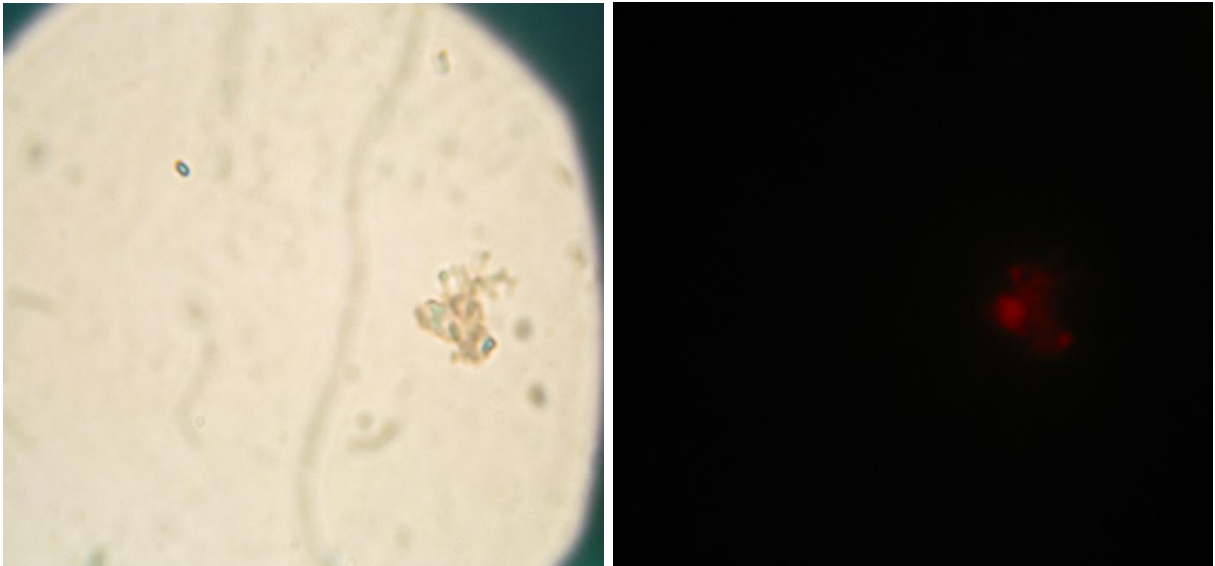


Obrázek č. 19 a 20: Snímek kvasinek z fluorescenčního mikroskopu po 1 hodině inkubace s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v bílém procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

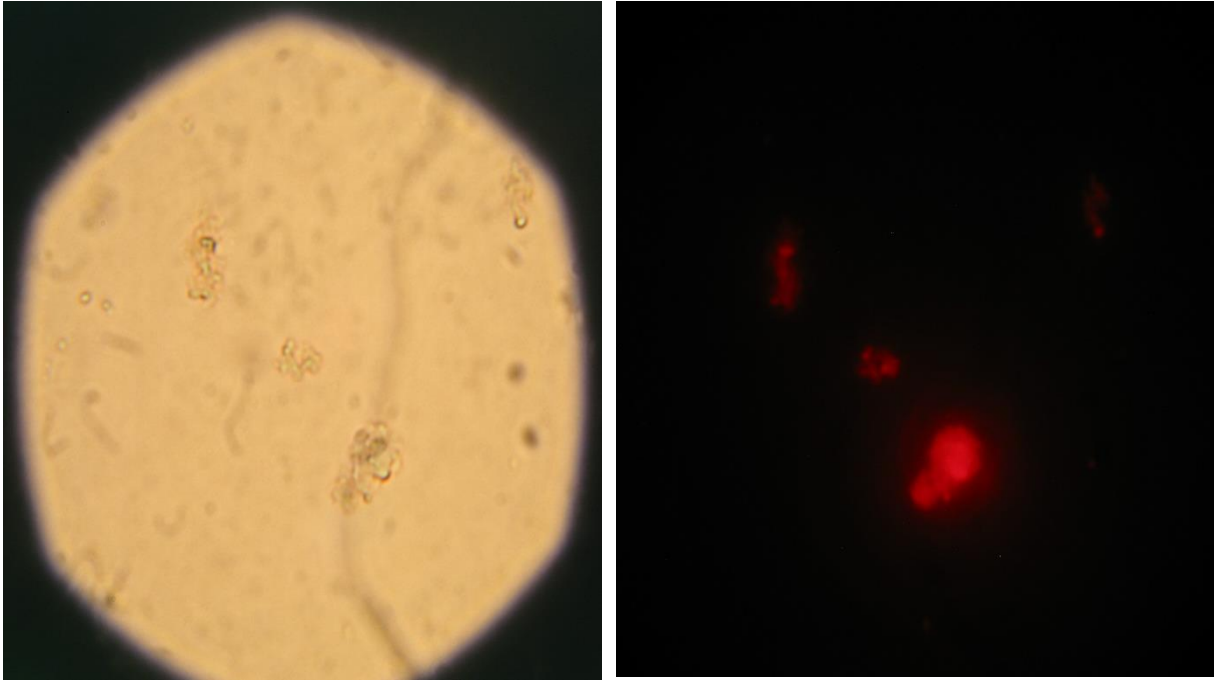
Odlišnosti mezi pozorovanými vzorky nebyly patrné ani po dvouhodinové inkubaci se značeným stříbrem. Ze snímků z fluorescenčního mikroskopu (Obrázky 21 až 24) je rovněž patrné, že buňky kvasinek po dvouhodinovém vystavení nanočásticím stříbra lyzují, tedy dochází k jejich prasknutí. Tomu také odpovídá pokles počtu buněk, který byl rovněž při mikroskopii pozorován. Podobný výsledek byl pozorován i v případě kvasinek vystavených nanočásticím stříbra po dobu 3 hodin (Obrázky 25 až 28). Ze snímků z fluorescenčního mikroskopu je patrné, že značené nanočástice stříbra jsou schopné interagovat s buněčnou stěnou kvasinek. S rostoucím časem inkubace dochází k většímu porušení buněčné stěny, což vede k lýze buněk a jejich rozpadu, které bylo pozorovatelné již po 2hodinové inkubaci se značenými nanočásticemi.



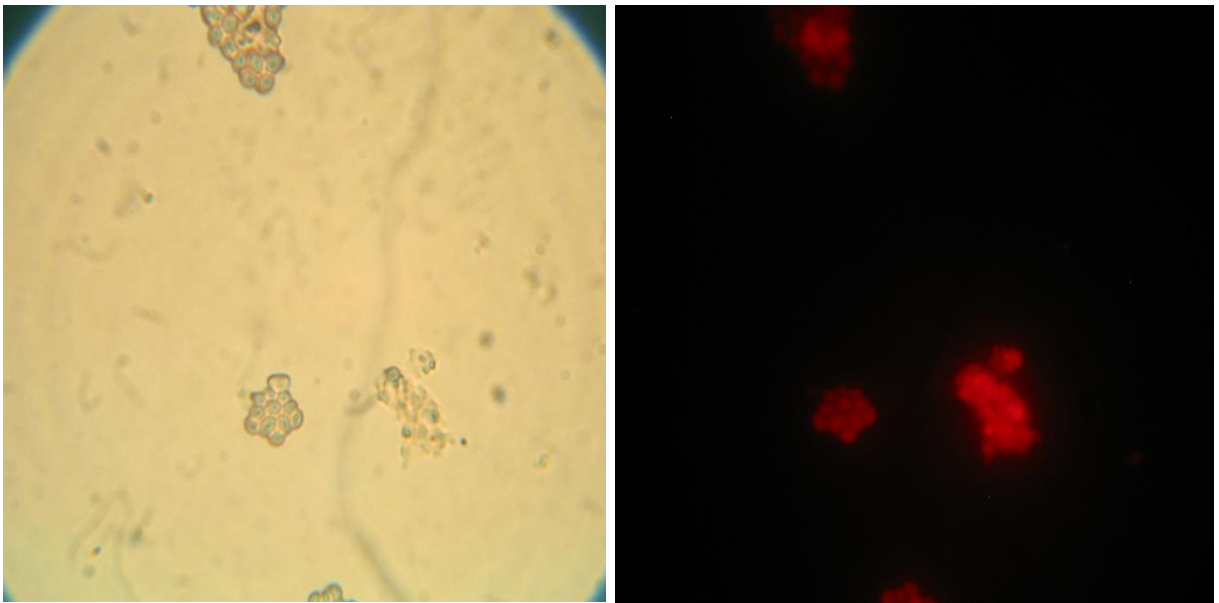
Obrázek č. 21 a 22: Snímek kvasinek z fluorescenčního mikroskopu po 2 hodinách inkubace s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v bílém procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.



Obrázek č. 23 a 24: Snímek kvasinek z fluorescenčního mikroskopu po 2 hodinách inkubace s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v bílém procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.



Obrázek č. 25 a 26: Snímek kvasinek z fluorescenčního mikroskopu po 3 hodinách inkubace s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v bílém procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

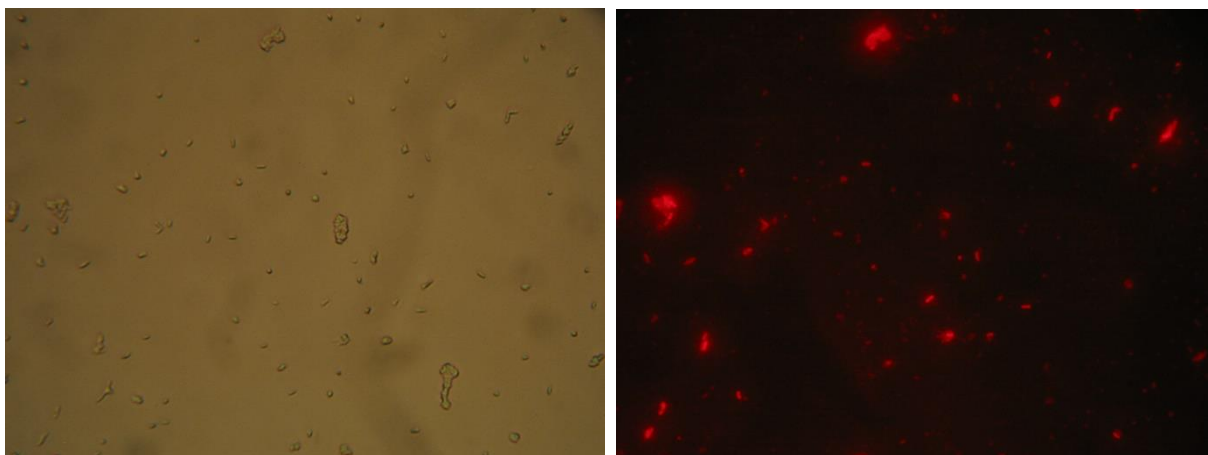


Obrázek č. 27 a 28: Snímek kvasinek z fluorescenčního mikroskopu po 3 hodinách inkubace s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v bílém procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

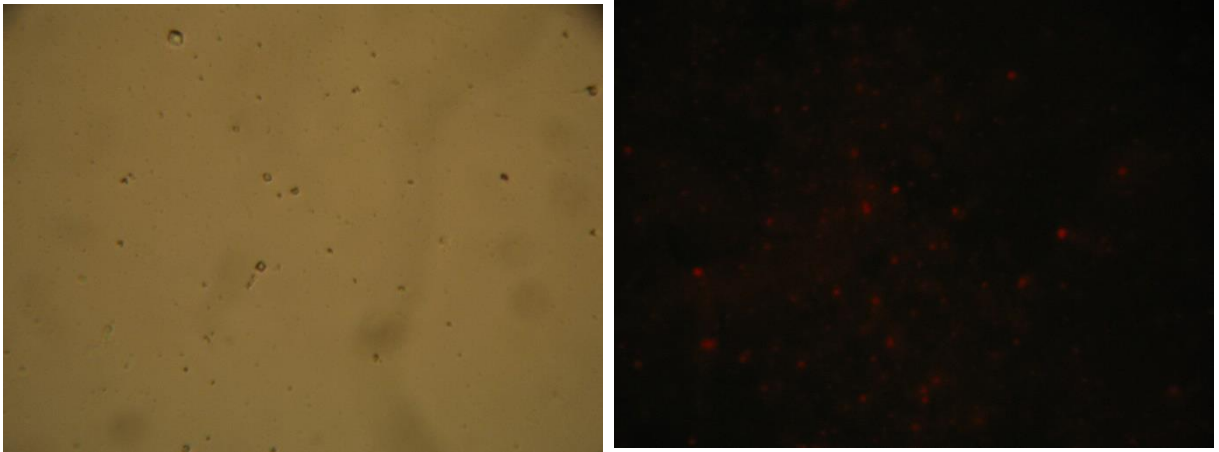
5.3. Fluorescenční mikroskopie bakterií

K pozorování byly využity Gram-negativní bakterie *Escherichia coli* a Gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. Příprava vzorků proběhla podle postupu pospaného výše. Po přečištění a promytí bakterií vystavených značeným nanočásticím byl patrný barevný sediment na dně zkumavky, čímž bylo potvrzeno navázání fluorescenčně značených nanočástic stříbra na bakterie. Následně došlo k pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu a pořízení snímků fluorescenčně značených bakterií. Bakterie vystavené pouze Rhodaminu bez nanočástic stříbra netvořily barevný sediment po centrifugaci a stejně jako kvasinky nevykazovaly fluorescenci. Samotné barvivo se tedy na buňky neváže, a i v tomto případě tedy nebyly snímky pořizovány.

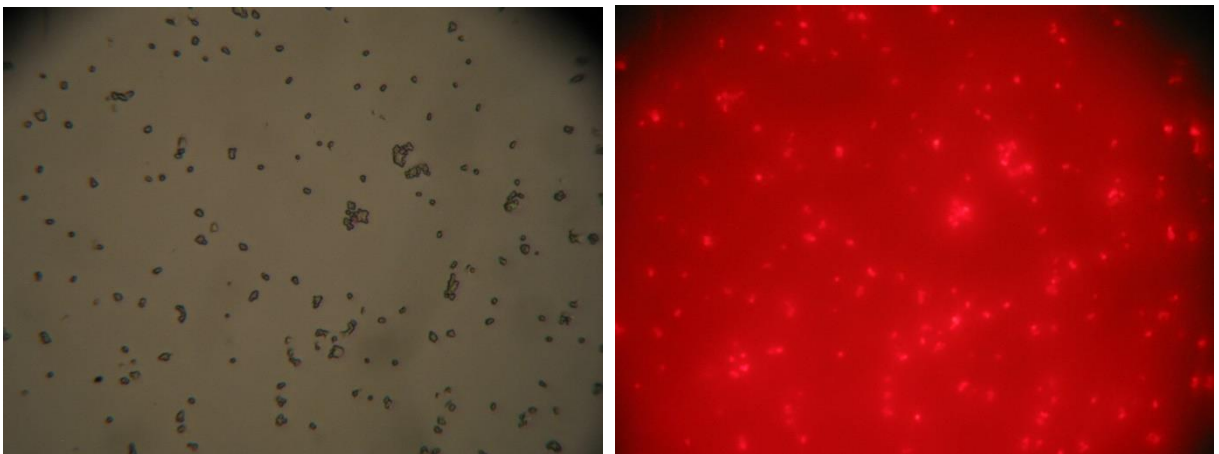
Testované bakterie vystavené vzorkům Ag-RBITC-I a Ag-RBITC-II po 30 minutách inkubace se od sebe při pozorování nelišily. Fluorescenci bylo možné pozorovat ve všech případech po vystavení bakterií značeným nanočásticím stříbra. Ze snímků je patrné, že značené nanočástice vykazují interakci s buněčnou stěnou a fluorescenci vykazovaly téměř všechny bakterie.



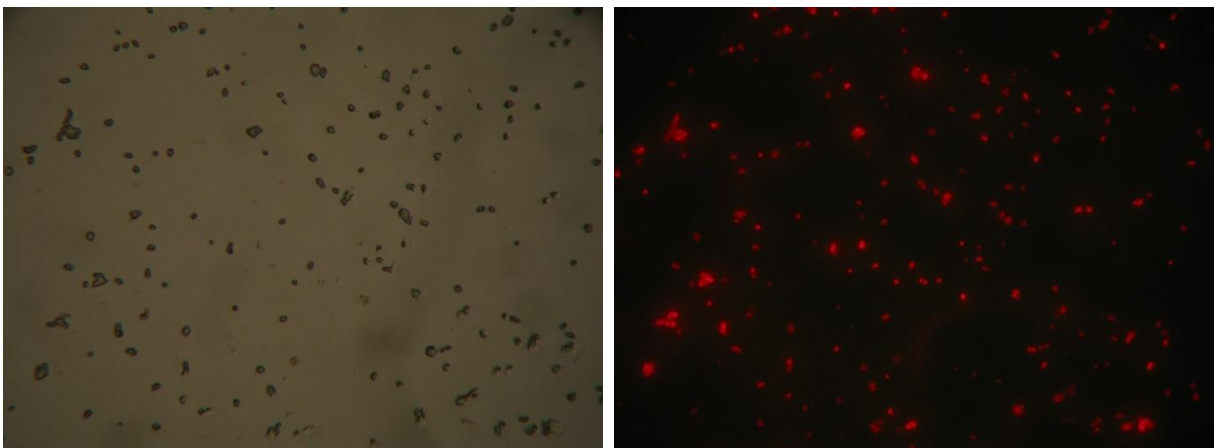
Obrázky č. 29 a 30: Snímek bakterií *Escherichia coli* z fluorescenčního mikroskopu po 30 minutách inkubace s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.



Obrázky č. 31 a 32: Snímek bakterií *Escherichia coli* z fluorescenčního mikroskopu po 30 minutách inkubace s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

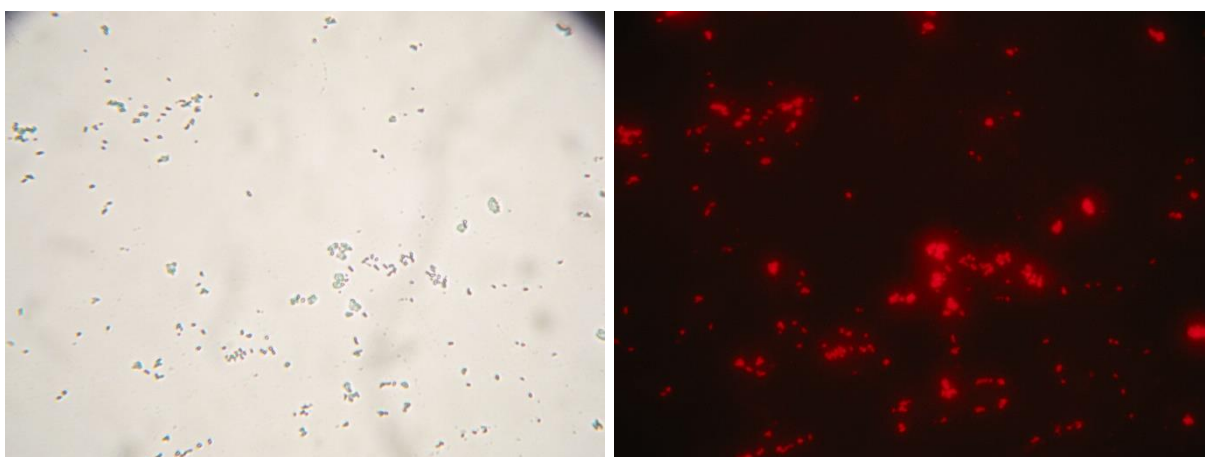


Obrázky č. 33 a 34: Snímek bakterií *Staphylococcus aureus* z fluorescenčního mikroskopu po 30 minutách s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

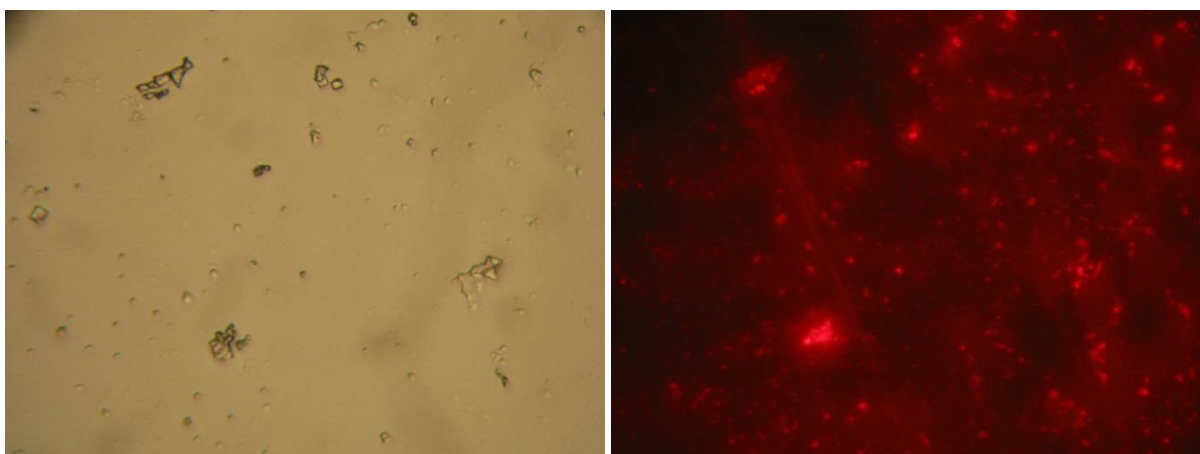


Obrázky č. 35 a 36: Snímek bakterií *Staphylococcus aureus* z fluorescenčního mikroskopu po 30 minutách s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu

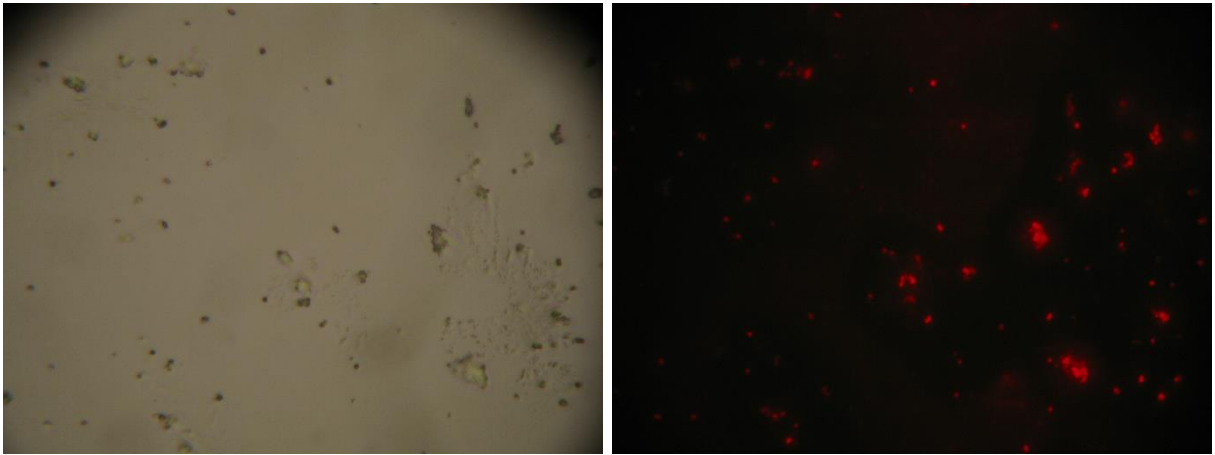
Vliv nanočástic stříbra na testované bakterie byl následně pozorován v závislosti na čase po dobu 1, 2 a 3 hodin. Podle snímků pořízených z fluorescenčního mikroskopu nebyl pozorován žádný významný rozdíl mezi bakteriemi vystavenými nanočásticím stříbra Ag-RBITC-I a Ag-RBITC-II v různých časových intervalech. Ze snímků je patrné, že nanočástice působí na stěnu bakterií, kde se koncentrují, což potvrzuje vysoká fluorescence buněk. S narůstajícím časem působení nanočástic stříbra dochází k vyšší intenzitě fluorescence buněk, což prokazuje postupné zvyšování koncentrace nanočástic stříbra na buněčné stěně bakterií. S narůstajícím časem působení nanočástic Ag na bakterie také postupně dochází k narušení buněčné stěny, což následně vede až k lýze bakterií, tedy prasknutí buňky a uvolnění nitrobuněčného obsahu do vnějšího okolí.



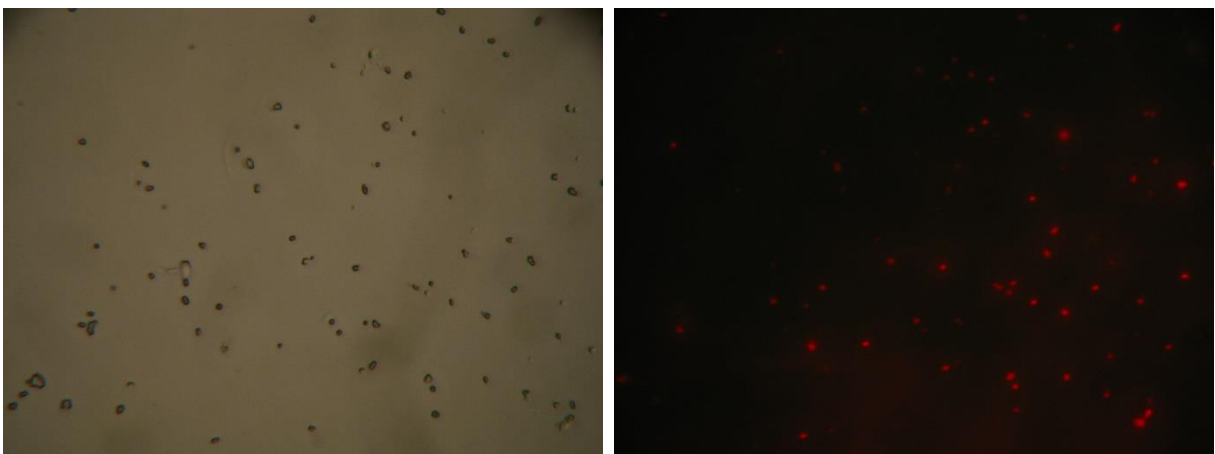
Obrázky č. 37 a 38: Snímek bakterií *Escherichia coli* z fluorescenčního mikroskopu po 1 hodině inkubace s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.



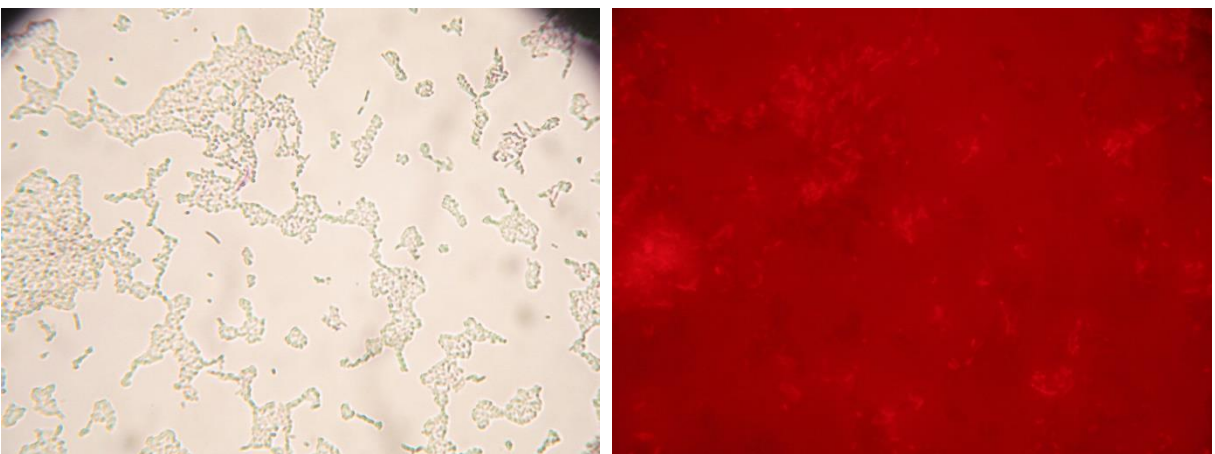
Obrázky č. 39 a 40: Snímek bakterií *Escherichia coli* z fluorescenčního mikroskopu po 1 hodině inkubace s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v procházejícím světle, vpravo ve fluorescenčním módu.



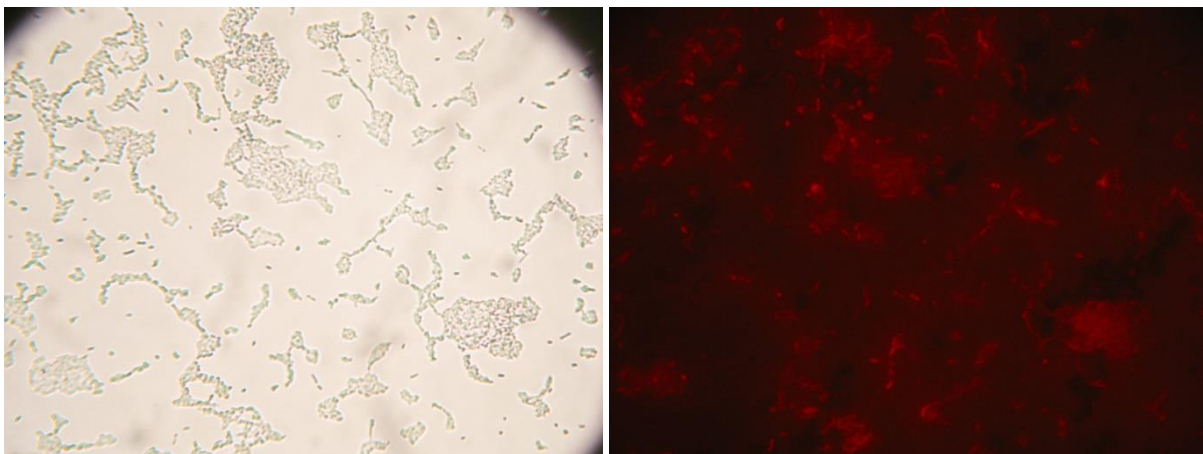
Obrázky č. 41 a 42: Snímek bakterií *Staphylococcus aureus* z fluorescenčního mikroskopu po 1 hodině s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v procházejícím světle, vpravo ve fluorescenčním módu.



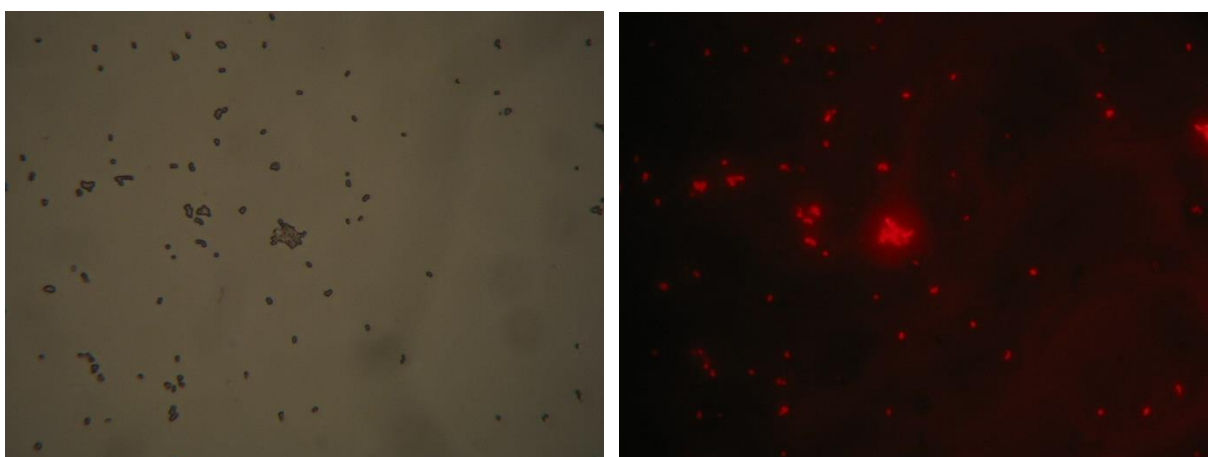
Obrázky č. 43 a 44: Snímek bakterií *Staphylococcus aureus* z fluorescenčního mikroskopu po 1 hodině s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.



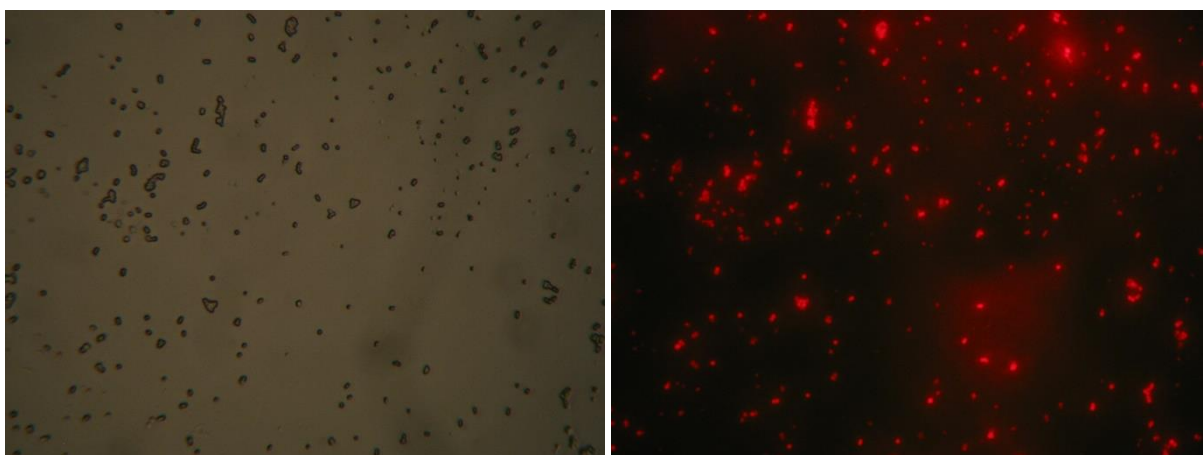
Obrázky č. 45 a 46: Snímek bakterií *Escherichia coli* z fluorescenčního mikroskopu po 2 hodinách inkubace s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.



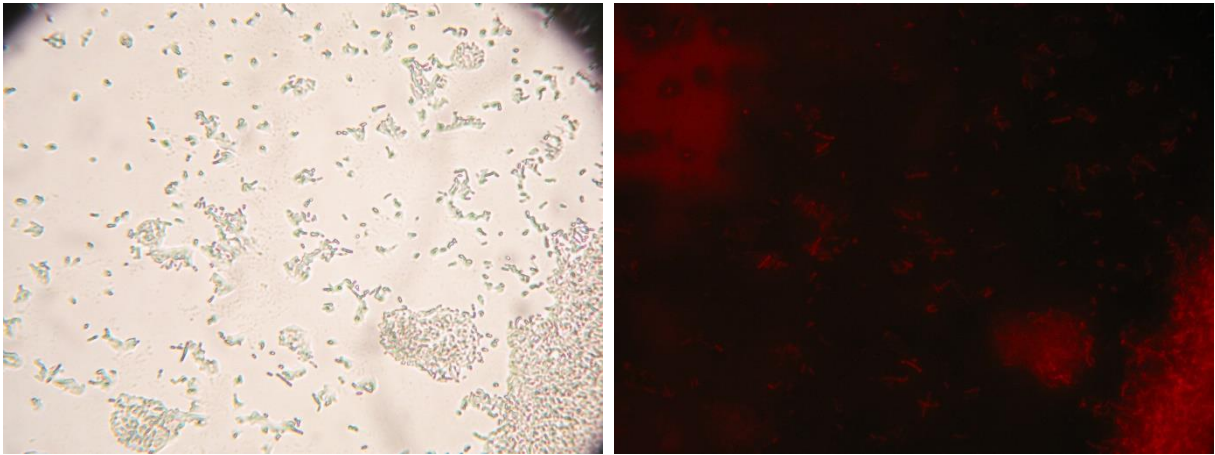
Obrázky č. 47 a 48: Snímek bakterií *Escherichia coli* z fluorescenčního mikroskopu po 2 hodinách inkubace s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.



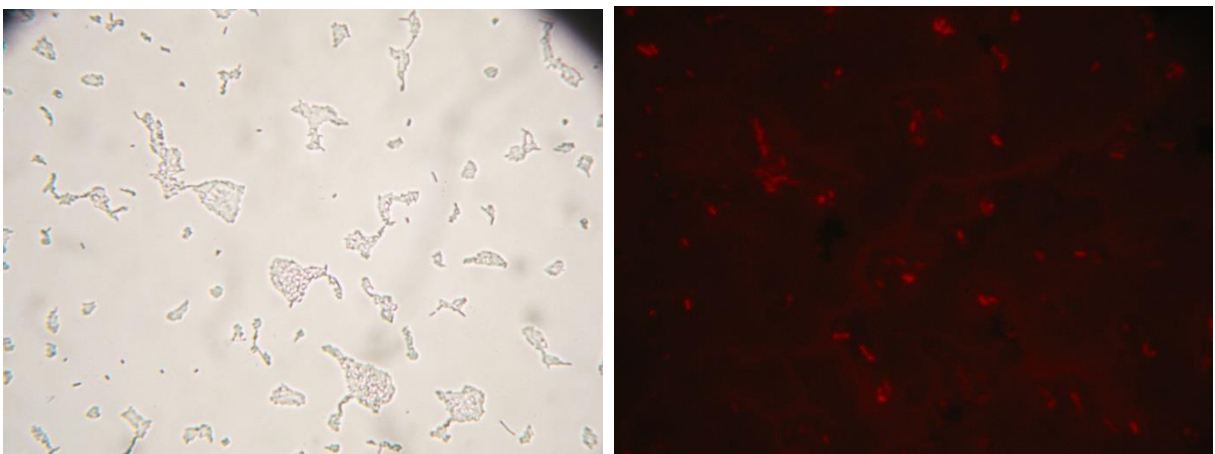
Obrázky č. 49 a 50: Snímek bakterií *Staphylococcus aureus* z fluorescenčního mikroskopu po 2 hodinách s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v procházejícím světle, vpravo ve fluorescenčním módu.



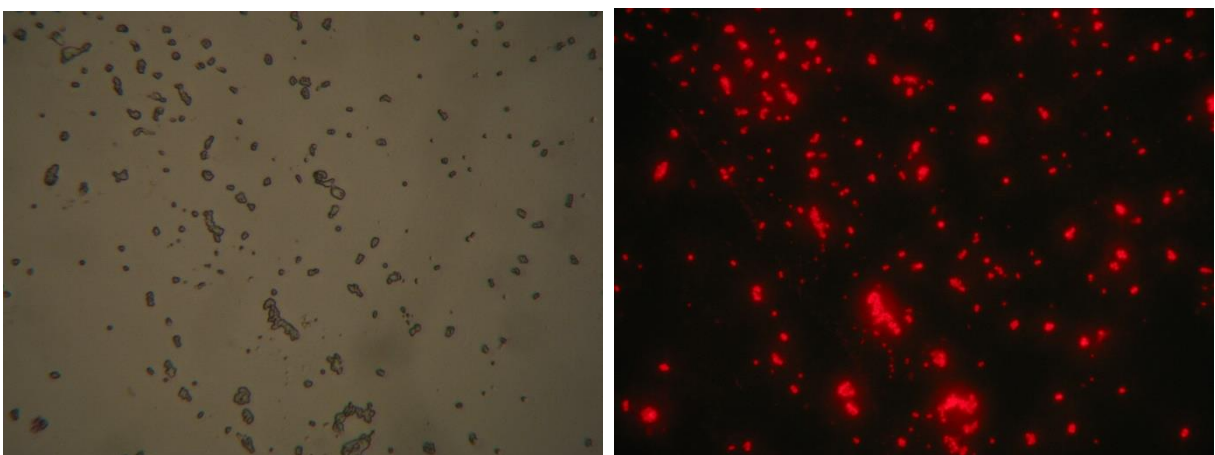
Obrázky č. 51 a 52: Snímek bakterií *Staphylococcus aureus* z fluorescenčního mikroskopu po 2 hodinách s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v procházejícím světle, vpravo v fluorescenčním módu.



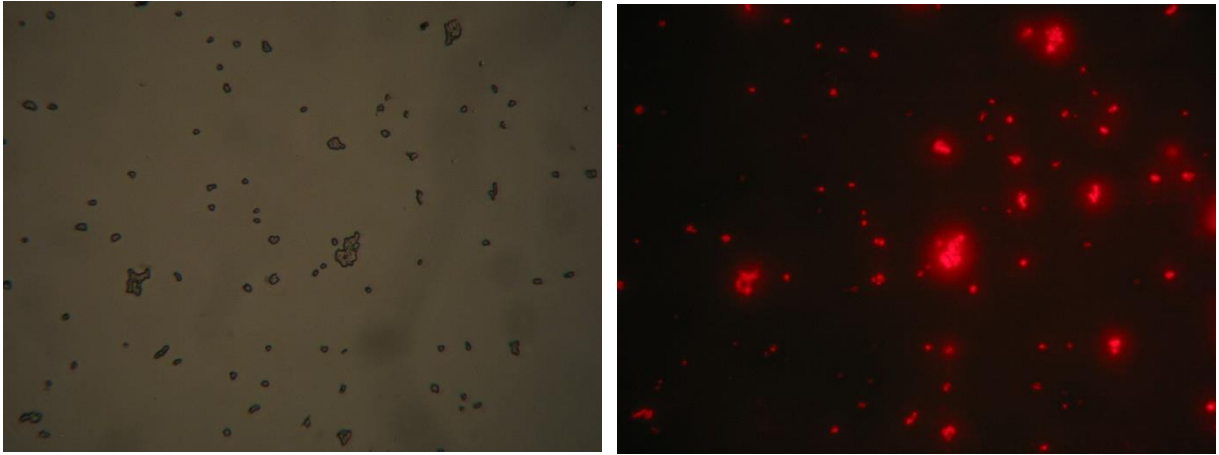
Obrázky č. 53 a 54: Snímek bakterií *Escherichia coli* z fluorescenčního mikroskopu po 3 hodinách inkubace s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.



Obrázky č. 55 a 56: Snímek bakterií *Escherichia coli* z fluorescenčního mikroskopu po 3 hodinách inkubace s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

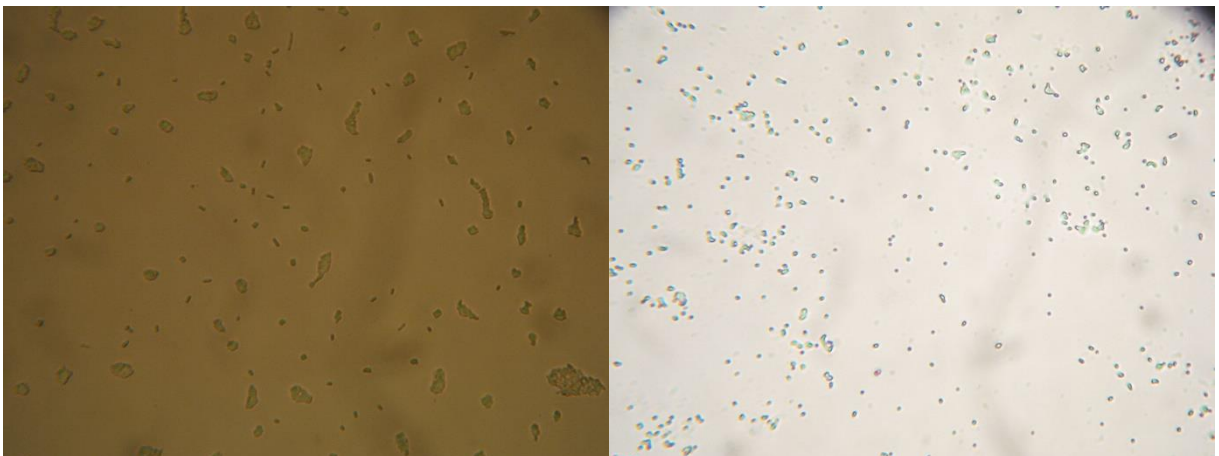


Obrázky č. 57 a 58: Snímek bakterií *Staphylococcus aureus* z fluorescenčního mikroskopu po 3 hodinách s Ag-RBITC-I. Vlevo pozorování v procházejícím světle vpravo ve fluorescenčním módu.



Obrázky č. 59 a 60: Snímek bakterií *Staphylococcus aureus* z fluorescenčního mikroskopu po 3 hodinách s Ag-RBITC-II. Vlevo pozorování v procházejícím světle, vpravo ve fluorescenčním módu.

Buňky bakterií, které nebyly vystaveny značeným nanočásticím stříbra ani samotnému barvivu, zobrazují obrázky č. 58 a 59, aby byla vyloučena možnost fluorescence samotných buněk.



Obrázky č. 61 a 62: Vlevo snímek *Escherichia coli* a vpravo *Staphylococcus aureus* nevystavených značeným nanočásticím stříbra.

5.4. Fluorescenční mikropsie fibroblastů

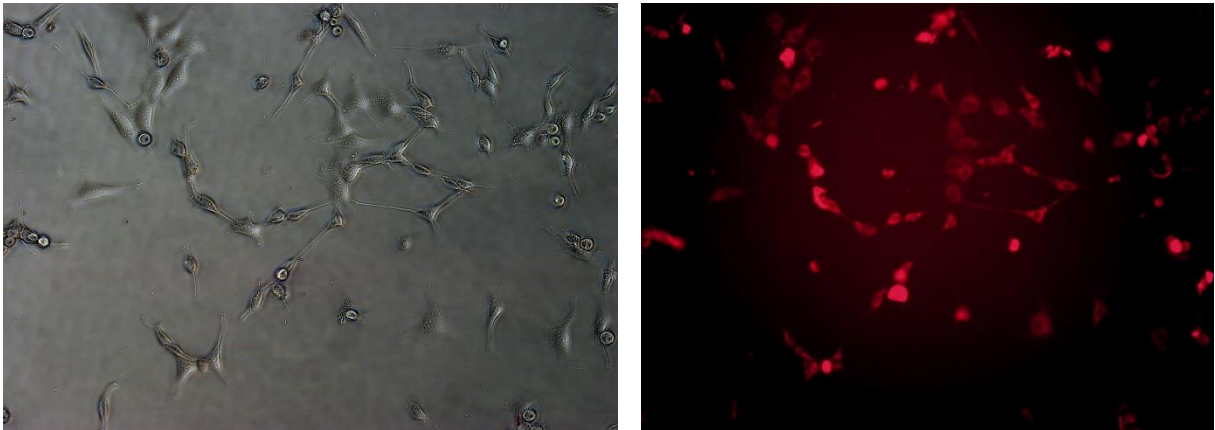
Pozorování interakce myších fibroblastů se značenými nanočásticemi provedla Mgr. Šárka Hradilová, Ph.D. v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů v Olomouci. K pozorování byly použity NIH/3T3 myši fibroblasty, které byly vystaveny oběma vzorkům značených nanočástic.

Pro srovnání byl pořízen snímek fibroblastů nevystavených nanočásticím v procházejícím světle a fluorescenčním módu (obrázek č. 63), aby byla vyloučena možnost fluorescence samotných buněk. Snímek ve fluorescenčním módu není zobrazen, jelikož buňky, které nebyly vystaveny nanočásticím stříbra, fluorescence nevykazovaly.

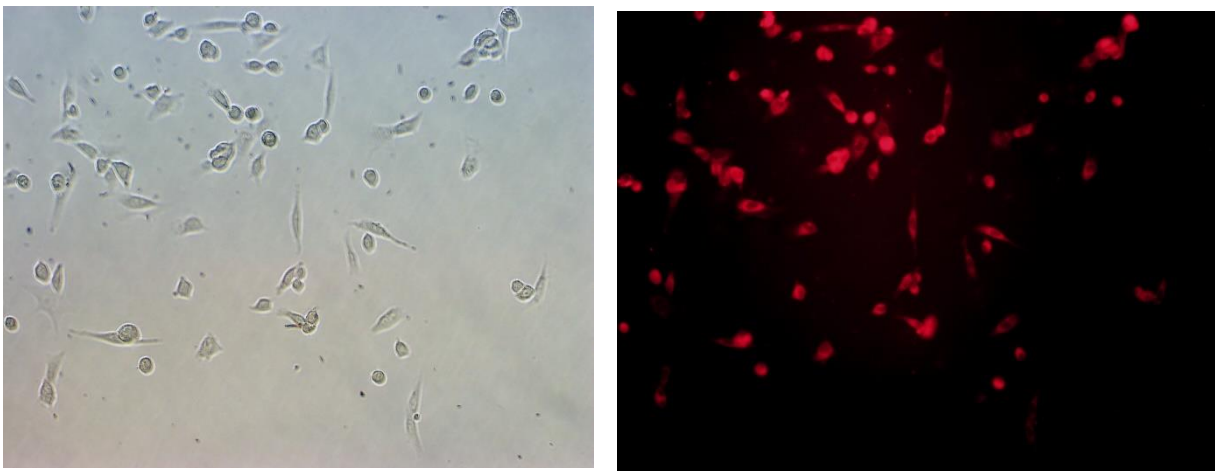


Obrázek č. 63: Snímek myších fibroblastů v procházejícím bílém světle.

Interakce značených nanočástic s fibroblasty byla pozorována fluorescenčním mikroskopem v časech 30 minut, 1 hod., 3 hod., 6 hod. a 24 hodin od aplikace vzorků nanočástic stříbra. U obou vzorků byla pozorovatelná fluorescence již po 30 minutách inkubace s buňkami.

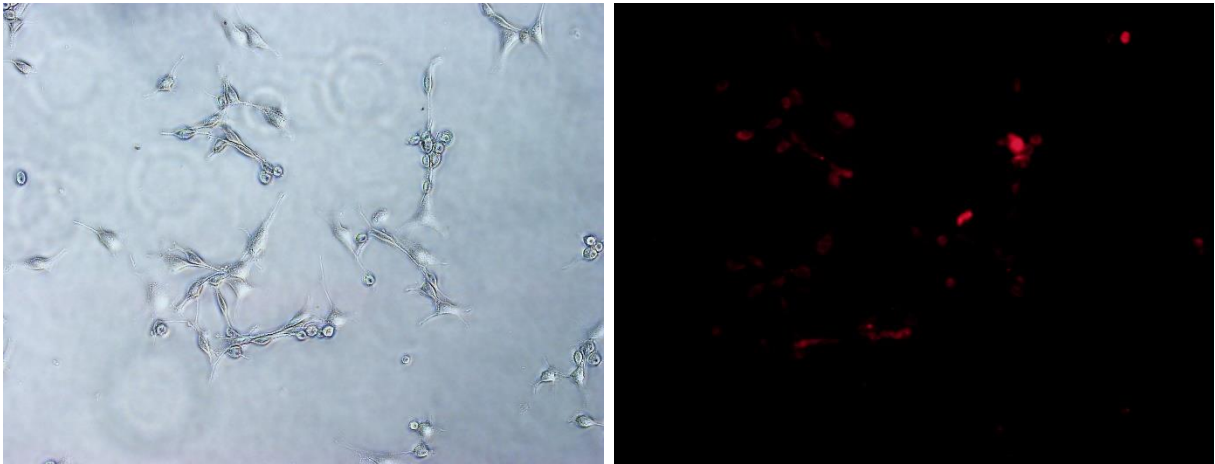


Obrázky č. 64 a 65: Snímky fibroblastů po 30 minutách inkubace se vzorkem Ag-RBITC-I. Vlevo v procházejícím bílém světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

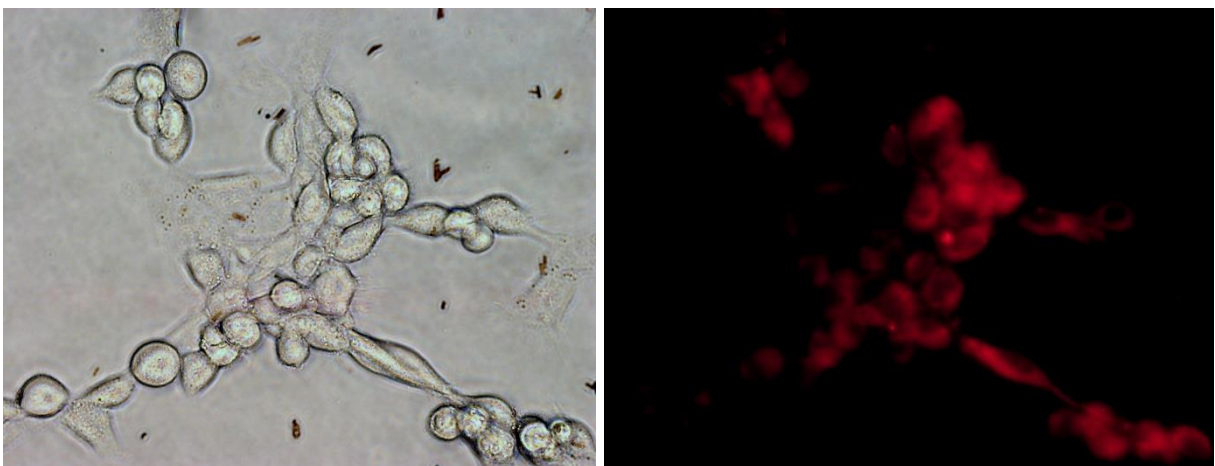


Obrázky č. 66 a 67: Snímky fibroblastů po 30 minutách inkubace se vzorkem Ag-RBITC-II. Vlevo v procházejícím bílém světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

Po 1 hodině od aplikace nanočástic se myší fibroblasty vystavené Ag-RBITC-II začaly mírně deformovat, zatímco v případě vzorku Ag-RBITC-II nebyly pozorovány žádné změny. Také došlo k pozorování intenzivnější fluorescence, což je způsobeno pronikáním nanočástic do cytosolu buňky. Z obrázků č. 65, 67, 69 a 71 je zřetelné, že se značené nanočástice stříbra drží mimo jádro buňky, které je viditelné uprostřed buňky jako tmavší oblast nevykazující fluorescenci.

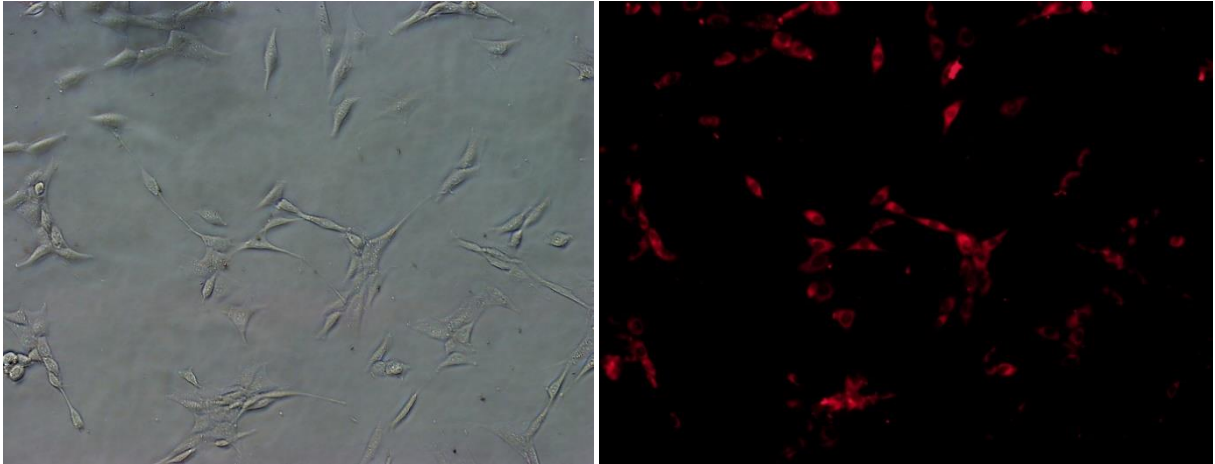


Obrázky č. 68 a 69: Snímky fibroblastů po 1 hodině inkubace se vzorkem Ag-RBITC-I. Vlevo v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

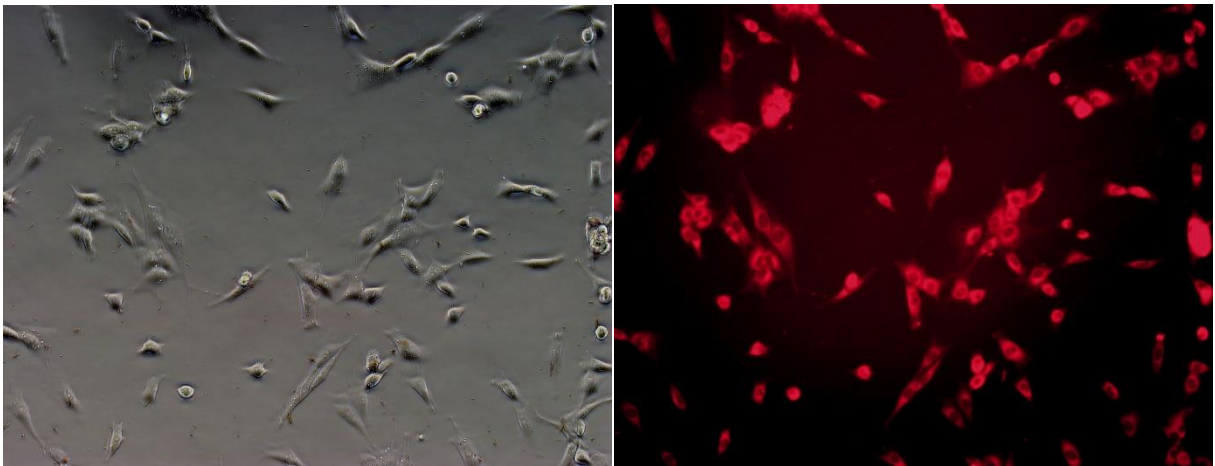


Obrázky č. 70 a 71: Snímky fibroblastů po 1 hodině inkubace se vzorkem Ag-RBITC-II. Vlevo v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

Morfologie myších fibroblastů nebyla výrazně změněna ani po 3 hodinách inkubace se značenými nanočásticemi stříbra. Intenzivní fluorescence byla zaznamenána. Z pozorování vyplynulo, že značené nanočástice ani po 3 hodinách inkubace nepronikly do jádra.

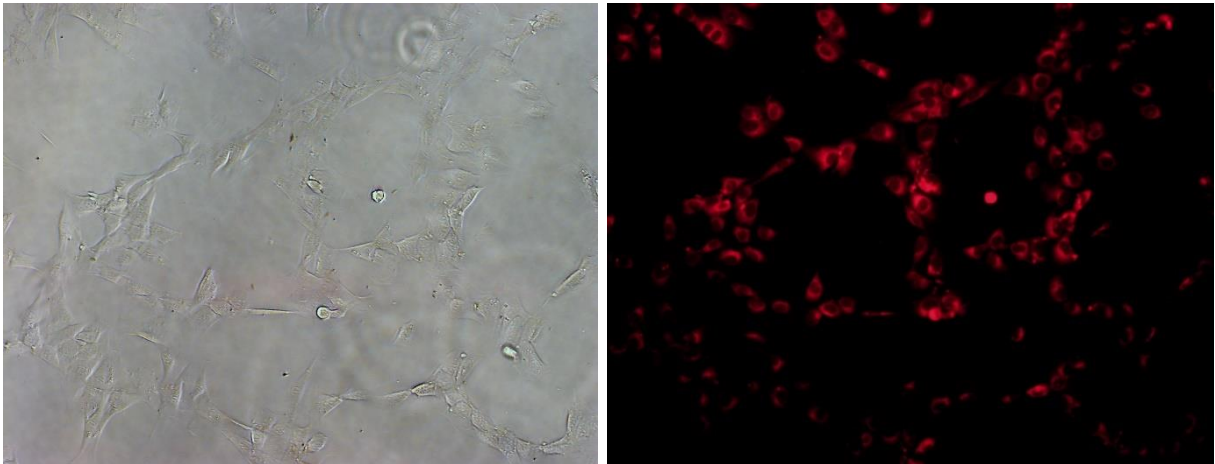


Obrázky č. 72 a 73: Snímky fibroblastů po 3 hodinách inkubace se vzorkem Ag-RBITC-I. Vlevo v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

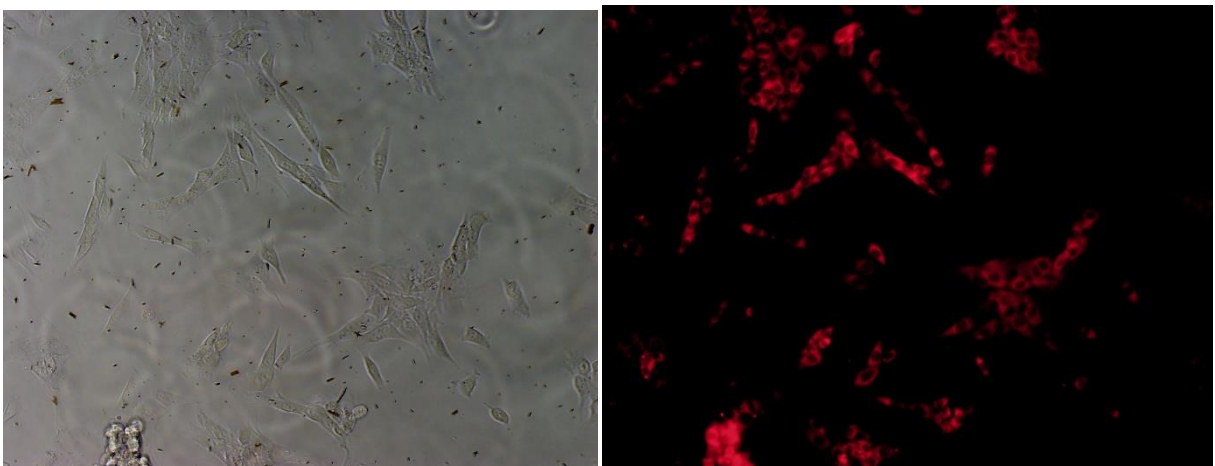


Obrázky č. 74 a 75: Snímky fibroblastů po 3 hodinách inkubace se vzorkem Ag-RBITC-II. Vlevo v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

Pozorování vzorků po 6hodinové inkubaci fibroblastů s nanočásticemi bylo shodné s předcházejícími pozorováními. Morfologie fibroblastů nebyla výrazně změněna. Byla zaznamenána intenzivní fluorescence, nicméně značené nanočásticemi nepronikli do jádra, které je opět tmavší ve srovnání s cytosolem buňky.

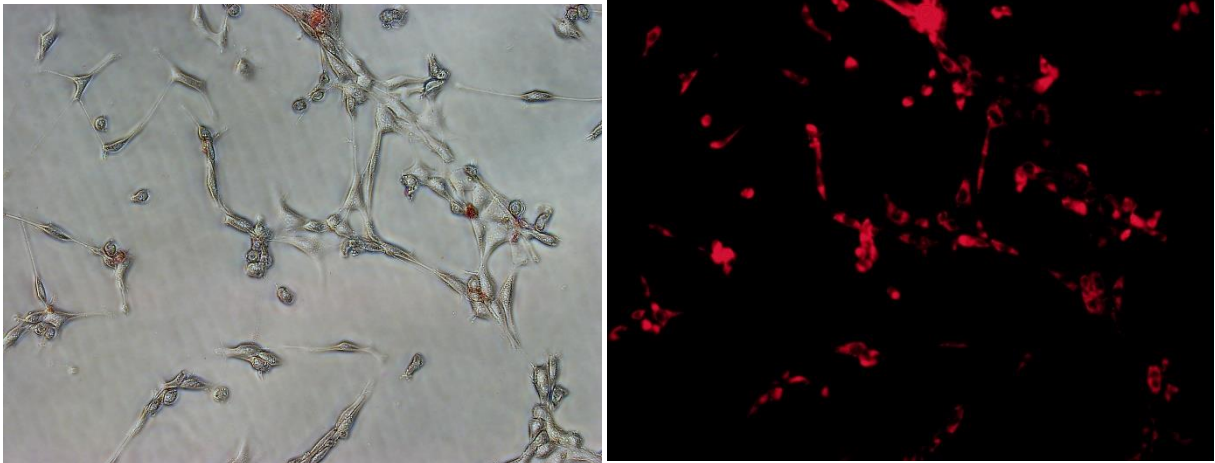


Obrázky č. 76 a 77: Snímky fibroblastů po 6 hodinách inkubace se vzorkem Ag-RBITC-I. Vlevo v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu

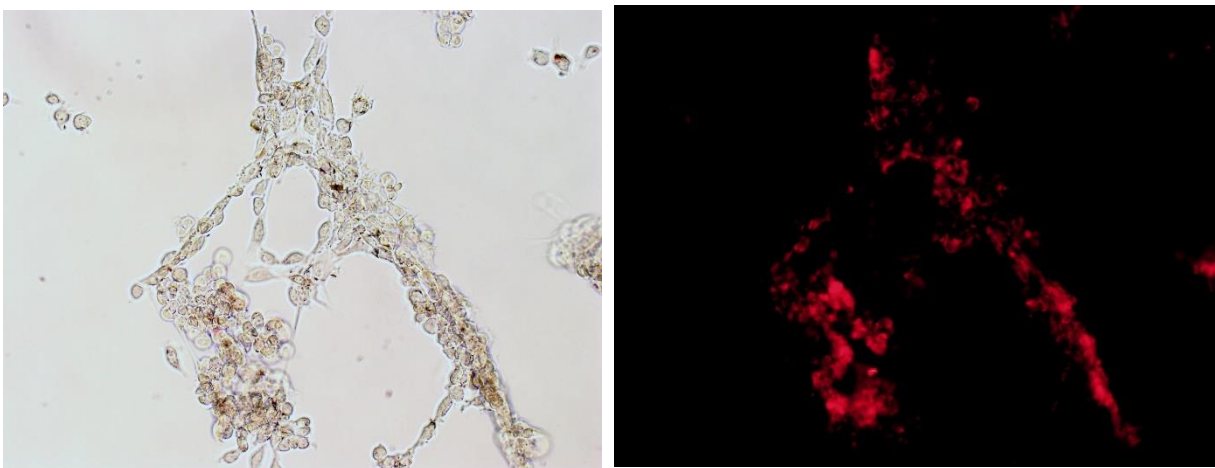


Obrázky č. 78 a 79: Snímky fibroblastů po 6 hodinách inkubace se vzorkem Ag-RBITC-II. Vlevo v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

Po 24hodinové inkubaci fibroblasty vykazovaly fluorescenci, která byla pozorovatelná v jejich cytosolu nikoliv však v jádře buňky. Z toho lze usoudit, že připravené nanočástice stříbra značené barvivem RBITC nepoškozují jádro a nejsou tedy toxické pro buňky fibroblastů. Z porovnání obrázků č. 80 a 82 je zřejmé, že buňky vystavené vzorku Ag-RBITC-II mají odlišnou morfologii buněk – jsou více zdeformované a taky shluklé než vystavení vzorku Ag-RBITC-I. Působení Ag-RBITC-II na buňky je tedy více toxičtější, což je pravděpodobně způsobeno vyšším výskytem menších částic.

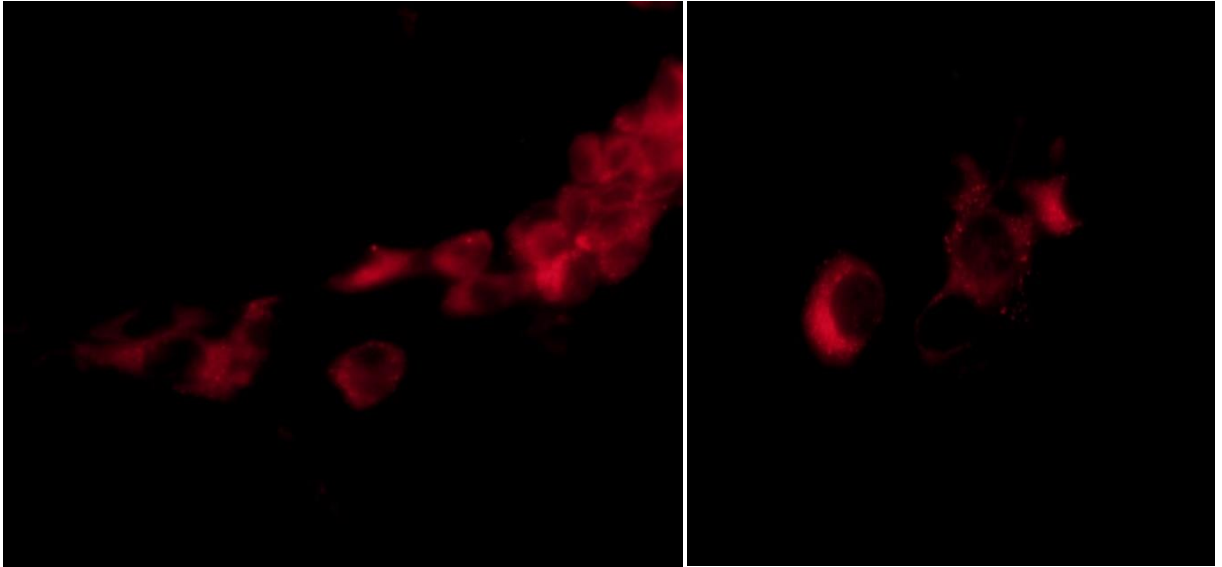


Obrázky č. 80 a 81: Snímky fibroblastů po 24 hodinách inkubace se vzorkem Ag-RBITC-I. Vlevo v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.



Obrázky č. 82 a 83: Snímky fibroblastů po 24 hodinách inkubace se vzorkem Ag-RBITC-II. Vlevo v procházejícím světle a vpravo ve fluorescenčním módu.

Z provedených pozorování a pořízených snímků (obrázky č. 84 a 85) lze usoudit, že značené nanočástice stříbra pronikají do buňky endocytózou, což je proces, který umožňuje absorbovat materiál vyskytující se mimo buňku. Dochází k vytvoření váčků a proniknutí do cytosolu buňky. Po 24.hodinové inkubaci jsou viditelné jednotlivé tečky/kuličky uvnitř buňky. Jedná se patrně o lysozomy obsahující fluorescenčně značené nanočástice stříbra.



Obrázky č. 84 a 85: Detailnější snímky fibroblastů po 24 hod. inkubace se vzorkem Ag-RBITC-II.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce byla příprava fluorescenčně značených nanočástic stříbra a sledování jejich interakce s bakteriemi, kvasinkami a myšimi fibroblasty pomocí fluorescenční mikroskopie.

Nanočástice stříbra byly připraveny pomocí modifikované Tollensovy metody, jejímž principem je jednokroková syntéza nanočástic založená na redukci diaminstříbrného komplexu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ redukční látkou, v tomto případě tetrahydridoboritanem sodným. Jako stabilizátor nanočástic stříbra byla použita polyakrylová kyselina. Pro navázání fluorescenční barvy Rhodamin B isothiokyanátu (RBITC) na nanočástice stříbra bylo využito reakce mezi karboxylovými skupinami polyakrylové kyseliny a isothiokyanátu použitého Rhodaminu B. Fluorescenční značení nanočástic stříbra probíhalo dvěma různými postupy, které se od sebe lišily způsobem navázání fluoroforu na nanočástice. Po syntéze došlo k přečištění vzorků pomocí dialýzy, za účelem odstranění nenavázaného barviva RBITC. Následně byly značené nanočástice charakterizovány pomocí UV/VIS absorpční spektroskopie, transmisní elektronové mikroskopie a atomové absorpční spektrometrie.

Fluorescenční mikroskopii byly pozorovány interakce značených nanočástic stříbra s vybranými biologickými vzorky. Pro pozorování byly vybrány kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* a buňky myších fibroblastů. Během pozorování byla potvrzena interakce nanočástic s buněčnou stěnou bakterií a kvasinek, rovněž její narušení a lýza buněk s narůstajícím časem vystavení buněk stříbru. S rostoucím inkubačním časem byla intenzita fluorescence větší. V případě kvasinek a bakterií nebyly pozorovatelné rozdíly mezi působením připravených vzorků Ag-RBITC-I a Ag-RBITC-II na testované buňky. U kvasinek s rostoucím časem docházelo k prasknutí buněčné stěny. V rámci pozorování myších fibroblastů byla pozorována vyšší toxicita vzorku Ag-RBITC-II, který způsoboval větší deformaci buňky než vzorek Ag-RBITC-I. U myších buněk byl pozorován průnik částic stříbra do buněk pravděpodobně endocytózou, nicméně do buněčného jádra částice nepronikají.

Na základě provedených experimentů lze usoudit, že značené nanočástice Rhodaminem B isothiokyanátem jsou vhodné pro vizualizaci interakce s biologickými vzorky.

7. Summary

The aim of this thesis was to prepare fluorescently labeled silver nanoparticles and to monitor their interaction with bacteria, yeast and mouse fibroblasts using a fluorescence microscope. Silver nanoparticles were prepared using a modified Tollens method, whose principle is a one-step synthesis of nanoparticles based on the reduction of the diamine silver complex $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ with sodium borohydride. Polyacrylic acid was used as a stabilizer. To bind the fluorescent color Rhodamine B isothiocyanate (RBITC) to silver nanoparticles, the reaction between the carboxyl groups of the polyacrylic acid and the Rhodamine B isothiocyanate was used. After the synthesis, the samples were purified by dialysis to remove unbound dye RBITC. Subsequently, the labeled nanoparticles were characterized by UV / VIS absorption spectroscopy, dynamic light scattering, transmission electron microscopy and atomic absorption spectroscopy.

The interaction of labeled silver nanoparticles with selected biological samples was observed by means of fluorescence microscopy. Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and mouse fibroblast cells were used for observation. During the observation, the interaction of the nanoparticles with the cell wall of bacteria and yeast was confirmed, as well as its disruption and lysis of cells with increasing time of exposure of silver to cells. With increasing incubation time, fluorescence intensity was greater. In the case of yeasts and bacteria, no differences were observed between the tested Ag-RBITC-I and Ag-RBITC-II tested samples. A cell wall rupture was registered in the yeast over time. While observing mouse fibroblast a higher toxicity of the Ag-RBITC-II sample was detected, which caused more deformation of cell than the Ag-RBITC-I sample. A penetration of silver particles into mouse cells was noticed. It was possibly caused by endocytosis; nevertheless, particles did not penetrate into the cell nucleus.

Based on the performed experiments, it can be concluded that the labeled nanoparticles with Rhodamine B isothiocyanate are suitable for visualizing the interaction with biological samples.

Seznam použité literatury

- [1] KREYLING, W. G.; SEMMLER-BEHNKE, M.; CHAUDHRY, Q.; *A complementary definition of nanomaterial*, Nano Today, 2010, (5), p. 165-168, ISSN 1748-0132
- [2] KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I.; *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*, Arab. J. Chem., 2017, ISSN 1878-5352
- [3] KVÍTEK, L.; PANÁČEK, A.; *Základy koloidní chemie*, UP Olomouc, Olomouc, 2007, ISBN 978-80-244-1669-4
- [4] <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/119265/3/chapter%20i.pdf> citováno dne 23. 1.2019
- [5] <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9783527648122.ch1> citováno dne 23. 1. 2019
- [6] KVÍTEK, L. *Metody studia koloidních soustav*, Prozatímní učební text, Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc, Olomouc, 2006
- [7] NOVÁK, J. a kol. *Fyzikální chemie; bakalářský a magisterský kurz*, VŠCHT Praha, Praha, 2008, ISBN 978-80-7080-675-3
- [8] http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/modely_elektricke_dvojvrstvy.html citováno dne 25. 3. 2019
- [9] ZHENG, K.; SETYAWATI, M. I.; LEONG, D. T.; XIE, J.; *Antimicrobial silver nanomaterials*, Coordin. Chem. Rev., 2018, (357), p. 1-17, ISSN 0010-8545
- [10] AGNIHOTRIA, S.; MUKHERJI, So.; MUKHERJI, Su.; *Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy*, RSC Adv., 2014, (4), p. 3974-3983
- [11] KVÍTEK, L.; PANÁČEK, A.; PRUCEK, R.; ZBOŘIL, R.; et al.; *Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity*, J. Phys. Chem. B, 2006, 110(33), p. 16248-16253
- [12] Sadeghi, B.; Garmaroudi, F.S.; M. Hashemi, M.; Nezhad, H.R.; et al.; *Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates*, Adv. Powder Technol., 2012, (23)1, p. 22-26, ISSN 0921-8831
- [13] VAN DONG, P.; HA, C.H.; BINH, L.T.; et al.; *Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles*, Int. Nano Lett., 2012, (2)9

- [14] PANÁČEK, A.; KOLÁŘ, M.; VEČEŘOVÁ, R.; PRUCEK, R.; SOUKUPOVÁ, J.; KRYŠTOF, V.; HAMAL, P.; ZBOŘIL, R.; KVÍTEK, L.; *Antifungal activity of silver nanoparticles against Candida spp*, Biomaterials, 2009, 30(31), p. 6333-40
- [15] KHANDELWAL, N.; KAUR, G.; et al.; *Application of silver nanoparticles in viral inhibition: A new hope for antivirals*, Dig. J. Nanomater. Biostruct., 2014, (9)1
- [16] LEE, G.; CHO, YS.; PARK, S.; et al.; *Synthesis and assembly of anisotropic nanoparticles*, Korean J. Chem. Eng., 2011, (28), 1641
- [17] WEI, L.; LU, J.; XU, H.; PATEL, A.; CHEN, ZS.; CHEN, G.; *Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications*. Drug. Discov. Today., 2015, 20(5), p. 595-601
- [18] AUSTIN, L.A.; MACKEY, M.A.; DREADEN, E.C.; EL-SAYED, M.A.; *The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery*, Arch, Toxicol., 2014, 88(7), p. 1391-1417
- [19] WANG, N.; HU, Y.; ZHANG, Z.; *Sustainable catalytic properties of silver nanoparticles supported montmorillonite for highly efficient recyclable reduction of methylene blue*, Appl. Clay Sci., 2017, (150), p. 47-55, ISSN 0169-1317
- [20] WANG, J.; LIU, J.; GUO, X.; et al.; *The formation and catalytic activity of silver nanoparticles in aqueous polyacrylate solutions*, Front. Chem. Sci. Eng., 2016, (10), 3, p. 432-439
- [21] AHMAD, I.; KAMAL, T.; KHAN, S.B.; et al.; *An efficient and easily retrievable dip catalyst based on silver nanoparticles/chitosan-coated cellulose filter paper*, Cellulose, 2016, (23)6, p. 3577-3588
- [22] 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)
- [23] WANG, L.; HU, C.; SHAO, L.; *The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future*, Int. J. Nanomedicine, 2017, (12), p. 1227–1249
- [24] <https://www.vscht.cz/popularizace/doktorandi-pisou/2018/nanocastice-stibra-ochrance-stavebnich-materialu?jazyk=cs> citováno dne 27. 3. 2019
- [25] TSUJI, T.; IRYO, K.; WATANABE, N.; TSUJI, M.; *Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: influence of laser wavelength on particle size*, Appl. Surf. Sci., 2002, (202), 1–2, p. 80-85, ISSN 0169-4332

- [26] ZHANG, X.F.; LIU, Z.G.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S.; *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches*, Int. J. Mol. Sci., 2016, 17, (9), 1534
- [27] SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y.; *Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities*, Adv. Colloid Interface Sci., 2009, 145, (1-2), 83-96
- [28] ZAAROUR, M.; ROZ, M.E.; DONG, B.; RETOUX, R.; AAD, R.; et al., *Photochemical preparation of silver nanoparticles supported on zeolite crystals*, Langmuir, 2014, (30), 21, p.6250-6256
- [29] DAS, V.L.; THOMAS, R.; VARGHESE, R.T.; et al.; *Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the Bacillus strain CS 11 isolated from industrialized area*, 3 Biotech, 2014, (4), 121
- [30] MOHAN, M.; BABU, G.; GUNASEKARAN, P.; *Production and structural characterization of crystalline silver nanoparticles from Bacillus cereus isolate*, Colloids Surf. B, 2009, 74, (1), p. 191-5
- [31] GE, L.; LI, Q.; WANG, M.; OUYANG, J.; LI, X.; XING, M.M.; *Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity*, Int. J. Nanomedicine, 2014, (9), p. 2399–2407
- [32] LU, S.; GAO, W.; GU, H.Y.; *Construction, application and biosafety of silver nanocrystalline chitosan wound dressing*, Burns, 2008, (34), 5, p. 623-628, ISSN 0305-4179
- [33] BURDUȘEL, A.C.; GHERASIM, O.; GRUMEZESCU, A.M.; MOGOANTĂ, L.; FICAI, A.; ANDRONESCU, E.; *Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview*, Nanomaterials (Basel), 2018, 8(9)
- [34] Andara, M., Agarwal, A., Scholvin, D., Gerhardt, R. A., Doraiswamy, A., Jin, C., ... Su, Y. Y.; *Hemocompatibility of diamondlike carbon-metal composite thin films*, Diamond and Related Materials, 2006, (15), 11-12, p. 1941-19448
- [35] LACKNER, P.; BEER, R.; BROESSNER, G. et al.; *Efficacy of Silver Nanoparticles-Impregnated ExternalVentricular Drain Catheters in Patients with Acute OcclusiveHydrocephalus*, Neurocrit. Care, 2008, (8), 360
- [36] CUI, Z.; WANG, B.; ZHONG, Z.; SUN, Y.; SUN, Q.; YANG, G.; BIAN, L.; *Impact of antibiotic- and silver-impregnated external ventricular drains on the risk of infections: A systematic review and meta-analysis*, Am. J. Infect. Control, 2015, 43,(7)

- [37] KATVA, S.; DAS, S.; MOTI, H.S.; JYOTI, A.; KAUSHIK, S.; *Antibacterial Synergy of Silver Nanoparticles with Gentamicin and Chloramphenicol against Enterococcus faecalis*, *Pharmacogn Mag.*, 2018, 13, (4), p. S828–S833
- [38] PANÁČEK, A.; KVÍTEK, L.; SMÉKALOVÁ, M.; VEČEŘOVÁ, R.; KOLÁŘ, M.; RÖDEROVÁ, M.; DYČKA, F.; ŠEBELA, M.; PRUCEK, R.; TOMANEC, O.; ZBOŘIL, R.; *Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it*, *Nat. Nanotechnol.*, 2018, 13, (1), p. 65-71
- [39] ZHANG, R.; LEE, P.; LUI, V.C.; CHEN, Y.; LIU, X.; LOK, C.N.; TO, M.; YEUNG, K.W.; WONG, K.K.; *Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model*, *Nanomedicine*, 2015, 11, (8), p. 1949-59
- [40] TASHKHOURIAN, J.; AKHOND, M.; HOOSHMAND, S.; ET AL.; *A nanosensor for determination of glucose based on silver nanoparticles as fluorescence probes*, *J. Iran. Chem. Soc.*, 2015, (12), p. 2023-2030
- [41] WANG, G.L.; ZHU, X.Y.; JIAO, H.J.; DONG, Y.M.; LI, Z.J.; *Ultrasensitive and dual functional colorimetric sensors for mercury (II) ions and hydrogen peroxide based on catalytic reduction property of silver nanoparticles*, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, (31), 1, p. 337-342, ISSN 0956-5663
- [42] PARK, H.W.; ALAM, S.M.; LEE, S.H.; KARIM, M.M.; WABAIIDUR, S.M.; KANG, M.; CHOI, J.H.; *Optical ascorbic acid sensor based on the fluorescence quenching of silver nanoparticles*, *Luminescence*, 2009, 24, (6), p. 367-71
- [43] HAYNES, C.; et al.; *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, *Anal. Chem.*, 2005, (77), 17, ISSN: 0003-270
- [44] KVÍTEK, L.; *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra, habilitační práce*, PřF UP Olomouc, Olomouc, 2008
- [45] LI, W.; YANYAN GUO, Y.; ZHANG, P.; *SERS-Active Silver Nanoparticles Prepared by a Simple and Green Method*, *J. Phys. Chem. C*, 2010, (114), 14, p. 6413-6417
- [46] NOVÁKOVÁ, T.; ŠVÁB, M.; ŠVÁBOVÁ, M.; *Využití nanočástic v dekontaminačních technologiích: současný stav*, *Chemické Listy*, 2009, 103, (1), p. 524 – 532
- [47] HAN, X.X; SCHMIDT, A.M.; MARTEN, G.; FISCHER, A.; WEIDINGER, I.M.; HILDEBRANDT, P.; *Magnetic Silver Hybrid Nanoparticles for Surface-Enhanced*

Resonance Raman Spectroscopic Detection and Decontamination of Small Toxic Molecules, ACS Nano, 2013, (7), 4, p. 3212-3220

- [48] FIŠAR, Z.; *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*, 1.LF UK, ISSN 1803-6619
- [49] ATKINS, P.; DE PAULA, J. *Fyzikální chemie*, VŠCHT Praha, Praha, 2013, ISBN 978-80-7080-830-6
- [50] LAKOWICZ, J.R.; *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed., 2006, New York: Springer, p. 954, ISBN 03-873-1278-1
- [51] <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSaWtB5Nq7DZyceTp4SD-kkRgJsikDoDrLG8A4BLcpjdq-doB-A> citováno dne 20. 4. 2019
- [52] <https://labguide.cz/wp-content/uploads/2015/01/Excita%C4%8Dn%C3%AD-a-emisn%C3%AD-p%C3%A1smo.jpg> citováno dne 20. 4. 2019
- [53] SPRING, K.R.; *Fluorescence Microscopy, Encyclopedia of Optical Engineering*, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2003
- [54] <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm> citováno dne 20. 4. 2019
- [55] KHALID, A.; TRAN, P.A.; NORELLO, R.; SIMPSON, D.A.; O'CONNOR, A.J.; TOMLJENOVIC-HANIC, S.; *Intrinsic fluorescence of selenium nanoparticles for cellular imaging applications*, Nanoscale, 2016, (8), p. 3376 -3385
- [56] YUAN, Q.; SU, CH.; CAO, Y.; WU, K.; XU, J.; YANG, S.; *Rhodamine loading and releasing behavior of hydrogen-bonded poly(vinylpyrrolidone)/poly(acrylic acid) film*, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp., 2014, (456), p. 153-159, ISSN 0927-7757
- [57] CHATTHAI KAEWTONG, SASTIYA KAMPAENGSRİ, BURAPOL SINGHANA, BUNCHA PULPOKA, *Highly selective detection of Au³⁺ using rhodamine-based modified polyacrylic acid (PAA)-coated ITO*, Dyes and Pigments, 2017, (141), p. 277-285, ISSN 0143-7208
- [58] DUFOUR, V.; STAHL, M.; BAYSSE, C.; *The antibacterial properties of isothiocyanates*, Microbiology, 2015, (161), p. 229-43
- [59] LI, Y.; HONG, M.; QIU, B.; LIN, Z.; CHEN, Y.; CAI, Z.; CHEN, G.; *Highly sensitive fluorescent immunosensor for detection of influenza virus based on Ag autocatalysis*, Biosens. Bioelectron., 2014, (54), p. 358-364, ISSN 0956-5663

- [60] HARIHARAN, P.S.; SIVASUBRAMANIAN, A.; ANTHONY, S.P.; *Off-on Fluorescent Sensor from On-off Sensor: Exploiting Silver Nanoparticles Influence on the Organic Fluorophore Fluorescence*, J. Fluoresc., 2014, (24), 2, p. 319-327
- [61] TANG, F.; WANG, CH.; LI, L.; *Controlled fabrication of fluorescent Au@PAA nanocomposites*, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp., 2016, (494), p. 95-100, ISSN 0927-7757
- [62] Ho, S.L.; Cha, H.; Taek Oh, I.; Jung, K.H.; Kim, M.; Lee, Y.J.; et al.; *Magnetic resonance imaging, gadolinium neutron capture therapy, and tumor cell detection using ultrasmall Gd₂O₃ nanoparticles coated with polyacrylic acid-rhodamine B as a multifunctional tumor theragnostic agent*, RSC Adv., 2018, (8), p. 12653-12665
- [63] CMIEL, V.; SKOPALIK, J.; POLAKOVA, K.; et al.; *Rhodamine bound maghemite as a long-term dual imaging nanoprobe of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells*, Eur. Biophys. J., 2017, (46), 5, p. 433-444
- [64] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/283924?lang=en®ion=CZ>
citováno dne 24. 4. 2019