

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA BIOFYZIKY

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Templátová syntéza a vlastnosti bimetalických Au-Fe nanoklastrů**



Vypracoval:

Studijní obor:

Vedoucí bakalářské práce:

Bc. Radek Ostruszka

Biofyzika

doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.

Olomouc 2020



## **Bibliografická identifikace**

*Jméno a příjmení autora:* Radek Ostruszka

*Název práce:* Templátová syntéza a vlastnosti bimetalických Au-Fe nanoklastrů

*Typ práce:* Experimentální

*Pracoviště:* Katedra biofyziky

*Vedoucí práce:* doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.

*Rok obhajoby práce:* 2020

*Abstrakt:*

Cílem této diplomové práce byla příprava Au-Fe nanoklastrů, proměření jejich charakteristických vlastností a jejich optimalizace pro budoucí využití coby kontrastní látky při fluorescenčním zobrazování a zobrazování magnetickou rezonancí. Zkoumán byl rovněž vliv dialýzy a vnějších faktorů na jejich optické vlastnosti a na strukturu hovězího sérového albuminu. Bylo zjištěno, že již po syntéze je procentuální zastoupení  $\alpha$ -helixu ve struktuře proteinu pouze okolo 16 % a že po dialýze není sekundární struktura proteinu pozměněna. Nicméně, v případě dialyzovaných vzorků je kvantový výtěžek vyšší a v excitačně-emisním spektru je patrný hypsochromní posun. Emisní spektrum Au-Fe nanoklastrů vykazuje existenci dvou maxim při 640 nm a 660 nm. S využitím Mössbauerovy spektroskopie bylo zjištěno, že železo se ve vzorcích nachází ve formě superparamagnetických nanočástic oxidu železitého. Z měření relaxometrie byly poté stanoveny hodnoty relaxivity pro vzorek AuFeCl<sub>2</sub> jako  $r_1 = 0,0037 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  a  $r_2 = 0,0372 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Zkoumáním vlivu teploty a iontového složení roztoku byl zjištěn kromě dvojnásobného nárůstu hodnoty hydrodynamického průměru také nárůst kvantového výtěžku vzorku AuFeCl<sub>2</sub> inkubovaného v PBS při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin na hodnotu  $\Phi = (5,13 \pm 0,11) \%$ . Proto doporučujeme před samotným zobrazováním nejdříve vzorky za těchto podmínek inkubovat.

*Klíčová slova:* bimetalické nanoklastry, Au-Fe nanoklastry, superparamagnetické nanočástice oxidu železitého, hovězí sérový albumin, rozpouštědlo, teplota, absorpční spektroskopie v UV/Vis oblasti, kinetika dohasínání fluorescence, fluorescenční spektroskopie, dynamický rozptyl světla, infračervená spektroskopie, cirkulární dichroismus, relaxometrie, Mössbauerova spektroskopie, zobrazování magnetickou rezonancí

*Počet stran:*

*Počet příloh:* 0

*Jazyk:* Český



## **Bibliographical identification**

*Author's first name and surname:* Radek Ostruszka

*Title of thesis:* Templated synthesis and properties of bimetallic Au-Fe nanoclusters

*Type of thesis:* Experimental

*Department:* Department of biophysics

*Supervisor:* doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.

*The year of defence:* 2020

*Abstract:*

The aim of this master thesis was to prepare Au-Fe nanoclusters, measurements of their characteristic properties, and their optimization for the future application as contrast agents in fluorescence imaging and magnetic resonance imaging. An investigation also was undertaken to explore the influence of dialysis and external factors on their optical properties and on the bovine serum albumin structure. The findings indicate that already after the synthesis there is about 16 % of the alpha-helix in the protein structure and no change observed in its secondary structure after the dialysis. However, in case of dialyzed samples the quantum yield is higher and a hypsochromic shift in the excitation-emission spectrum is noticeable. The emission spectra of Au-Fe nanoclusters demonstrates the existence of two maxima at 640 nm and 660 nm. Using Mössbauer spectroscopy we found that the iron in the samples exists only in the form of superparamagnetic iron (III) oxide nanoparticles. From the relaxometry measurements, the relaxivity values of the AuFeCl<sub>2</sub> sample were then determined as  $r_1 = 0,0037 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  and  $r_2 = 0,0372 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . The study of the effect of temperature and ionic composition of the solution reveals a two-fold increase in hydrodynamic diameter and provides a strong evidence that the quantum yield of the AuFeCl<sub>2</sub> sample, after being incubated in PBS at 37 °C for 24 hours, increases up to  $\Phi = (5,13 \pm 0,11) \%$ . Therefore, the incubation of the samples under these conditions before imaging can be recommended.

*Key words:* bimetallic nanoclusters, Au-Fe nanoclusters, superparamagnetic iron (III) oxide nanoparticles, bovine serum albumine, solvent, temperature, UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence decay kinetics, circular dichroism, fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering, infrared spectroscopy, relaxometry, Mössbauer spectroscopy, magnetic resonance imaging

*Number of pages:*

*Number of attachments:* 0

*Language:* Czech



Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením doc. RNDr. Karolíny Machalové Šiškové, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne.....





Rád bych tímto poděkoval vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Karolíně Machalové Šiškové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, odborné vedení a ochotu během řešení mé práce. Rovněž děkuji Mgr. Pavlíně Andráškové za spolupráci, pěkně strávený čas a za pomoc s experimentální částí práce. Dále děkuji Mgr. Petru Běčákovi za jeho rady a za příjemnou atmosféru v laboratoři. Následně bych rád poděkoval doc. RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D. za změření a vyhodnocení kinetiky dohasínání fluorescence, dále také RNDr. Tomáši Pluháčkovi, Ph.D. za změření a vyhodnocení hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, rovněž Mgr. Petru Novákovi, Ph.D. za změření a vyhodnocení mössbauerovských spekter a nakonec Ing. Martinu Vítovi a Ing. Danielovi Jirákovi, Ph.D. za změření a vyhodnocení relaxometrie a zobrazování magnetickou rezonancí. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Heleně Sedláčkové za její ochotu a čas strávený opravou mého abstraktu. V neposlední řadě chci rovněž poděkovat své rodině za psychickou a finanční podporu během celého mého studia.

Diplomová práce souvisí s řešením výzkumného projektu GAČR 19-03207S „Bimetalické a trimetalické fluorescenční nanoklastry: syntéza, fyzikálně-chemické vlastnosti a aplikace pro zobrazování biologických systémů“.



## SEZNAM ZKRATEK

ATR	úplný zeslabený odraz ( <i>attenuated total reflection</i> )
BSA	hovězí sérový albumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
CD	cirkulární dichroismus ( <i>circular dichroism</i> )
CNR	poměr kontrastu a šumu ( <i>contrast to noise ratio</i> )
diH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda ( <i>deionized water</i> )
DLS	dynamický rozptyl světla ( <i>dynamic light scattering</i> )
ECL	elektrochemiluminiscence ( <i>electrochemiluminescence</i> )
FI	fluorescenční zobrazování ( <i>fluorescence imaging</i> )
FR	fyzilogický roztok ( <i>saline solution</i> )
FRET	Försterův rezonanční přenos energie ( <i>Förster resonance energy transfer</i> )
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací ( <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> )
HSA	lidský sérový albumin ( <i>human serum albumine</i> )
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ( <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
IRF	funkce přístrojové odezvy ( <i>instrument response function</i> )
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí ( <i>magnetic resonance imaging</i> )
PAMAM	polyamidoamin ( <i>polyaminoamine</i> )
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PEI	polyethylenimin ( <i>polyethylenimine</i> )
PVP	poly(N-vinyl-2-pyrrolidon) ( <i>poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)</i> )
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin ( <i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i> )
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie ( <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> )



# OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Přehled problematiky.....	3
2.1	Kovové nanoklastry.....	3
2.1.1	Optické vlastnosti kovových nanoklastrů.....	4
2.2	Monometalické Au nanoklastry.....	6
2.2.1	Syntéza Au nanoklastrů.....	6
2.2.1.1	Chemická redukce.....	7
2.2.1.2	Fotoredukce.....	7
2.2.1.3	Bioredukce.....	8
2.2.1.4	Elektroredukce.....	8
2.2.1.5	Leptání.....	8
2.2.1.6	Urychlení syntézy pomocí mikrovlnného záření.....	9
2.2.2	Templátové molekuly.....	9
2.2.2.1	Hovězí sérový albumin (BSA).....	11
2.2.3	Využití Au nanoklastrů.....	13
2.2.3.1	Detekce kovových iontů.....	14
2.2.3.2	Detekce malých molekul.....	15
2.2.3.3	Detekce enzymů.....	15
2.2.3.4	Biologické značení a zobrazování.....	16
2.3	Bimetalické Au-Fe nanoklastry.....	17
2.3.1	Syntéza Au-Fe nanoklastrů.....	17
2.3.2	Využití Au-Fe nanoklastrů.....	18
2.4	Metody charakterizace.....	19
2.4.1	Absorpční spektrofotometrie v UV/Vis oblasti.....	19
2.4.2	Fluorescenční spektroskopie.....	19
2.4.3	Cirkulární dichroismus (CD).....	20
2.4.4	ATR-FTIR.....	20
2.4.5	Dynamický rozptyl světla (DLS).....	20
2.4.6	Mössbauerova spektroskopie.....	21
2.4.7	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).....	21
2.4.8	Relaxometrie.....	22
3	Cíl práce.....	23
4	Materiál a metody.....	24
4.1	Chemikálie.....	24
4.2	Syntéza Au-Fe nanoklastrů.....	24
4.3	Charakterizace nanoklastrů.....	25
4.3.1	UV-Vis spektra.....	25
4.3.2	Excitačně-emisní (3D) a emisní spektra, stanovení kvantového výtěžku.....	26

4.3.3	Kinetika dohasínání fluorescence.....	26
4.3.4	Cirkulární dichroismus .....	27
4.3.5	Infračervená spektra.....	27
4.3.6	Hydrodynamický průměr a zeta potenciál.....	27
4.3.7	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) .....	28
4.3.8	Mössbauerovská spektra.....	28
4.3.9	Měření relaxivity .....	28
5	Výsledky.....	30
5.1	Syntéza materiálu: pozorování a vliv dialýzy.....	30
5.2	Charakterizace materiálu.....	36
5.3	Externí faktory ovlivňující vlastnosti připravených vzorků .....	40
5.3.1	Vliv teploty .....	40
5.3.2	Vliv iontového složení roztoku.....	41
6	Diskuze.....	45
7	Závěr .....	51
8	Seznam použité literatury.....	52
9	Internetové zdroje.....	58

# 1 Úvod

Objemový kov, nanočástice a nanoklastry jsou všechny tvořeny z atomů určitého kovu, liší se ovšem jednou podstatnou skutečností, a to jejich velikostí, která výrazně ovlivňuje jejich fyzikální a chemické vlastnosti. Rozměrově nejmenší jsou kovové nanoklastry, které obsahují jen několik jednotek či desítek atomů kovu.

Monometalické nanoklastry mohou být připraveny pomocí dvou různých přístupů. V jednom případě se větší nanostruktury postupně leptají, dokud nevzniknou požadované nanoklastry. Druhá možnost spočívá v redukci zlatého prekursoru na atomy zlata v přítomnosti redukčního činidla následovanou buďto inkubací při určité teplotě, nebo aplikací mikrovlňného záření, což podstatně snižuje dobu syntézy. Takto připravené nanoklastry mají však sklon mezi sebou interagovat, což by způsobilo jejich agregaci, kvůli které by mohly přerůst do nanočástic, čímž by ztratily své fluorescenční vlastnosti. Z tohoto důvodu se kromě redukčního činidla užívá během syntézy ještě templátových molekul sloužících jako stabilizující činidla. Mezi takovéto molekuly patří různé proteiny, peptidy, polymery, DNA oligonukleotidy, dendrimery a molekuly obsahující thiolové skupiny. Naším templátem je hovězí sérový albumin, díky kterému jsou nanoklastry biokompatibilní a který slouží současně jako stabilizující a jako redukční činidlo. Jeho redukční schopnost je aktivována zásaditým pH.

Nanoklastry se mohou pyšnit bohatou sadou velmi užitečných vlastností, ke kterým patří například výborná fotostabilita, dlouhá doba života excitovaného stavu, velký Stokesův posun a závislost emisní vlnové délky maxima na velikosti kovového jádra, tedy na množství atomů tvořící nanoklastr. Kromě toho mohou být fluorescenční vlastnosti ovlivněny typem rozpouštědla, teplotou, pH okolního prostředí a dalšími vnějšími faktory. Díky výše vyjmenovaným charakteristikám se užívají k detekci kovových iontů (nejčastěji na principu zhášení intenzity fluorescence), aminokyselin, polypeptidů, proteinů, enzymů a malých organických molekul, ale také k biologickému zobrazování a značení. Rovněž se užívají ke katalýze různých chemických reakcí a také jako teplotní a pH senzory.

Bimetalické nanoklastry mohou být syntetizovány dvěma různými způsoby. Během první strategie se připraví zvlášť nanoklastry/nanočástice obou kovů, které jsou poté určitým způsobem modifikovány a spojovány prostřednictvím interakcí mezi těmito modifikovanými částmi. Další způsob spočívá v postupném smísení všech prekursorů bez předešlé modifikace. Bimetalické nanoklastry mohou být využity jednak jako sondy

pro multimodální zobrazování, jednak přidáním dalšího kovu mohou být vylepšeny dosavadní vlastnosti monometalických nanoklastrů (např. zvýšení katalytické aktivity).

V této práci se zabýváme bimetalickými Au-Fe nanoklastry. Tímto názvem ovšem nechceme naznačit, že se v našem systému nacházejí nanoklastry tvořené oběma kovy současně, ale že při syntéze užíváme dva různé kovy. Jak název napovídá, kromě zlata, obsahují i železo, jež zodpovídá za vlastnosti magnetické, které mohou být využity při zobrazování magnetickou rezonancí (MRI). Díky těmto kovům kombinujeme vysokou citlivost fluorescenčního zobrazování (FI) a schopnost MRI poskytovat trojrozměrné informace o měkkých tkáních s vysokým prostorovým rozlišením.



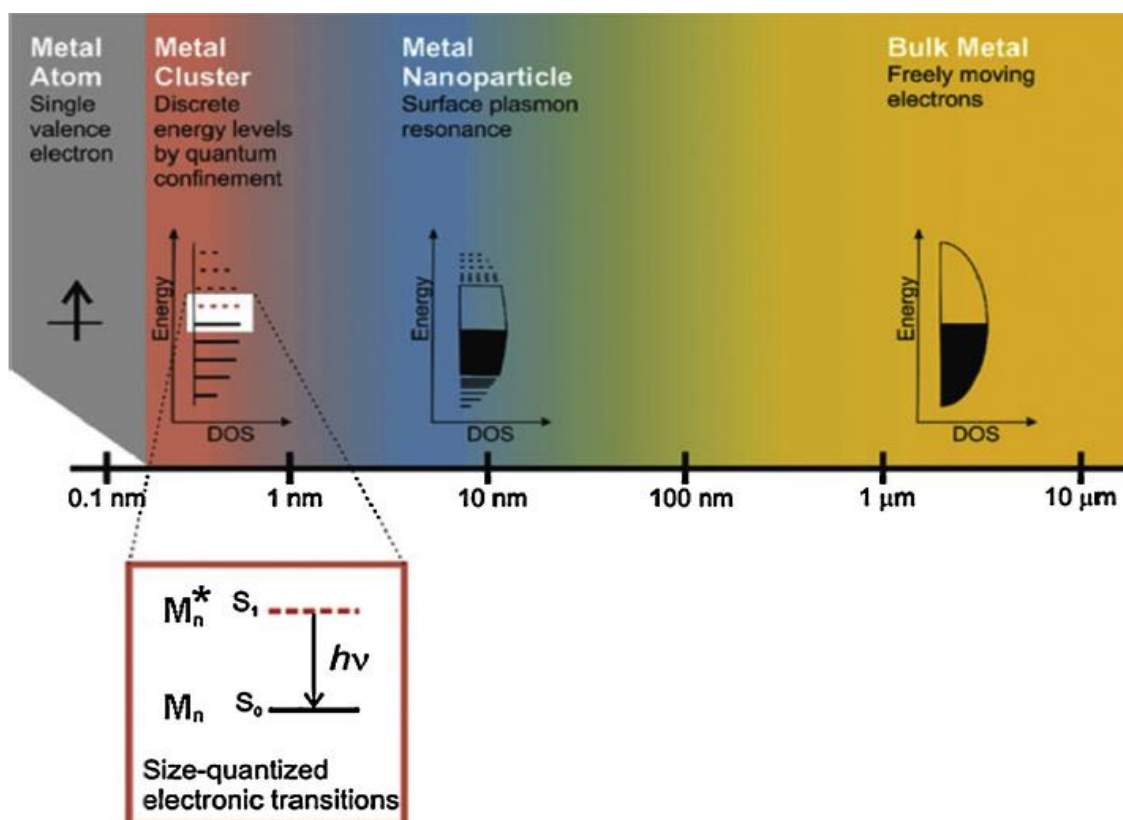
## 2 Přehled problematiky

### 2.1 Kovové nanoklastry

Fyzikální a chemické vlastnosti kovů výrazně závisejí na jejich velikosti, přičemž lze vyzorovat několikero viditelných přechodů (viz Obrázek 1). V případě kovů makroskopických velikostí je hustota stavů charakterizována existencí spjitých energetických pásů (hovoříme o tzv. pásové struktuře). Jednotlivé energetické pásy jsou výsledkem lineární kombinace obrovského množství energeticky velmi podobných atomových orbitalů stejné symetrie. Vodivostní pás se v případě kovů částečně překrývá s pásem valenčním, a je tedy z určité části obsazen elektrony. Takovéto elektrony jsou v rámci kovu volně pohyblivé a jsou zodpovědné za jejich dobrou elektrickou a tepelnou vodivost (Zhang a Wang 2014).

Je-li velikost kovové částice srovnatelná nebo menší než je střední volná dráha vodivostních elektronů, pohyb elektronů začíná být omezen její velikostí a k interakcím dochází především s povrchem částice. Dostáváme se do oblasti kovových nanočástic, které vykazují efekt povrchové plazmonové rezonance, kdy jsou optické vlastnosti dány kolektivními oscilacemi vodivostních elektronů způsobenými interakcemi elektronů s elektromagnetickým zářením. Kovové nanočástice sice světlo silně absorbují, avšak nevykazují žádnou nebo vykazují pouze slabou fluorescenci (Díez a Ras 2010, Zhang a Wang 2014).

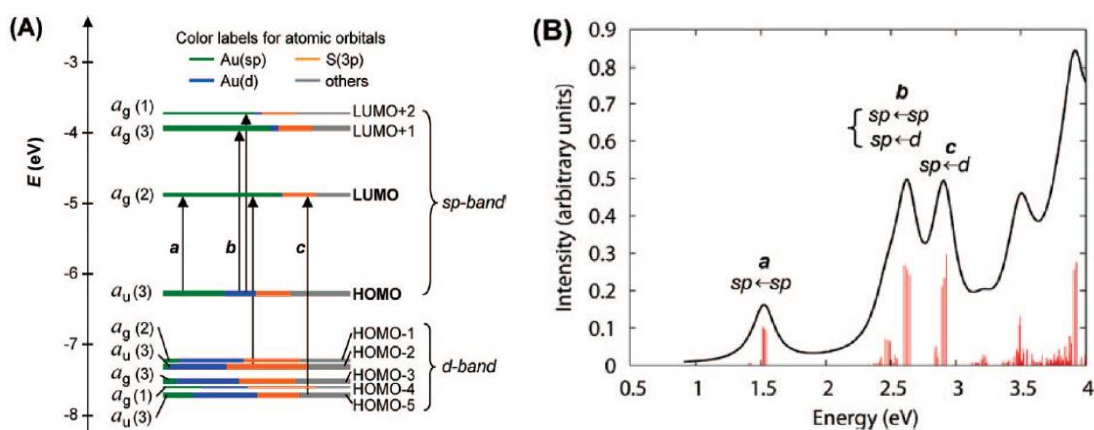
Je-li velikost kovové částice srovnatelná s Fermiho vlnovou délkou elektronu (tj. de Broglieho vlnová délka elektronu na Fermiho hladině), dostáváme se do oblasti kovových nanoklastrů, jejichž optické, elektrické a chemické vlastnosti se výrazně liší jak od objemového kovu, tak od nanočástic. Protože nanoklastry obsahují jen několik jednotek či desítek atomů kovu, jejich hustota stavů je tvořena víceméně diskretními energetickými hladinami. Nanoklastry mají tedy průměr do 2 nm, nevykazují již efekt povrchové plazmonové rezonance a nejsou vodiči. Interakce se světlem je však stále možná, a to prostřednictvím elektronových přechodů mezi energetickými hladinami (Díez a Ras 2010, Shang a kol. 2019, Zheng a kol. 2007).



**Obrázek 1:** Jednotlivé přechody kovu v závislosti na jeho velikosti. Kovové nanoklastry jsou mostem mezi jednotlivými atomy a kovovými nanočásticemi. Jsou tvořeny víceméně diskrétními energetickými hladinami, mezi kterými může docházet k elektronovým přechodům. DOS (density of states) = hustota stavů. Převzato ze Zhang a Wang (2014).

### 2.1.1 Optické vlastnosti kovových nanoklastrů

Díky existenci diskrétně rozložených energetických hladin mohou nanoklastry absorbovat energii elektromagnetického záření (Zhang a Wang 2014). Negishi a kol. (2005) zjistili, že se snižující se velikostí zlatých nanoklastrů se zvyšuje vzdálenost mezi energetickými hladinami, což vede k hypsochromnímu posunu absorpčních píků. Zhu a kol. (2008) porovnali absorpční spektrum zlatých nanoklastrů stabilizovaných glutationem se spektrem teoretickým, přičemž na základě Kohn-Shamova diagramu (viz Obrázek 2) přisoudili charakteristické absorpční píky v rozsahu 400 – 700 nm přechodům mezi hladinami sp pásu (vnitropásový přechod) a mezi hladinami sp a d pásu (mezipásový přechod).



**Obrázek 2:** (A) Kohn-Shamův diagram energetických hladin pro modelovou sloučeninu  $Au_{25}(SH)_{18}^-$ . Barevné označení každého molekulového orbitalu naznačuje relativní příspěvek atomových orbitalů Au (6sp) (zeleně), Au (5d) (modře), S (3p) (oranžově) a ostatních komponent (šedě). Nalevo je uvedena symetrie (g, u) a stupeň degenerace (číslo v závorce) daného molekulového orbitalu. HOMO (highest occupied molecular orbital) = nejvyšší obsazený molekulový orbital, LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) = nejnižší neobsazený molekulový orbital. (B) Teoretické absorpční spektrum  $Au_{25}(SH)_{18}^-$ . Převzato ze Zhu a kol. (2008).

Dvoufotonová absorpce patří mezi nelineární optické jevy a jejím principem je současná absorpce dvou fotonů, jejichž energie umožňuje vyvolat přechod molekuly do excitovaného stavu. Absorpce dvou fotonů s nižší energií je výhodná, protože se tím snižuje poškození biologického vzorku během jeho zobrazování. Navíc, v porovnání s ultrafialovým a viditelným zářením je blízké infračervené záření biologickými vzorky méně rozptylováno a absorbováno, což fotonu umožňuje proniknout hlouběji do vzorku, díky čemuž je možné zobrazovat vzorky o větší tloušťce. Stejný osud čeká však i foton, jenž je emitován fluoroforem (Frangioni 2003, So a kol. 2000).

Další významnou vlastností kovových nanoklustrů je luminiscence, za kterou jsou zodpovědné dva různé mechanismy. Prvním je vnitřní kvantový jev kovového jádra, kdy je luminiscence připisována zářivému přechodu mezi hladinami sp pásu a mezi hladinami sp a d pásu. Druhým činitelem jsou chemické interakce mezi kovovým jádrem a ligandy nacházejícími se na povrchu nanoklustrů (Link a kol. 2002, Shang a kol. 2011b), jejichž vliv na fluorescenci studovali Wu a Jin (2010). Raut a kol. (2014) uvádějí, že dalším zdrojem fluorescence nanoklustrů stabilizovaných BSA a HSA je částečný přenos energie z tryptofanových residuí na zlaté nanoklustry prostřednictvím Försterova rezonančního přenosu energie.

Stejně jako v případě absorpce je také emise závislá na velikosti kovového jádra, což na dendrimerem stabilizovaných nanoklustrech demonstroval Zheng a kol. (2004).

Na fluorescenční vlastnosti nanoklastrů má rovněž vliv rozpouštědlo (Díez a kol. 2009, Zhou a kol. 2009), teplota, pH okolního prostředí a přítomnost denaturačních a zhášecích činidel (Chib a kol. 2015). Toho bylo využito k tvorbě různých teplotních a pH sond pro biologické zobrazování (Shang a kol. 2013, Wu a kol. 2016). Nanoklastry se také mohou pyšnit dobrou fotostabilitou, velkým Stokesovým posunem (více než 100 nm) a dlouhou dobou života excitovaného stavu, čehož se při zobrazování využívá k eliminaci autofluorescence biologických tkání (Shang a kol. 2011b, Zhang a Wang 2014). Jejich doba života může dosahovat několik stovek ns (Shang a kol. 2011a, Shang a kol. 2013), nebo dokonce až několik desítek  $\mu$ s (Adhikari a Banerjee 2010).

Zajímavým jevem je rovněž elektrochemiluminiscence (ECL), která se díky své vysoké citlivosti, nízkému šumu pozadí a dalším výhodám využívá v analytické chemii (Fang a kol. 2011). ECL spočívá v tvorbě vysoce reaktivního meziprojektu na povrchu elektrody, který je schopen převést nanoklastry do excitovaného stavu (Zhang a Wang 2014). ECL kovových nanoklastrů byla poprvé demonstrována Díez a kol. (2009).

## **2.2 Monometalické Au nanoklastry**

Zlaté nanoklastry byly poprvé připraveny Naldini a kol. (1966), kdy jako ligand použili organofosforovou sloučeninu 1,2-bis(difenyfosfino)ethan, přičemž s využitím stechiometrie předpokládali, že výsledný komplex obsahuje 6 atomů zlata. Krystalická struktura takovýchto sloučenin byla zkoumána až v roce 1969 pomocí rentgenové krystalografie, kterou provedli McPartlin a kol. (1969). S postupem času bylo k přípravě nanoklastrů použito mnoho různých variací, které se liší například užitým redukčním činidlem, templátovou molekulou či vnějšími podmínkami během syntézy, a to vše za účelem vylepšení jejich fyzikálních a chemických vlastností.

### **2.2.1 Syntéza Au nanoklastrů**

Fluorescenční zlaté nanoklastry mohou být připravovány pomocí dvou strategií. V prvním případě jsou ionty zlata nejprve redukovány. Poté následuje tvorba nanoklastrů prostřednictvím nukleace atomů zlata (Zheng a kol. 2017). Redukce může být optická, biologická, chemická a také elektrochemická. Takto připravené nanoklastry mají však tendenci mezi sebou interagovat, čímž dochází k jejich agregaci, kvůli které pak mohou přerůst až do nanočástic. Pro přípravu stabilních nanoklastrů je tudíž nezbytné použít

nějakou stabilizující molekulu (Yang a kol. 2020). Druhý způsob spočívá v postupném leptání větší nanostruktury, dokud nevzniknou malé zlaté nanoklastry (Zheng a kol. 2017).

### **2.2.1.1 Chemická redukce**

Nanoklastry se běžně připravují redukcí zlatého prekurzoru, kterým obvykle bývá kyselina tetrachlorozlatitá ( $\text{HAuCl}_4$ ), na zlaté atomy v přítomnosti stabilizujícího a redukčního činidla (Zheng a kol. 2017). Stabilizující molekuly zahrnují různé proteiny, peptidy, DNA oligonukleotidy, dendrimery, polymery a malé molekuly obsahující thiolové skupiny. K redukčním činidlům můžeme zařadit tetrahydridoboritan sodný, tetrakis(hydroxymethyl)fosfonium chlorid, komplex boranu s dimethylaminem, kyselinu askorbovou, citrát a L-3,4-dihydroxyfenylalanin (Chen a kol. 2018, Sun a Jin 2014). Některé molekuly mohou díky svým chemickým vlastnostem sloužit současně jako stabilizující i jako redukční činidla. Příkladem budiž hovězí sérový albumin, glutation či 11-merkaptoundekanová kyselina (Sun a Jin 2014).

### **2.2.1.2 Fotoredukce**

Na rozdíl od chemické redukce tento přístup nevyžaduje užití žádného redukčního činidla. Zhang a kol. (2012) připravili malé fluorescenční nanoklastry zlata (také mědi a stříbra) s kvantovým výtěžkem 5,3 % působením ultrafialového záření na roztok anorganického prekurzoru v přítomnosti polymeru, přičemž nejvyšší intenzity fluorescence dosáhli, když UV záření aplikovali po dobu 240 minut. Nanoklastry vykazovaly maximum emise okolo 610 nm a v přítomnosti iontů, které se hojně vyskytují v lidském těle (např.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), nebyla jejich fluorescence ovlivněna, což umožňuje jejich využití jako fluorescenční značky. Navíc při změně poměru molárních koncentrací iontů zlata a polymeru lze upravit jejich velikost a fluorescenční vlastnosti.

Také Li a kol. (2013) využili ke své syntéze fotoredukci a polymer. Připravené nanoklastry emitují v modré oblasti spektra (s maximálním kvantovým výtěžkem okolo 20, 1 %) a mají potenciál v oblasti optoelektroniky.

### 2.2.1.3 Bioredukce

Wang a kol. (2013b) publikovali nový způsob syntézy zlatých nanoklastrů, pomocí kterých realizovali *in vivo* fluorescenční zobrazování nádorových buněk transplantovaných do myši. K redukci zlatitých iontů a tvorbě nanoklastrů dochází přímo v cytoplazmě těchto buněk. Předpokládají, že tato syntéza souvisí s procesem biomineralizace, během kterého dochází k redukci anorganických iontů následovanou obalením funkčními biomolekulami a tvorbou nanominerálů. Vzniklé nanoklastry měly stejné fluorescenční vlastnosti jako chemicky připravené zlaté nanoklastry a i po třech dnech byla fluorescence stále pozorovatelná. Zajímavé a současně velmi užitečné je to, že k syntéze nanoklastrů docházelo pouze uvnitř nádorových buněk, žádná tvorba nebyla pozorována ve zdravých embryonálních buňkách. Z toho vyplývá, že tento mechanismus musí souviset se specifickými biochemickými vlastnostmi nádorových buněk, kterými se odlišují od těch zdravých.

### 2.2.1.4 Elektroredukce

Velmi malé zlaté nanoklastry tvořené pouze dvěma a třemi atomy zlata připravili González a kol. (2010) prostřednictvím elektrochemické redukce, která je jednoduchá, reprodukovatelná a umožňuje dobrou kontrolu nad jejich velikostí. Jejich elektrolytická soustava byla tvořena anodou ze zlata, katodou z mědi a elektrolytem, kterým byl PVP neboli poly(N-vinyl-2-pyrrolidon) rozpuštěný v acetonitrilu. PVP je biokompatibilní homopolymer sloužící ke stabilizaci nanoklastrů. Během galvanostatické elektrolýzy dochází k rozpouštění zlaté elektrody, ionty jsou tak uvolňovány do elektrolytu a tvoří komplex s PVP. Elektroredukci těchto komplexů vznikají podél řetězce atomy zlata, díky čemuž se mohou tvořit nanoklastry. Ty vykazují velmi stabilní fotoluminiscenci, žádné změny optických vlastností nebyly pozorovány po více než dvou letech od jejich přípravy a ani po vystavení silnému oxidačnímu ( $H_2O_2$ ) či redukčnímu činidlu ( $NaBH_4$ ). Navíc nanoklastry tvořené třemi atomy zlata mají paramagnetické chování. Velikost klastrů lze ovlivňovat teplotou a dobou syntézy.

### 2.2.1.5 Leptání

Fluorescenční nanoklastry lze rovněž obdržet leptáním velkých nanostruktur vhodně zvoleným činidlem. Mezi zmíněné nanostruktury mohou patřit například zlaté

nanokrystaly o průměru 8 nm, jež Duan a kol. (2007) leptali pomocí polyethyleniminu (PEI) za vzniku nanoklastrů obsahujících 8 atomů zlata, nanočástice, jejichž leptáním Habeeb Muhammed a kol. (2008) získali nanoklastry dvou velikostí v závislosti na pH roztoku, a případně i samotné nanoklastry, jejichž leptáním Habeeb Muhammed a kol. (2009) obdrželi nanoklastry nejen o menším, ale dokonce i větším počtu atomů zlata než měly ty původní.

### **2.2.1.6 Urychlení syntézy pomocí mikrovlnného záření**

Mikrovlnné záření je od roku 1986 užíváno díky jeho schopnosti urychlovat chemické reakce (polymerace, organické a anorganické syntézy, oxidace a redukce). Mnoho studií se také soustředilo na vylepšení vlastností nanomateriálů prostřednictvím mikrovlnného ozařování. Bylo zjištěno, že jeho užitím lze podstatně zkrátit reakční dobu a že výsledné produkty jsou uniformnější, co se týče velikosti a složení (Yan a kol. 2012). K syntéze fluorescenčních zlatých nanoklastrů bylo mikrovlnné záření poprvé použito Yan a kol. (2012). Získali nanoklastry s vysokým kvantovým výtěžkem, které emitují v červené oblasti spektra. Velkou výhodou jejich postupu však bylo zkrácení doby syntézy na několik minut. Především postup, jenž byl uveden Xie a kol. (2009), trval 12 hodin, během kterých byl vzorek inkubován při teplotě 37 °C.

### **2.2.2 Templátové molekuly**

Díky existenci silných interakcí mezi Au a S byly jako první k syntéze zlatých nanoklastrů použity malé molekuly obsahující thiolové skupiny (Zhang a Wang 2014). Příkladem budiž antioxidant glutation, jenž Yu a kol. (2013) užili k syntéze nanoklastrů různých velikostí. Jeho smísením se zlatými ionty vznikají komplexy, které jsou poté redukovány oxidem uhelnatým, jehož redukční schopnost silně závisí na pH roztoku, přičemž zásaditější pH vede k tvorbě nanoklastrů větších velikostí.

Dendrimery jsou polymery s pravidelnou rozvětvenou strukturou a velmi dobře definovatelnou molekulovou hmotností a chemickým složením (Lee a kol. 2005). Změnou poměru molární koncentrace kovu a dendrimery Zheng a kol. (2004) jako první připravili polyamidoaminem (PAMAM) stabilizované nanoklastry emitující v oblasti od ultrafialové až po infračervenou. Zjistili, že s rostoucí velikostí nanoklastrů dochází k bathochromnímu posunu a také k poklesu kvantového výtěžku. Bao a kol. (2007) syntetizovali nanoklastry emitující v modré, zelené a červené oblasti. V prvním případě

inkubací roztoku zlata a dendrimeru při 37 °C, v tom druhém a třetím jeho inkubací při stejné teplotě, navíc však v přítomnosti kyseliny askorbové jako redukčního činidla. Zvýšením koncentrace zlata došlo k navýšení intenzity fluorescence beze změny emisní vlnové délky maxima. Kromě dendrimerů byly při syntéze uplatněny i jiné polymery, jako třeba kyselina polymethakrylová (Schaeffer a kol. 2008) nebo polyakrylová (Chen a kol. 2014). Velikost nanoklastru je dána strukturou polymeru, vlastnostmi funkčních skupin a poměrem molární koncentrace zlata a polymeru (Schaeffer a kol. 2008).

Různé struktury DNA jsou také užívány jako templátové molekuly, především díky dobré biokompatibilitě a obrovskému množství odlišných sekvencí. Kennedy a kol. (2012) přichystali modře emitující zlaté nanoklastry v přítomnosti polycytosinové DNA při kyselém pH a polyadeninové DNA při neutrálním pH užitím citrátu jako redukčního činidla. Další používanou strukturou je vlásenková DNA. Emisní chování nanoklastrů závisí na sekvenci její smyčky, přičemž nejefektivnější je smyčka tvořená cytosiny. Jako templát může sloužit též jak jednořetězcová DNA, tak dvouřetězcová DNA, která je však méně efektivní než odpovídající smyčka či jednořetězcová DNA. Jednotlivé nukleotidy lze též s úspěchem využít coby templáty (Liu a kol. 2013, Jiang a kol. 2014).

Ke stabilizaci nanoklastrů se rovněž uplatňují i peptidy. Jejich aminokyselinová sekvence a délka ovlivňuje fyzikální a chemické vlastnosti nanoklastrů (Zhang a kol. 2019). Wang a kol. (2012) vytvořili bifunkční peptid tvořený dvěma doménami. Sekvence první domény slouží k redukci a tvorbě zlatých nanoklastrů, kdežto druhá obsahuje klasickou signální sekvenci pro jadernou lokalizaci. Specifitu signální sekvence prokazovali pomocí třech různých buněčných linií, přičemž ve všech třech případech byly zlaté nanoklastry kompletně lokalizovány v jádře.

Prvotní syntézu zlatých nanoklastrů stabilizovaných proteinem provedli Xie a kol. (2009). Použili BSA, který je biokompatibilní a slouží současně jako stabilizující a redukční činidlo. Výsledné nanoklastry jsou stabilní, složené z 25 atomů zlata, emitují v červené oblasti spektra (maximum při 640 nm) a mají kvantový výtěžek okolo 6 %. Následně byly aplikovány i jiné proteiny, kupříkladu inzulin (Liu a kol. 2011) či pepsin (Kawasaki a kol. 2011).

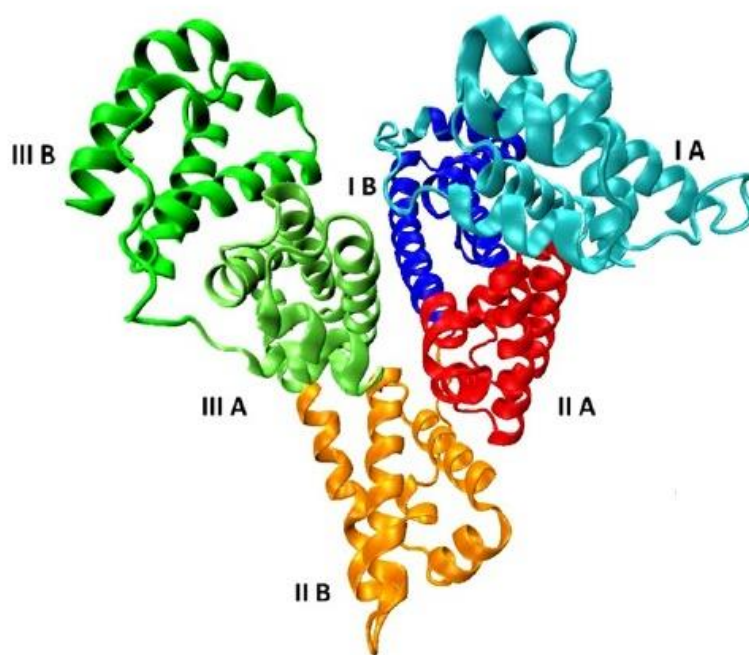
Jelikož při mých syntézách užívám jako templát pouze BSA, bude další kapitola věnována jeho detailnějšímu popisu.



### 2.2.2.1 Hovězí sérový albumin (BSA)

Hovězí sérový albumin řadíme mezi albuminy, což je skupina globulárních, ve vodě rozpustných proteinů. Díky své dostupnosti a strukturní podobnosti s lidským sérovým albuminem (HSA, přibližně 76% shoda) je běžně užíván jako modelový protein v laboratorní praxi a často slouží jako templátová molekula při syntéze zlatých nanoklastrů (Andrýsková a kol. 2020, Tankovskaia a kol. 2018). Jde o nejhojněji zastoupený protein v oběhovém systému obratlovců a představuje okolo 60 % všech proteinů krevní plazmy. Jakožto nejdůležitější transportní protein v krvi se podílí na přenosu látek exogenního i endogenního původu, zejména mastných kyselin, steroidních hormonů, léků a kovových iontů. Také se podílí na udržování koloidně-osmotického tlaku krevní plazmy, na udržování pH krve, dále na zhášení volných radikálů a na inhibici agregace krevních destiček (Chi a kol. 2018, Curry 2004).

Skládá se z 583 aminokyselinových residuí a jeho molekulární hmotnost dosahuje 66,4 kDa. Terciární struktura sestává ze tří homologních domén (I, II a III), které jsou dále rozděleny na subdoménu A a B (viz Obrázek 3). Sekundární struktura je převážně  $\alpha$ -helikální. Každá doména je složena z 10  $\alpha$ -helixů, zbývající polypeptidové řetězce tvoří očky a regiony mezi subdoménami. Ve struktuře BSA se nacházejí pouze 2 tryptofanová residua (na pozicích 134 a 212). Dále také obsahuje 35 cysteinových residuí, přičemž 34 z nich tvoří 17 disulfidických můstků, které přispívají k tepelné stabilitě proteinu. Zbývající volná thiolová (-SH) skupina Cys34 je zodpovědná za tvorbu kovalentně vázaného dimeru (Andrýsková a kol. 2020, Cao a kol. 2013, Curry 2004).



**Obrázek 3:** *Struktura BSA. Každá z 6 subdomén je zvýrazněna jinou barvou. Převzato z Oliva a kol. (2020).*

Konformace BSA je závislá na aktuální hodnotě pH okolního prostředí, přičemž existuje pět různých forem (viz Tabulka 1). V rozmezí pH od 4,3 do 8 má protein svou nativní podobu, jež připomíná tvar srdce (Cao a kol. 2013, Russel a kol. 2015).

**Tabulka 1:** *Konformační formy BSA v závislosti na hodnotě pH.*

	pH < 2,7	2,7 < pH < 4,3	4,3 < pH < 8	8 < pH < 10	pH > 10
forma	Expanded	Fast migrating	Normal	Basic	Aged
zkratka	E	F	N	B	A

Le Guével a kol. (2011) studovali zlaté nanoklastry stabilizované BSA. S využitím rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) potvrdili existenci kovalentní vazby mezi zlatem a sírou, z čehož vyplývá, že nanoklastry by se mohly nacházet v blízkosti cysteinů. Dixon a Egusa (2018) zkoumali přítomnost vícera specifických vazebných míst pro zlatité ionty v BSA. Uvádějí, že pro vznik zlatých nanoklastrů emitujících v červené oblasti spektra jsou nezbytné disulfidické můstky cysteinových reziduí, které ale musejí být iontům přístupné. Russel a kol. (2015) vypočítali, že hlavní oblasti, ve kterých může dojít k tvorbě nanoklastrů obsahujících více než 12 atomů zlata, jsou domény IIB a IA. Kromě výše zmíněných reziduí Dixon a Egusa (2018) dále uvedli, že Cys34 a N-konec BSA nazývaný jako Asp fragment (Asp1-Thr2-

His3) mohou také sloužit jako vazebná místa zlatitých iontů. Nanoklastry vznikající v těchto místech však neemitují v červené oblasti spektra.

Přestože přesná místa, kde by mohlo docházet k tvorbě nanoklastrů, jsou zatím neznámá, předpokládá se, že po přidání zlatitých iontů do roztoku BSA dochází k jejich interakcím s cysteinovými residui za vzniku kovalentních Au-S vazeb. Zvýšením pH přibližně na 12 je následně aktivována redukční schopnost BSA, přičemž je známo, že aminokyseliny tyrosin a tryptofan jsou schopny redukovat zlatité ionty Au<sup>III</sup> na atomy zlata Au<sup>0</sup>, což je příčinou formování nanoklastrů, případně nanočástic (Andrýsková a kol. 2020, Xie a kol. 2009).

Xie a kol. (2009) a později i Le Guével a kol. (2011) došli z výsledků XPS k závěru, že nanoklastry nejsou tvořeny pouze zlatem v oxidačním stavu 0, ale že se na jejich povrchu nachází zlato v oxidačním stavu I, které napomáhá nanoklastry stabilizovat. Le Guével a kol. (2011) navíc uvádějí, že Au<sup>I</sup> se vyskytuje pouze u větších nanoklastrů.

UV-Vis spektrum BSA vykazuje v ultrafialové oblasti dva charakteristické pásy, přičemž první se nachází okolo 220 nm a odpovídá  $\alpha$ -helikální struktuře proteinu. Další se vyskytuje okolo 280 nm a odpovídá aromatickým aminokyselinovým residuím. BSA má také fluorescenční vlastnosti, přičemž za jeho emisní chování jsou zodpovědné tři aminokyseliny obsažené v jeho struktuře, ke kterým patří aromatické aminokyseliny tryptofan, tyrosin a fenylalanin. Poměr jejich intenzit fluorescence je 100:9:0,5. Lze tedy usoudit, že na fluorescenci BSA se podílí hlavně tryptofan (Topalá a kol. 2014). Ve spektru cirkulárního dichroismu je přítomen jeden kladný absorpční pík při 190 nm a dva negativní píky při 208 nm a 222 nm, které jsou charakteristické pro  $\alpha$ -helix (Andrýsková a kol. 2020).

### 2.2.3 Využití Au nanoklastrů

Díky svým výhodným vlastnostem jsou zlaté nanoklastry využívány k detekci kovových iontů, polypeptidů, aminokyselin, proteinů, enzymů a malých organických molekul, ale také k biologickému zobrazování a značení (Zhang a kol. 2019) a rovněž ke katalýze oxidací, hydrogenací, spřažených reakcí a k elektrokatalýze (Nasaruddin a kol. 2018). Využívány jsou i jako teplotní a pH senzory (Shang a kol. 2013, Wu a kol. 2016). V následujících kapitolách si však uvedeme pouze některé příklady.

### 2.2.3.1 Detekce kovových iontů

Stříbrné ionty ( $\text{Ag}^+$ ) jsou pro mnohé bakterie, houby, viry a řasy vysoce toxické. Díky jejich antibakteriálním účinkům se využívají v mnoha oblastech hygieny. Avšak, je-li koncentrace těchto iontů dostatečně vysoká, mohou být škodlivé jak pro zdraví lidí, tak životnímu prostředí (Li a kol. 2009). S využitím mikrovlnného záření Yue a kol. (2012) vytvořili BSA stabilizované zlaté nanoklastry s detekčním limitem 100 nM a s vysokou selektivitou vůči  $\text{Ag}^+$  oproti běžně se vyskytujícím iontům ve vodě. V přítomnosti  $\text{Ag}^+$  dochází k hypsochromnímu posunu a k současnému, přibližně trojnásobnému, navýšení intenzity fluorescence.

Arsen je velice toxický a může způsobit například kožní léze (Roy a kol. 2012). Roy a kol. (2012) navrhli fluorescenční senzory pro detekci arsenitých iontů ( $\text{As}^{3+}$ ) s detekčním limitem 53,7 nM a s vysokou selektivitou oproti mnoha dvojmocným a trojmocným iontům. Přidáním  $\text{As}^{3+}$  dojde k výraznému zvýšení intenzity fluorescence zlatých nanoklastrů.

Ve vodném prostředí existuje chrom převážně ve dvou oxidačních stavech, a to jako chromitý ( $\text{Cr}^{3+}$ ) nebo chromový ( $\text{Cr}^{6+}$ ) iont. Chromové ionty jsou mnohonásobně toxičtější a jsou považovány za lidský karcinogen (Zhang a kol. 2013). Metodu jejich selektivní detekce ve vodě vynalezli Zhang a kol. (2013) a je založená na pH závislém zhášení fluorescence glutationem stabilizovaných zlatých nanoklastrů. Detekční limit pro chromité ionty je 2,5  $\mu\text{g/l}$  a pro ionty chromové je roven 0,5  $\mu\text{g/l}$ .

Měď hraje klíčovou roli v biosyntéze a metabolismu živých systémů, kde existuje především jako měďnatý ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iont. Vysoké koncentrace jsou toxické a mohou způsobit vážná onemocnění (Luo a kol. 2018). Luo a kol. (2018) prezentovali BSA stabilizované zlaté nanoklastry emitující v blízké infračervené oblasti. Detekce je založená na zhášení fluorescence a umožňuje detekci s limitem 330 pM.

Rtuťnatý iont ( $\text{Hg}^{2+}$ ) je vysoce toxický, i v malých koncentracích může způsobit poškození mozku, srdce, ledvin, žaludku a střev (Lin a Tseng 2010). Xie a kol. (2010) představili BSA stabilizované nanoklastry, které jsou pozoruhodně selektivní vůči  $\text{Hg}^{2+}$ . Mechanismus detekce je založen na vysoké afinitě  $\text{Hg}^{2+}$  k  $\text{Au}^+$ , kdy jejich interakcí dochází k téměř 100% zhášení fluorescence. Detekční limit byl stanoven na 500 pM. Shang a kol. (2012) úspěšně demonstrovali metodu detekce  $\text{Hg}^{2+}$  uvnitř HeLa buněk.

### 2.2.3.2 Detekce malých molekul

Askorbová kyselina je esenciální antioxidant hrající podstatnou roli v udržování rovnováhy oxidativního stresu v organismu (Wang a kol. 2013a). K její detekci Wang a kol. (2013a) připravili BSA stabilizované zlaté nanoklastry mající detekční limit 200 nM. Pomocí XPS zjistili, že kyselina askorbová po jejím přidání redukuje  $\text{Au}^{\text{I}}$  na povrchu nanoklastrů, což vede k výraznému snížení intenzity fluorescence.

Dalším významným antioxidantem je glutation, jehož detekci v živých buňkách a ve vzorcích lidské krve provedli Tian a kol. (2012). Po přidání  $\text{Hg}^{2+}$  došlo k téměř kompletnímu zhášení fluorescence zlatých nanoklastrů, avšak když do roztoku přidali glutation, intenzita fluorescence narostla více než dvacetinásobně, a to v důsledku větší afinity  $\text{Hg}^{2+}$  ke glutationu než k  $\text{Au}^+$ . Detekční limit byl stanoven na 7 nM.

Dopamin patří mezi neurotransmitery a hraje důležitou roli ve funkci centrálního nervového, hormonálního a kardiovaskulárního systému. Jeho abnormální koncentrace v mozku může vyústit v závažná onemocnění (Tao a kol. 2013). Tao a kol. (2013) využili výrazného poklesu intenzity fluorescence BSA stabilizovaných nanoklastrů po přidání dopaminu. Zhášení je důsledkem toku elektronů z elektrostaticky navázaného dopaminu na zlaté nanoklastry. Kromě tohoto způsobu navrhli také metodu kolorimetrickou, jež spočívá v inhibici enzymatické aktivity nanoklastrů v přítomnosti dopaminu. V obou případech je detekční limit 10 nM.

Jin a kol. (2011) publikovali metodu pro selektivní detekci glukózy ve vzorcích krve s detekčním limitem 5  $\mu\text{M}$ . Ke stanovení její koncentrace byly využity nanoklastry zlata stabilizované BSA a enzym glukóza-oxidáza. Produktem oxidace glukózy je mimo jiné peroxid vodíku, jenž degraduje nanoklastry, což vede k poklesu intenzity jejich fluorescence. Na stejném principu sestrojili Chen a Baker (2013) sondu pro detekování cholesterolu.

### 2.2.3.3 Detekce enzymů

Detekce je založena na myšlence, že určité enzymy jsou schopny degradovat proteiny. Vytvoříme-li zlaté nanoklastry stabilizované nějakým proteinem a přidáme-li k nim daný enzym, protein bude enzymem degradován, což se projeví ve změně fluorescenčního signálu nanoklastrů (Zhang a kol. 2019).

Cystatin C je jedním z inhibitorů cysteinových proteáz a je považován za ideální marker pro včasnou detekci chronického onemocnění ledvin (Lin a kol. 2013). Lin a kol.

(2013) použili BSA jako templátovou molekulu. Je-li do roztoku přidán papain (enzym s cysteinovou proteázovou aktivitou), dojde ke štěpení BSA, a tím ke zhášení fluorescence nanoklastrů. Následným přidáváním cystatinu C pozorovali nárůst intenzity fluorescence v závislosti na jeho rostoucí koncentraci. Detekční limit byl stanoven na 4 ng/ml.

Histon deacetyláza je jedním z enzymů zodpovědných za kovalentní modifikace aminokyselinových řetězců histonů (Alberts a kol. 2015). Wen a kol. (2013) připravili zlaté nanoklastry stabilizované peptidem, který sestrojili tak, aby došlo k interakci mezi všemi jeho aminokyselinami a nanoklastrem, čímž vytvořili jakousi ochrannou vrstvu před O<sub>2</sub> nacházejícím se v roztoku, a zabránili tak zhášení fluorescence. Enzymatickou deacetylací peptidu dojde k narušení interakcí mezi peptidem a nanoklastrem, kyslík je s ním díky tomu schopen interagovat, čímž dojde k zhášení fluorescence. Detekční limit byl stanoven na 5 pM.

#### **2.2.3.4 Biologické značení a zobrazování**

Zlaté nanoklastry mají užitečnou sadu vlastností, což z nich dělá atraktivní alternativy k běžným fluorescenčním sondám (kvantové tečky, fluorescenční proteiny, organická barviva) pro biologické zobrazování a značení (Shang a kol. 2011b, Zhang a Wang 2014).

Wu a kol. (2010) jako první provedli *in vivo* fluorescenční zobrazování nádoru myši užitím kovových nanoklastrů. Jako templátovou molekulu si zvolili BSA, přičemž výsledné zlaté nanoklastry emitovaly v blízké infračervené oblasti spektra a vytvářely vysoký kontrast vůči okolní tkáni.

Shang a kol. (2011a) použili zlaté nanoklastry k zobrazení endocytózy HeLa buněk na základě doby života fluorescence. Dlouhá doba života excitovaného stavu je totiž jednou z mnoha kladných vlastností zlatých nanoklastrů. V jejich případě byla o dva řády vyšší než doba života buněčných komponent, díky čemuž může být ze signálu odfiltrována autofluorescence těchto komponent.

Kromě redukce pomocí chemických činidel byla při zobrazování užitá i metoda biosyntézy zlatých nanoklastrů, která byla provedena Wang a kol. (2013b) a je detailněji popsána v kapitole 2.2.1.3.

Odlisný přístup pro zobrazování aplikoval Wang a kol. (2015a). Zlato poměrně dobře absorbuje rentgenové záření, a tudíž může být v podobě zlatých nanoklastrů užito

jako kontrastní látka ve výpočetní tomografii. Autoři si připravili BSA stabilizované nanoklastry a provedli 2D a 3D zobrazování ledvin myši.

## 2.3 Bimetalické Au-Fe nanoklastry

Na začátek je nutné zmínit, že pojmem bimetalické nanoklastry chceme vyjádřit skutečnost, že námi připravený systém obsahuje dva různé kovy, nikoli nanoklastry tvořené současně oběma kovy. V následujících dvou kapitolách se podíváme na několik odlišných strategií syntézy a využití bimetalických nanoklastrů (zejména však Au-Fe, kterých se tato práce týká).

### 2.3.1 Syntéza Au-Fe nanoklastrů

Existují dva různé přístupy přípravy bimetalických nanoklastrů. První strategií je postsyntetická funkcionalizace, do které můžeme zařadit chemickou konjugaci, využití nekovalentních interakcí a samsopřádání. Druhou možností je *in situ* syntéza, kdy je funkcionalizace prováděna již během syntézy (Shang a kol. 2019).

Chemická konjugace je založená na kovalentních interakcích mezi funkčními skupinami molekul, kterými jsou nanoklastry modifikovány. Huang a kol. (2018) si nejprve připravili magnetické nanočástice železa metodou koprecipitace, jejichž povrch následně upravili pomocí 3-aminopropyltrimethoxysilanu. Poté provedli syntézu zlatých nanoklastrů s využitím kyseliny lipové jako stabilizujícího činidla. Následně nanočástice a nanoklastry konjugovali prostřednictvím peptidových vazeb a uzavřeli do lysozomů, které slouží jako transportní systém. Takto vytvořený nanokompozit využili jako sondu pro *in vivo* zobrazování srdce, jater, ledvin, sleziny a plic myši.

Jednou z nekovalentních interakcí je interakce elektrostatická, kterou Wang a kol. (2015b) využili při syntéze sondy s potenciálem pro duální zobrazování. Přichystali si zlaté nanoklastry stabilizované glutationem, jehož karboxylová skupina nese na kyslíku záporný náboj, a rovněž nanočástice železa, které modifikovali prostřednictvím bromidu hexadecyltrimethylamonného, jenž obsahuje kladně nabitý kvarterní dusík.

Příkladem samsopřádání budiž silná nekovalentní interakce mezi biotinem a streptavidinem (Shang a kol. 2019). Shibu a kol. (2013) nejdříve provedli biotinylací aminoskupin nacházejících se na povrchu BSA stabilizovaných zlatých nanoklastrů. Poté je konjugovali s nanočásticemi železa, které předtím modifikovali pomocí streptavidinu.

Přístup pomocí *in situ* syntézy si uvedeme na příkladu systému Han a kol. (2017), kteří vytvořili sondu pro multimodální *in vivo* zobrazování a fotodynamickou terapii. Nejprve smísili BSA s  $Gd_2O_3$  a po přidání NaOH roztok inkubovali při 37 °C. Posléze přidali  $HAuCl_4$  a NaOH a znovu roztok inkubovali. Tento typ přípravy tedy spočívá ve smísení všech prekurzorů, nikoli v postupné syntéze jednotlivých komponent následované jejich modifikací a konjugací. Prostřednictvím této sondy jsou schopni provádět zobrazování pomocí fluorescence, magnetické rezonance a výpočetní tomografie. Zlaté nanoklastry navíc při stimulaci laserem v blízké infračervené oblasti podporují produkci singletního kyslíku, čehož se využívá ve fotodynamické terapii. Vytvořený nanokompozit ještě dále konjugovali s indocyaninovou zelení, která vylepšuje jeho fotodynamické vlastnosti a umožňuje zobrazování v blízké infračervené oblasti.

### 2.3.2 Využití Au-Fe nanoklastrů

Jak bylo v minulé kapitole naznačeno, bimetalické nanoklastry mohou být využity jako sondy pro multimodální zobrazování. Rozumnou kombinací několika zobrazovacích metod totiž můžeme překonat omezení, na která bychom narazili při jejich samostatném použití. Vysoká citlivost fluorescenčního zobrazování (FI) umožňuje monitorovat různé biologické děje v reálném čase, nicméně kvůli omezené prostupnosti záření skrz tkáň nemůžeme získat detailní 3D obraz. Naopak zobrazování pomocí magnetické rezonance (MRI) poskytuje 3D informace o měkkých tkáních s vysokým prostorovým rozlišením, ovšem nevýhodou této metody je její nízká citlivost. Duální MRI/FI sondy můžeme tedy užít pro provádění vysoce citlivého zobrazování a současně pro získání histologických informací s vysokým rozlišením (Wang a kol. 2015b).

Přidáním dalšího kovu můžeme také dosáhnout vylepšení dosavadních vlastností monometalických nanoklastrů. Proteinem stabilizované zlaté nanoklastry napodobují chování peroxidáz, avšak jejich praktické využití je limitováno nízkou katalytickou aktivitou (Cho a kol. 2017). Cho a kol. (2017) však vytvořili nanokompozit konjugací zlatých nanoklastrů a magnetických nanočástic oxidu železnato-železitého ( $Fe_3O_4$ ), které výrazně vylepšují katalytickou aktivitu nanoklastrů. Toho využili ke kolorimetrickému stanovení glukózy ve vzorcích krve s detekčním limitem 100  $\mu M$  a vysokou selektivitou oproti močovině, fruktóze, laktóze a kyselině askorbové, které se v krvi běžně vyskytují. Princip detekce je založen na spřažených reakcích katalyzovaných nanokompozity a glukóza-oxidázou, jež katalyzuje oxidaci glukózy za vzniku  $H_2O_2$ , v jehož přítomnosti



jsou nanokompozity schopny rychle oxidovat 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), což se projeví modrým zbarvením roztoku.

## 2.4 Metody charakterizace

### 2.4.1 Absorpční spektrofotometrie v UV/Vis oblasti

Prochází-li elektromagnetické záření absorbujičím prostředím, dochází postupně ke snižování jeho intenzity. Velikost útlumu se nejčastěji popisuje pomocí absorbance  $A(\lambda)$ :

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl = -\log T(\lambda) = -\log \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)}, \quad (1)$$

kde  $T(\lambda)$  označuje propustnost vzorku, která je dána jako poměr intenzity záření prošlého vzorkem  $I(\lambda)$  a intenzity záření dopadajícího na vzorek  $I_0(\lambda)$  (Prosser a kol. 1989). Absorbance je přímo úměrná molárnímu absorpčnímu koeficientu  $\varepsilon(\lambda)$ , koncentraci  $c$  měřeného vzorku a dráze  $l$ , kterou záření při průchodu vzorkem urazí. Tuto závislost vyjadřuje Lambert-Beerův zákon. Absorpční spektra jsme měřili, abychom se ujistili, že se v našich vzorcích nacházejí nanoklastry, a nikoliv nanočástice.

### 2.4.2 Fluorescenční spektroskopie

Principem této spektroskopické metody je jev nazývaný jako fluorescence, což je zářivý přechod molekuly z nejnižší vibrační hladiny excitovaného singletního stavu do jedné z vibračních hladin stavu základního (Prosser a kol. 1989). Tuto metodu jsme používali k charakterizaci materiálu, protože zlaté nanoklastry fluorescenční vlastnosti vykazují (Shang a kol. 2011b). Jednou ze základních veličin popisujících fluorescenci, kterou jsme stanovovali, je kvantový výtěžek  $\phi$ , jenž je dán jako poměr počtu fotonů emitovaných a absorbovaných fluoroforem za sekundu (Prosser a kol. 1989). Další veličinou je doba života excitovaného stavu, kterou můžeme definovat jako průměrnou dobu, kterou fluorofory po excitaci krátkým pulzem stráví v excitovaném stavu (Leung a kol. 2011).

### 2.4.3 Cirkulární dichroismus (CD)

Metoda CD je založena na rozdílné absorpci levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného záření opticky aktivními látkami (Miles a Wallace 2006). Rekombinací rozdílně absorbovaných složek vzniká záření elipticky polarizované (Kelly a kol. 2005), které můžeme charakterizovat pomocí elipticity  $\psi$ :

$$\psi = 32,928 \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R)cl, \quad (2)$$

kde  $\varepsilon_L$  a  $\varepsilon_R$  jsou molární absorpční koeficienty pro levotočivě a pravotočivě kruhově polarizované záření,  $c$  je koncentrace vzorku a  $l$  je optická dráha (Prosser a kol. 1989). Z tvaru spektra lze získat informace o sekundární struktuře proteinu (Miles a Wallace 2006).

### 2.4.4 ATR-FTIR

Zkratka FTIR označuje metodu zvanou infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, jež využívá interferometru a Fourierovy transformace. Metoda zeslabeného úplného odrazu (ATR) je založena na principu úplného odrazu infračerveného záření na fázovém rozhraní mezi materiálem s vysokým indexem lomu a vzorkem na jeho povrchu. Ke studiu sekundární struktury proteinu se primárně využívají tři charakteristické pásy v oblastech  $1800 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  (amid I),  $1570 - 1470 \text{ cm}^{-1}$  (amid II) a  $1350 - 1250 \text{ cm}^{-1}$  (amid III), přičemž amid I je ke změně sekundární struktury nejcitlivější (Glassford a kol. 2013, Ji a kol. 2020).

### 2.4.5 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Princip DLS je založen na detekci fluktuací intenzity rozptýleného světla, jež jsou způsobeny Brownovým pohybem částic suspendovaných v kapalině. Analýzou korelační funkce těchto fluktuací získáme difúzní koeficient  $D$  a hydrodynamický průměr  $d_H$  částic je poté vypočítán pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice ve tvaru

$$d_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (3)$$

kde  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je termodynamická teplota, a  $\eta$  označuje viskozitu rozpouštědla. Výsledkem měření je distribuce velikostí podle intenzity, kterou je možné přepočítat na distribuci velikostí podle objemu a počtu částic (Bhattacharjee 2016, Zheng a kol. 2016).

Zeta potenciál je elektrokinetický potenciál měřený na hranici mezi elektrickou dvojrůstvou částice a okolní kapalinou. K jeho měření se užívají kyvety obsahující dvě elektrody, pomocí kterých se na kapalinu aplikuje elektrické pole, které způsobí pohyb nabitých částic k elektrodě s opačným nábojem. Prostřednictvím laserové dopplerovské velocimetrie se pak stanoví elektroforetická pohyblivost  $U_E$  částic a s využitím Henryovy rovnice se vypočítá zeta potenciál  $\zeta$  jako

$$\zeta = \frac{3\eta U_E}{2\varepsilon f(ka)}, \quad (4)$$

kde  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta a  $f(ka)$  představuje Henryovu funkci (Bhattacharjee 2016, Clogston a Patri 2011).

#### **2.4.6 Mössbauerova spektroskopie**

Tuto metodu jsme užili k identifikaci fázového složení železné složky. Je založena na bezodrazové emisi a rezonanční absorpci gama záření atomovými jádry (Liu a kol. 2015). V případě transmisního uspořádání je detekováno záření prošlé absorbérem. K rezonanční absorpci dojde pouze tehdy, odpovídá-li energie záření energii přechodu mezi jednou z podhladin hyperjemné struktury základního stavu a jednou z podhladin hyperjemné struktury excitovaného stavu. Toho může být docíleno úpravou frekvence emitovaného záření prostřednictvím Dopplerova jevu (Rancourt 1998).

#### **2.4.7 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)**

ICP-MS jsme užili ke stanovení hmotnosti zlata a železa ve vzorcích. Princip této metody je následující. Kapalný vzorek je napřed prostřednictvím peristaltického čerpadla přiváděn do zmlžovače, ve kterém je s využitím inertního plynu (Ar) přeměněn na jemný aerosol. V mlžné komoře jsou kapičky aerosolu od těch velkých odděleny a vstřikovačem přiváděny do plazmového hořáku, ve kterém je díky indukovanému vysokofrekvenčnímu magnetickému poli vytvářena v proudu argonu plazma, která poté procházející kapičky aerosolu ionizuje. Vzniklé ionty jsou přes expanzní komoru směřovány do hmotnostního spektrometru, kde jsou detekovány (Mihaljevič a kol. 2004, Thomas 2004).

### 2.4.8 Relaxometrie

Relaxometrie umožňuje stanovit hodnoty relaxačních časů jader, což je doba, za kterou se magnetický moment jádra vrátí do původního stavu, ve kterém se nacházel před excitací radiofrekvenčním pulzem. Relaxivita  $r$  poté může být určena užitím vztahu

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_i^0} + r_i \cdot [KL]; \quad i = 1, 2, \quad (5)$$

kde  $T_i$  je relaxační čas tkáně v přítomnosti kontrastní látky,  $T_i^0$  je relaxační čas tkáně v její nepřítomnosti a  $[KL]$  představuje její koncentraci. Látka s vyšší hodnotou relaxivity poskytuje při zobrazování magnetickou rezonancí lepší kontrast (Jacques a kol. 2010, Koenig a Brown, 1990). Ze vztahu je patrné, že relaxivitu můžeme získat jako směrnici přímky, vyneseme-li reciproké hodnoty relaxačního času v závislosti na koncentraci kontrastní látky.

### 3 Cíl práce

Jedním z cílů této diplomové práce je sepsat poznatky z literární rešerše týkající se především přípravy monometalických (Au) a bimetalických (Au-Fe) nanoklastrů. Experimentální cíl práce spočívá v přípravě a proměření charakteristických vlastností připravených Au-Fe nanoklastrů, dále pak jejich optimalizaci pro budoucí využití jakožto kontrastní látky při fluorescenčním zobrazování a zobrazování magnetickou rezonancí.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Chemikálie

K syntéze a charakterizaci: hovězí sérový albumin (BSA,  $\geq 98\%$ ), trihydrát kyseliny tetrachlorozlatité ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 99%), tetrahydrát chloridu železnatého ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 99%), hexahydrát chloridu železitého ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 99%), heptahydrát síranu železnatého ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 99%), hydroxid sodný (NaOH, 99%), chlorid sodný (NaCl, 99%), monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 99%) a dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 99%) byly zakoupeny od výrobce Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) a kyselina chlorovodíková (HCl, 35%) byla zakoupena od výrobce Penta (Česká republika). Odkysličená deionizovaná voda ( $\text{diH}_2\text{O}$ ) byla připravena proplachováním Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, USA) vody  $\text{N}_2$  a byla použita na veškeré experimenty.

K mineralizaci a analýze metodou ICP-MS: kyselina chlorovodíková (HCl, 36%) a kyselina dusičná ( $\text{HNO}_3$ , 69%) řady Analpure® a certifikované referenční materiály řady ASTASOL® byly zakoupeny od výrobce Analytika (Česká republika).

### 4.2 Syntéza Au-Fe nanoklastrů

Pro přípravu Au-Fe nanoklastrů jsme si jako templátovou molekulu zvolili BSA, jenž v reakci slouží jakožto stabilizující a současně i redukční činidlo. Typická syntéza sestává z několika snadných kroků. Nejprve k BSA přidáme předem smíchaný roztok tvořený jedním z prekurzorů železa ( $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  nebo  $\text{FeSO}_4$ ),  $\text{HAuCl}_4$  a  $\text{diH}_2\text{O}$ . Po 90 sekundách přidáme NaOH, čímž aktivujeme redukční schopnost proteinu. Po dalších 90 sekundách vložíme kádinku do mikrovlnné trouby, kterou nastavíme na výkon 150 W a necháme ji působit po dobu 10 sekund. Následně vzorek umístíme do ledu a posléze všechny skladujeme v ledničce při 4 °C. Až na aplikaci mikrovlnného záření je roztok po celou dobu syntézy míchán pomocí magnetické míchačky rychlostí 600 otáček za minutu. Přidávané objemy zásobních roztoků a jejich koncentrace jsou přehledně uvedeny v Tabulce 2. Nicméně, pro sledování agregace jsme upravovali poměr objemu prekurzoru železa a  $\text{diH}_2\text{O}$  tak, aby odpovídal přidávání 0,1 ml zásobního roztoku prekurzoru v rozsahu koncentrací 1,1 – 11 mM. Postup při přípravě referenčního vzorku

si liší tím, že do roztoku není přidán prekurzor železa, a tudíž objem přidávané diH<sub>2</sub>O vzroste na 0,35 ml.

Pro přípravu vzorku na Mössbauerovu spektroskopii byl použit prekurzor FeCl<sub>2</sub> obohacený o izotop <sup>57</sup>Fe, jenž byl připraven rozpuštěním obohaceného Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> v 35% HCl a naředěn na požadovanou koncentraci (5mM).

Vzorky pro studium vlivu teploty a iontového složení roztoku jsme před měřením inkubovali při teplotě 20 °C (v případě vlivu teploty) a 37 °C (v případě obou vlivů) po dobu 20 minut, 6 hodin a 24 hodin v termobloku.

**Tabulka 2:** Koncentrace *c* a objemy *V* zásobních roztoků užívaných během syntézy.

	BSA	HAuCl <sub>4</sub>	FeCl <sub>2</sub> /FeSO <sub>4</sub> /FeCl <sub>3</sub>	diH <sub>2</sub> O	NaOH
<i>c</i>	40 mg/ml	11 mM	5 mM	-	1 M
<i>V</i> [ml]	1	0,65	0,1	0,25	0,2

Z důvodu zamezení agregace jsme ve třetím dni po přípravě vzorky dialyzovali. Použili jsme dialyzační membránu s velikostí pórů 12 kDa. Dialýzu jsme prováděli v chladové místnosti (při 4 °C) celkem 8 hodin, během kterých jsme vodu vyměnili poprvé po první hodině a následně jsme ji měnili co dvě hodiny. Po skončení jsme vrátili pH na přibližně původní hodnotu přidáním 12,5 μl 1M roztoku NaOH na 1 ml vzorku.

K usušení vzorků, které jsme potřebovali pro měření Mössbauerovských spekter a k analýze pomocí ICP-MS, jsme použili vakuovou centrifugu.

## 4.3 Charakterizace nanoklastrů

### 4.3.1 UV-Vis spektra

UV-Vis spektra byla měřena na absorpčním spektrofotometru Specord 250 PLUS – 223G1032 (Analytik Jena, Jena, Německo) rychlostí 2 nm/s, s krokem 1 nm a v rozsahu vlnových délek 250 – 800 nm. Šířka štěrbin monochromátoru byla nastavena na 2 nm. Vzorek byl umístěn do křemenné kyvety s optickou dráhou 1 cm a naředěn na finální koncentraci 0,18 mg/ml (vztaženo na BSA) deionizovanou vodou, jež byla užitá jako reference.

### 4.3.2 Excitačně-emisní (3D) a emisní spektra, stanovení kvantového výtěžku

K měření těchto spekter byl použit spektrofluorometr JascoF8500 (Jasco, Tokio, Japonsko) a pomocí spektrofluorometru Fluorolog-3 (HORIBA Scientific, Longjumeau, Francie) bylo změřeno spektrum na Obrázku 14. Vzorek byl umístěn do křemenné kyvety s optickou dráhou 1 cm a naředěn na finální koncentraci  $0,18 \text{ mg/ml}$  (vztaženo na BSA) deionizovanou vodou, jejíž signál byl odečten jako pozadí. 3D spektra byla měřena s krokem 5 nm, rychlostí 5000 nm/s a v rozsahu excitačních vlnových délek 250 – 420 nm a emisních vlnových délek 290 – 800 nm. Šířka štěrbin excitačního a emisního monochromátoru byla nastavena na 5 nm. Z 3D spektra byla poté určena vlnová délka excitace jako 270 nm. Emisní spektra byla měřena rychlostí 50 nm/min, s krokem 0,1 nm a v rozsahu vlnových délek 550 – 800 nm. Šířka štěrbin excitačního a emisního monochromátoru byla nastavena na 2,5 nm.

Kvantový výtěžek  $\phi$  byl vypočten podle vztahu

$$\phi = \phi_s \frac{F \cdot A_s \cdot n^2}{F_s \cdot A \cdot n_s^2}, \quad (6)$$

kde  $F$  je integrální intenzita fluorescence,  $A$  je absorbance,  $n$  značí index lomu daného prostředí a indexem  $s$  označujeme proměnné standardu, kterým byla nilská modř, jejíž kvantový výtěžek v ethanolu  $\phi_s = 0,27$  (Brouwer 2011).

### 4.3.3 Kinetika dohasínání fluorescence

Měření kinetiky dohasínání fluorescence bylo provedeno na TCSPC fluorometru PicoHarp300 (PicoQuant, Berlín, Německo). K excitaci vzorku byl použit pulzní laser emitující na vlnové délce 445 nm s frekvencí pulzů 2,5 MHz. Emise byla detekována pod magickým úhlem při 640 nm. Data byla zaznamenána do histogramu s časovou škálou 0 – 400 ns, kde časová šířka jednoho kanálu byla nastavena na 128 ps. Měření probíhalo při teplotě 295 K po dobu 20 minut, nebo dokud v kanálu maxima nebylo detekováno 20000 fotonů. Funkce přístrojové odezvy (IRF) byla stanovena užitím deionizované vody. Signál byl fitován pomocí softwaru FluoFit 4.2.1 (PicoQuant, Berlín, Německo) jako suma exponenciál:

$$I(t) = IRF \otimes \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (7)$$



kde  $A_i$  je předexponenciální faktor určující poměrné zastoupení  $i$ -té komponenty,  $t$  značí čas a  $\tau_i$  představuje dobu života excitovaného stavu  $i$ -té komponenty. Měření a vyhodnocení prováděl doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D. na Katedře experimentální fyziky Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci.

#### 4.3.4 Cirkulární dichroismus

Spektra CD byla měřena pomocí spektrometru JASCO J-815 (Jasco, Tokyo, Japonsko) rychlostí 100 nm/min, s krokem 1 nm a v rozmezí vlnových délek od 190 nm do 260 nm. Každé spektrum bylo získáno jako průměr 6 měření. Vzorek byl umístěn do křemenné kyvety s optickou dráhou 0,1 cm a byl naředěn na finální koncentraci 0,227 mg/ml (vztaženo na BSA) deionizovanou vodou, jejíž signál byl odečten jako pozadí.

Pro detailnější analýzu sekundární struktury byl použit výpočet dle softwaru BeStSel, jenž poskytuje informaci o 8 strukturních komponentách a je volně dostupný na webových stránkách [1].

#### 4.3.5 Infračervená spektra

K měření IČ spekter byl použit spektrofotometr ATR-IR IS5 Nicolet (Nicolet, Madison, WI, USA) s diamantovým krystalem v rozsahu 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  a s rozlišením 4  $\text{cm}^{-1}$ . Před každým měřením byla provedena korekce na pozadí (pro odstranění signálu vzdušné vlhkosti a oxidu uhličitého) a poté byly přibližně 2  $\mu\text{l}$  vzorku pipetovány na krystal a ponechány 10 minut k usušení při pokojové teplotě. Spektra byla poté převedena pomocí ATR korekce do absorpčního módu, byla upravena základní linie v softwaru Omnic.

#### 4.3.6 Hydrodynamický průměr a zeta potenciál

Měření dynamického rozptylu světla bylo provedeno pomocí přístroje Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) obsahujícího He-Ne laser emitující světlo o vlnové délce 633 nm. V případě hydrodynamického průměru byl vzorek umístěn do polystyrenové kyvety s optickou dráhou 1 cm a naředěn stejně jako na fluorescenci. Měření bylo provedeno při teplotách 20 a 37  $^{\circ}\text{C}$ , přičemž před jeho začátkem proběhla kalibrace po dobu 4 minut. K měření zeta potenciálu (při 20  $^{\circ}\text{C}$ ) byla užita kyveta

DTS1070, do které byl umístěn neřaděný vzorek o koncentraci  $18, \overline{18}$  mg/ml (vztaženo na BSA). V obou případech jsou výsledky průměrem ze 7 hodnot.

#### **4.3.7 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)**

Vzorky byly nejprve mineralizovány pomocí mikrovlnného reaktoru MLS 1200 Mega (Milestone, Itálie) působením koncentrovaných kyselin HCl a HNO<sub>3</sub>, které byly ke vzorkům přidány v poměru 1:2. Stanovení celkové koncentrace zlata a železa bylo následně provedeno metodou ICP-MS na přístroji Agilent 7700x ICP-MS (Agilent Technologies, Japonsko). Uvedené výsledky jsou průměrem z 6 měření. Detekční limit pro stanovení množství železa a zlata ve vzorku byl postupně 0,3 µg/g a 2,9 µg/g. Měření a vyhodnocení prováděl RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D. na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci.

#### **4.3.8 Mössbauerovská spektra**

K měření spekter byl užit Mössbauerův spektrometr OLTWINS v transmisním uspořádání, který byl sestaven na Katedře experimentální fyziky Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci. Zdrojem záření byl zářič <sup>57</sup>Co, pro kalibraci byla užita α-Fe fólie. Vzorek byl obohacen o <sup>57</sup>Fe. Měření a vyhodnocení prováděl Mgr. Petr Novák, Ph.D. na Katedře experimentální fyziky Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci.

#### **4.3.9 Měření relaxivity**

Měření relaxačních časů bylo provedeno na relaxometru Bruker minispec mq60 (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany) při magnetické indukci 1,5 T a teplotě 37 °C. Před měřením byla připravena koncentrační řada vzorků jejich ředěním destilovanou vodou. Hodnoty relaxivit byly poté určeny jako směrnice přímky získané fitováním závislosti reciprokových hodnot relaxačních časů na koncentraci železa ve vzorku.

Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) bylo uskutečněno na přístroji Bruker Biospec 47/20 (Bruker, Ettlingen, Germany). Pro každou koncentraci všech vzorků byly získány dva T<sub>2</sub> vážené MR obrázky a jeden T<sub>1</sub> vážený MR obrázek. Zpracování a kvantifikace MR obrázků byla provedena s využitím softwaru ImageJ. Poměr kontrastu a šumu (CNR) byl následně vypočten z MR obrázků dle vztahu

$$CNR = 0,655 \cdot \frac{|S_v - S_p|}{\sigma_n}, \quad (8)$$

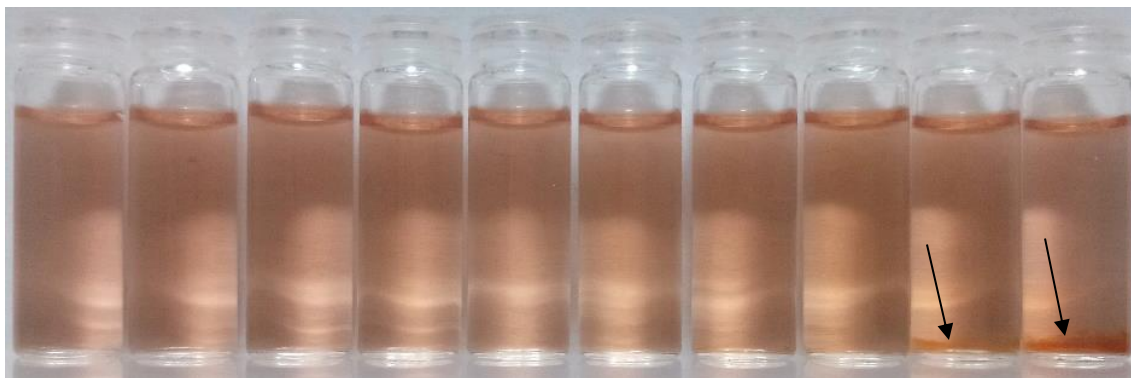
kde  $S_v$  představuje intenzitu signálu v oblasti zájmu,  $S_p$  označuje intenzitu signálu pozadí (destilovaná voda),  $\sigma_n$  je směrodatná odchylka šumu pozadí a konstanta 0,655 odráží Ricianovu distribuci šumu pozadí v MR obrázcích. Měření a vyhodnocení provedl Ing. Martin Vít pod vedením doc. Ing. Daniela Jiráka, Ph.D. v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze.

## 5 Výsledky

### 5.1 Syntéza materiálu: pozorování a vliv dialýzy

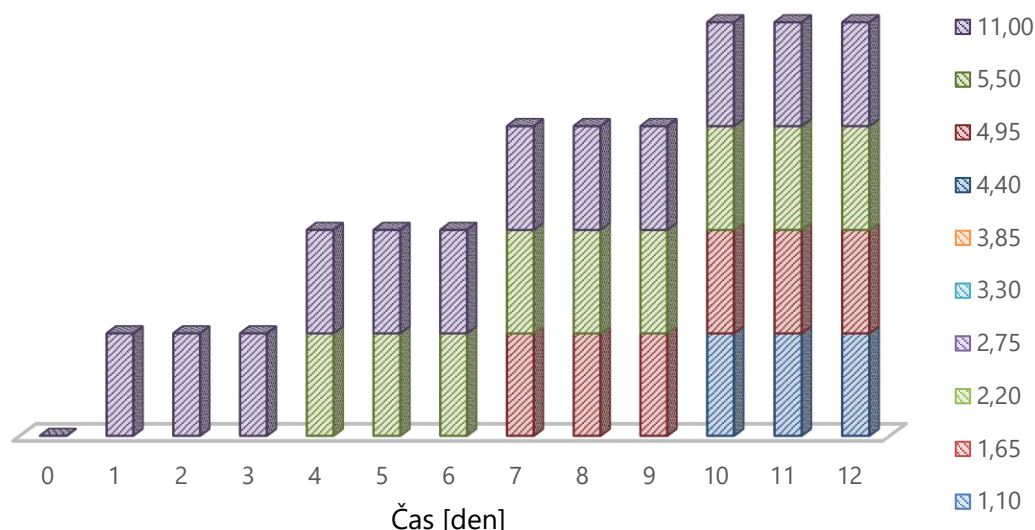
Na začátku je zapotřebí si ujasnit značení vzorků. Referenční vzorek bude označován jako Au, zatímco vzorky obsahující i železnou složku budou značeny jako AuFeCl<sub>2</sub>, AuFeSO<sub>4</sub> a AuFeCl<sub>3</sub>, čímž je popsáno, že při přípravě těchto vzorků byl jako prekursor železa použit postupně FeCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> a FeCl<sub>3</sub>.

Po syntéze prvních Au-Fe nanoklastrů jsme si všimli, že se na dně vialek vyskytují usazené agregáty, které jsou na Obrázku 4 vyznačeny šipkou. Na tomtéž obrázku je vyfocena koncentrační řada nedialyzovaných vzorků v 5. dni od přípravy pro vzorky AuFeCl<sub>2</sub> (ostatní dva typy vzorků s jinými prekursorů železa se chovaly obdobně, proto nejsou ukázány).



**Obrázek 4:** Koncentrační řada nedialyzovaných vzorků (AuFeCl<sub>2</sub>) v 5. dni od jejich přípravy. Směrem doprava roste koncentrace železa ve vzorku. Šipkami jsou označena místa s viditelnými usazenými agregáty.

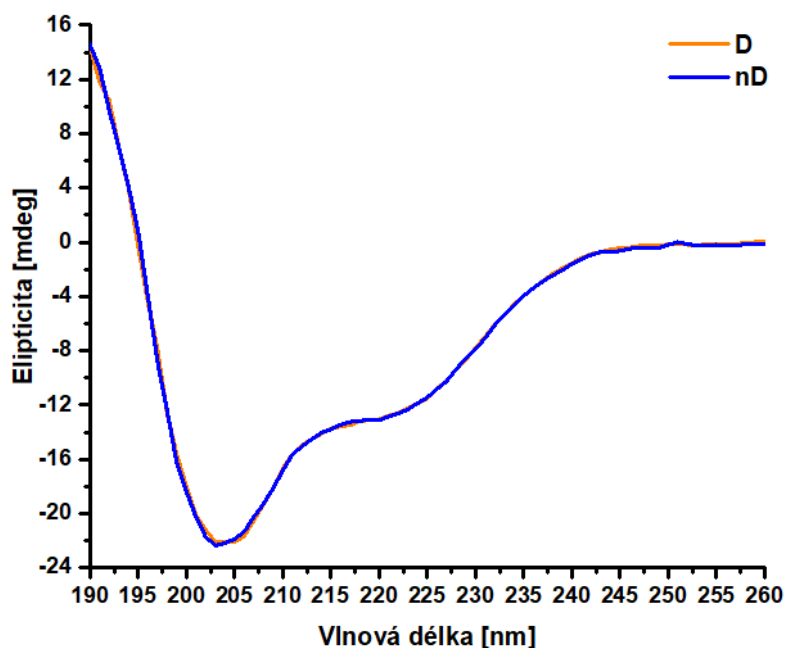
Vidíme, že v tomto dni podlely agregaci již dvě nejvyšší koncentrace železa. Časový vývoj agregace odhalil (viz Obrázek 5), že v případě nejvyšší koncentrace k agregaci došlo již v prvním dni od přípravy a že ve čtvrtém, sedmém a desátém dni agregovaly vzorky s koncentracemi nižšími.



**Obrázek 5:** Časový vývoj agregace nedialyzovaných vzorků ( $AuFeCl_2$ ). Napravo jsou uvedeny koncentrace zásobního roztoku  $FeCl_2$  (v jednotkách mM) odpovídající přidávání 11mM roztoku  $FeCl_2$  a deionizované vody v určitém poměru.

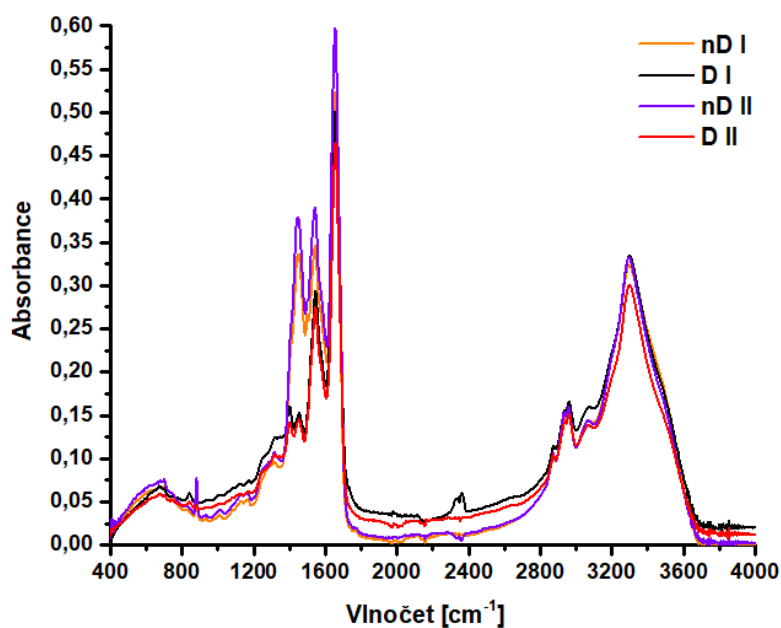
Z literatury a našich dřívějších experimentů (Andrýsková a kol. 2020, Cao a kol. 2013, Yue a kol. 2014) je známo, že během syntézy nanoklastrů se mění sekundární struktura BSA. Je otázkou, zda nastávají změny v sekundární struktuře též po dialýze, a proto jsme je zkoumali pomocí dvou metod: cirkulárním dichroismem a infračervenou absorpcí.

Spektra cirkulárního dichroismu vykazují dvě charakteristická minima okolo 203 nm a 220 nm a jsou pro oba vzorky téměř totožná (viz Obrázek 6). To však neznamená, že k žádným změnám sekundární struktury nedochází během dialýzy. Prostřednictvím softwaru BeStSel bylo vypočítáno procentuální zastoupení  $\alpha$ -helixu ve struktuře BSA a činí přibližně 16 %.



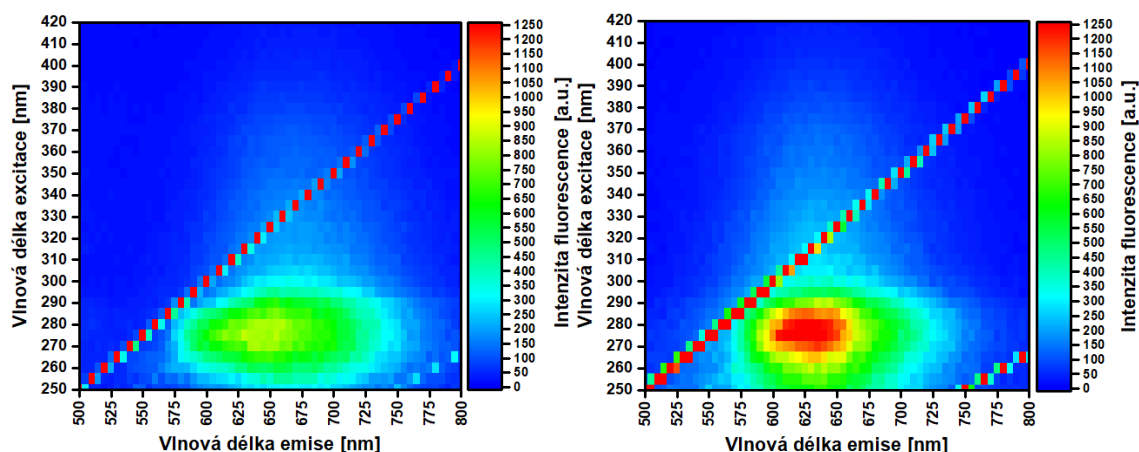
**Obrázek 6:** Spektra CD nedialyzovaného (nD) a dialyzovaného (D) vzorku ( $\text{AuFeCl}_2$ ), u kterého bylo pH po skončení dialýzy upraveno přibližně na hodnotu 12 přidáváním NaOH.

Na Obrázku 7 můžeme pozorovat, že infračervená spektra obou vzorků se mírně liší, převážně v oblasti  $1600 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ , ve které jsou mezi dialyzovanými a nedialyzovanými vzorky rozdíly největší. V této oblasti se dokonce mírně liší i nedialyzované vzorky mezi sebou. Je to oblast charakteristických vibrací amidů (Glassford a kol. 2013).



**Obrázek 7:** Infračervená spektra nedialyzovaných (nD) a dialyzovaných (D) vzorků ( $\text{AuFeCl}_2$ ), u kterých bylo pH po skončení dialýzy upraveno přibližně na hodnotu 12 přidáváním NaOH.

Taktéž v excitačně-emisních spektrech můžeme pozorovat několikero odlišností mezi dialyzovanými a nedialyzovanými vzorky (viz Obrázek 8). Nejvíce patrná je rozdílná intenzita fluorescence, jež je u dialyzovaného vzorku vyšší. Tohoto trendu si můžeme povšimnout i při pohledu na kvantový výtěžek (viz Tabulka 3). Dále došlo také ke změně tvaru spektra a k posunu emisní vlnové délky maxima v případě dialyzovaných vzorků směrem k nižším hodnotám.

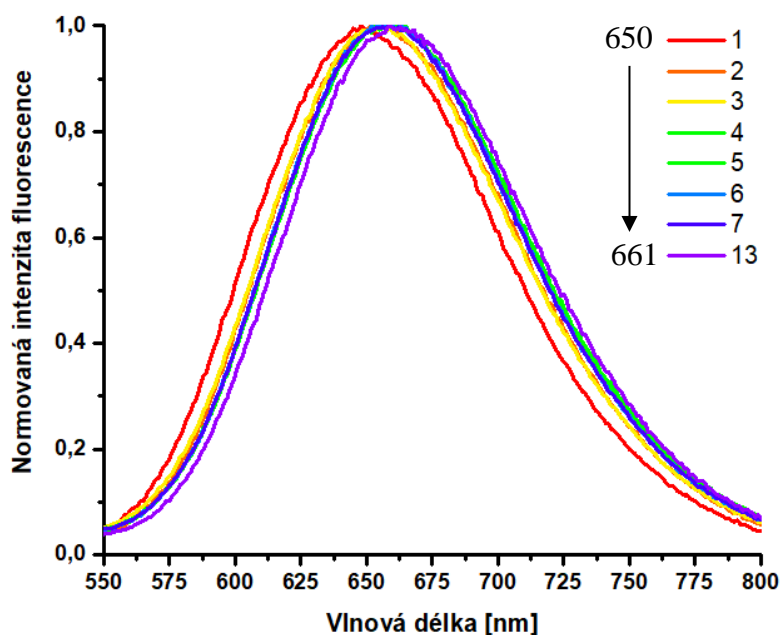


**Obrázek 8:** Porovnání excitačně-emisních spekter nedialyzovaného (nD) (vlevo) a dialyzovaného (D) (vpravo) vzorku ( $\text{AuFeCl}_2$ ), u kterého bylo pH po skončení dialýzy upraveno přibližně na hodnotu 12 pomocí NaOH. Ve spektrech je viditelná druhá a třetí harmonická složka Rayleighova rozptylu, který je způsoben ohybem záření na mřížce monochromátoru a jeho následnou interferencí.

Další rozdíl mezi dialyzovanými a nedialyzovanými vzorky je v časovém vývoji kvantového výtěžku (viz Tabulka 3). Zatímco dialyzované vzorky mají téměř neměnný kvantový výtěžek, v případě těch nedialyzovaných dochází s časem k jeho růstu a současně k bathochromnímu posunu, jenž je vidět na Obrázku 9. Rozdíly mezi Au a  $\text{AuFeCl}_2$  jsou v rámci intervalu spolehlivosti.

**Tabulka 3:** Kvantové výtěžky  $\Phi$  nedialyzovaných (nD) a dialyzovaných (D) vzorků ve čtvrtém, pátém a šestém dni od syntézy.

Vzorek	Den číslo	$\Phi_{nD}$ [%]	$\Phi_D$ [%]
Au	4	$1,82 \pm 0,10$	$2,08 \pm 0,04$
	5	$1,90 \pm 0,09$	$2,03 \pm 0,09$
	6	$1,99 \pm 0,10$	$2,15 \pm 0,09$
$\text{AuFeCl}_2$	4	$1,77 \pm 0,04$	$1,98 \pm 0,03$
	5	$1,88 \pm 0,04$	$2,02 \pm 0,03$
	6	$2,07 \pm 0,06$	$1,99 \pm 0,03$



**Obrázek 9:** Normovaná emisní spektra nedialyzovaných (nD) vzorků ( $AuFeCl_2$ ) v prvním až třináctém dni od syntézy.

Metoda ICP-MS nám umožnila zjistit, jaké množství zlata a železa bylo během dialýzy z roztoku odstraněno. V Tabulce 4 lze vidět, že byla-li dialýza provedena první den po syntéze, nebyly odstraněny žádné zlatité ionty, naopak je tomu ve třetím dni, kdy bylo odstraněno zhruba 10  $\mu\text{g}$  zlata. Při pohledu na hmotnost železa v nedialyzovaném referenčním vzorku nebo  $AuFeCl_2$  je jasné, že se v BSA nacházelo železo ještě předtím, než jsme ho sami přidali. Většina tohoto železa byla dialýzou v prvním či třetím dni odstraněna.

**Tabulka 4:** Hmotnost zlata a železa v nedialyzovaných (nD) vzorcích a vzorcích dialyzovaných (D) za 24 hodin (1D) a za 72 hodin (3D) od syntézy. Teoretická hmotnost zlata ve vzorcích činí 128,0  $\mu\text{g}$ , teoretická hmotnost železa ve vzorcích činí 2538,4 ng.

Vzorek	Typ vzorku	$m_{\text{Au}}$ [ $\mu\text{g}$ ]	$m_{\text{Fe}}$ [ng]
Au	nD	$103,0 \pm 4,5$	$782,7 \pm 308,3$
	1D	$103,2 \pm 6,9$	$37,5 \pm 6,0$
	3D	$88,4 \pm 4,1$	$24,7 \pm 3,5$
$AuFeCl_2$	nD	$100,2 \pm 5,1$	$3029,6 \pm 364,3$
	1D	$100,4 \pm 1,9$	$2467,8 \pm 62,4$
	3D	$92,6 \pm 4,2$	$2265,3 \pm 50,7$

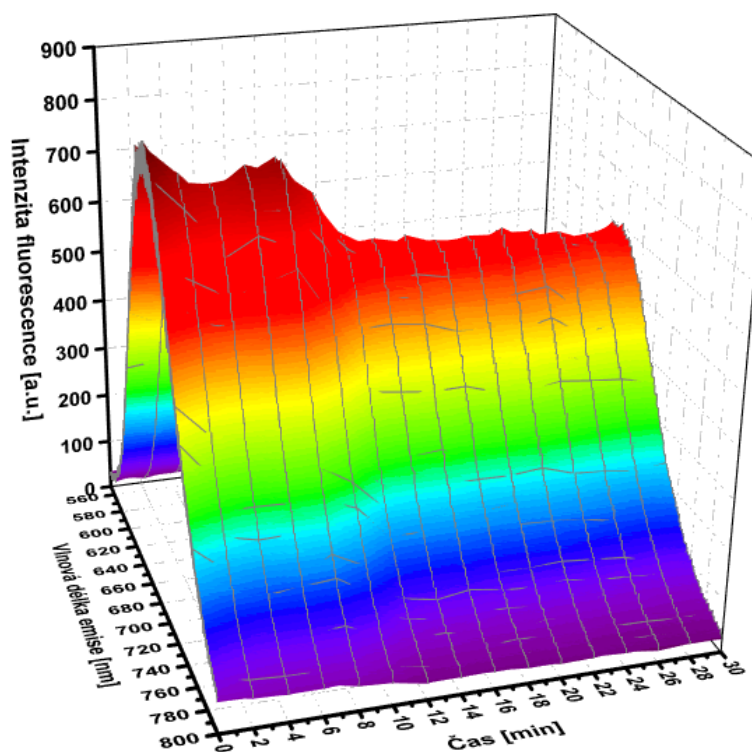


Odstranění zlatitých a železitých iontů se samozřejmě projevilo na hodnotách zeta potenciálu, kdy v případě dialyzovaných vzorků došlo téměř k jeho zdvojnásobení (viz Tabulka 5). Nejmenších hodnot zeta potenciálu dosahuje referenční vzorek.

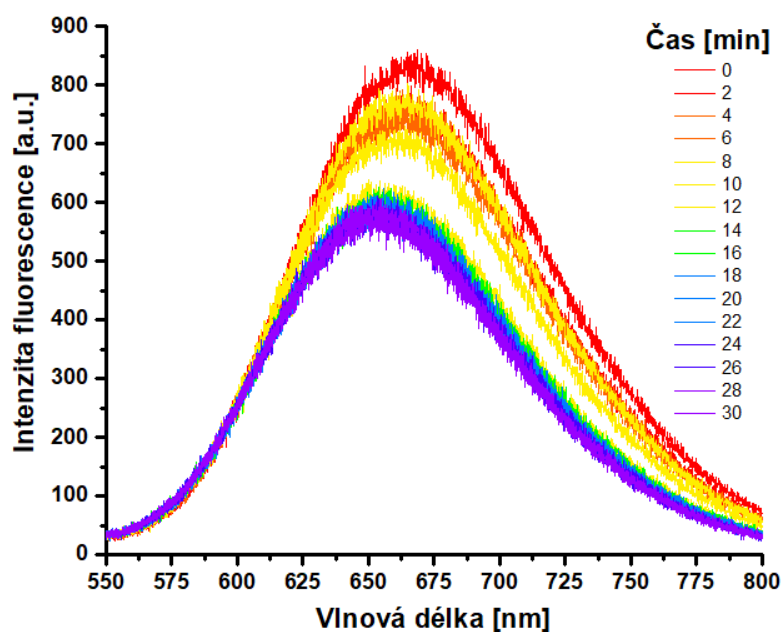
**Tabulka 5:** Hodnoty zeta potenciálu  $\zeta$  nedialyzovaných (nD) a dialyzovaných (D) vzorků.

Vzorek	$\zeta_{nD}$ [mV]	$\zeta_D$ [mV]
Au	$-15,1 \pm 0,6$	$-34,1 \pm 0,8$
AuFeCl <sub>2</sub>	$-17,3 \pm 0,4$	$-36,6 \pm 0,9$
AuFeSO <sub>4</sub>	$-18,3 \pm 0,3$	$-36,3 \pm 1,1$
AuFeCl <sub>3</sub>	$-16,7 \pm 0,3$	$-37,1 \pm 0,9$

Jak je vidět na Obrázcích 10 a 11, ředění vzorku rovněž ovlivňuje fluorescenční vlastnosti nanoklastrů. Můžeme si povšimnout, že zředěním vzorku dochází nejen k poklesu intenzity fluorescence, ale také k hypsochromnímu posunu. Zhruba po 15 minutách byla intenzita fluorescence již stabilní.



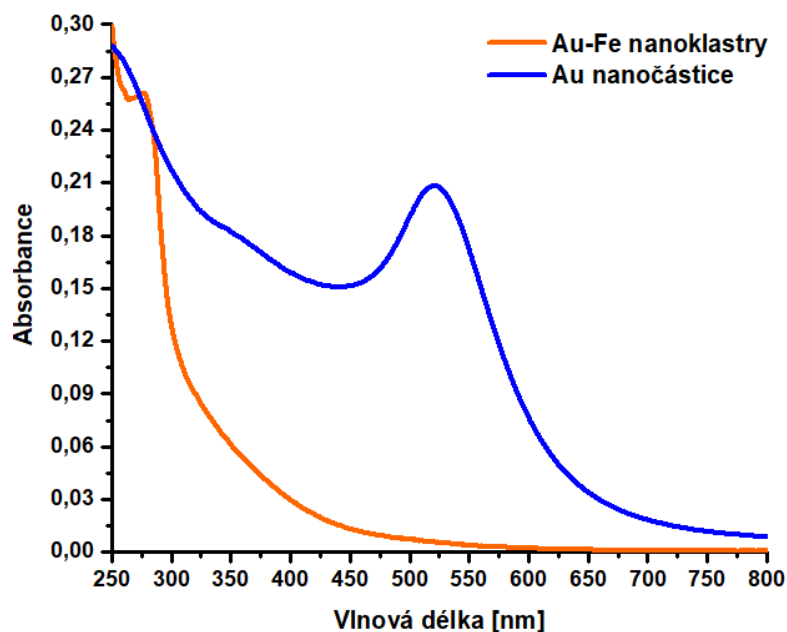
**Obrázek 10:** Časový průběh intenzity fluorescence po zředění dialyzovaného vzorku (AuFeCl<sub>2</sub>) deionizovanou vodou.



**Obrázek 11:** Časový průběh vlnové délky maxima emise po zředění dialyzovaného vzorku ( $AuFeCl_2$ ) deionizovanou vodou.

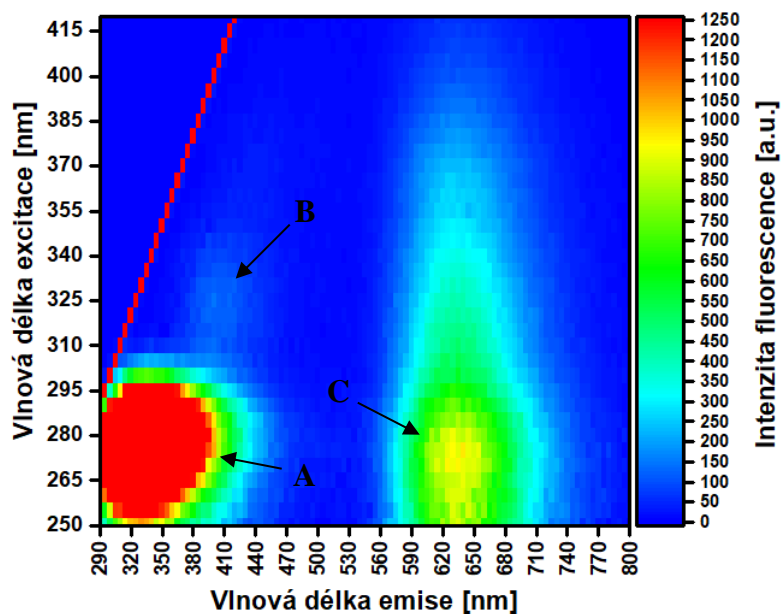
## 5.2 Charakterizace materiálu

Poté, co jsme prozkoumali vliv dialýzy a ředění na optické vlastnosti vzorku, jsme se pustili do charakterizace materiálu. Na Obrázku 12 je k porovnání uvedeno absorpční spektrum Au-Fe nanoklastrů a zlatých nanočástic. V případě nanočástic si můžeme povšimnout maxima nacházejícím se při 520 nm. Maximum ve spektru nanoklastrů se vyskytuje při 277 nm a nepochybně přísluší použité bílkovině. Dále je vidět náběh absorpce směrem od 450 nm k tomuto pásu. To je absorpce díky nanoklastrům a je zodpovědná za nažloutlou až oranžovou barvu připravených roztoků.

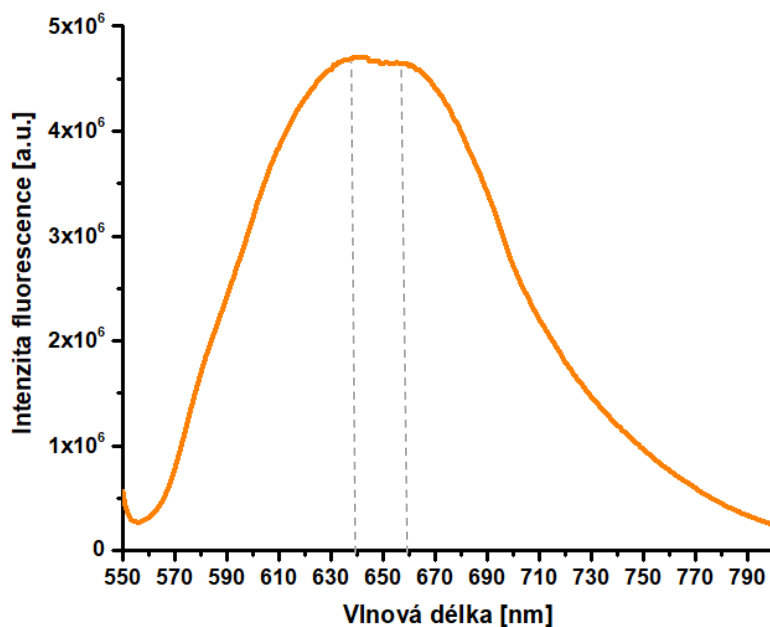


**Obrázek 12:** UV-Vis spektra Au-Fe nanoklastrů ( $AuFeCl_2$ ) (oranžová křivka) a zlatých nanočástic (modrá křivka).

Prostřednictvím fluorescence můžeme ve vzorcích charakterizovat fluorescentní zlatou složku. Abychom zjistili parametry excitace a emise zlatých nanoklastrů, provedli jsme nejdříve měření 3D excitačně-emisních spekter. Oblast, ve které nanoklastry emitují, je označena písmenem C (viz Obrázek 13). Emisní spektrum je uvedeno na Obrázku 14 a vykazuje existenci dvou maxim při 640 nm a 660 nm.



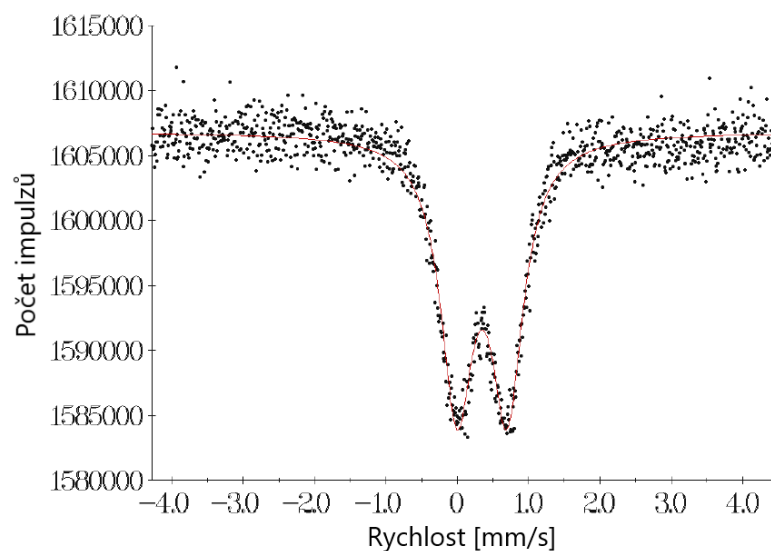
**Obrázek 13:** Excitačně-emisní spektrum Au-Fe nanoklastrů ( $\text{AuFeCl}_2$ ). Oblast A představuje emisi převážně tryptofanových residuí BSA (Chib a kol. 2015, Topalá a kol. 2014). Oblast B je přiřazována buďto malým modře emitujícím nanoklastrům (Mali a kol. 2013) nebo oxidovaným tyrozinovým residuům BSA (Andrýsková a kol. 2020). Oblast C přísluší nanoklastrům emitujícím v červené oblasti spektra (Mali a kol. 2013). Ve spektrech se nachází artefakt v důsledku Rayleighova rozptylu, který je způsoben ohybem záření na mřížce monochromátoru a jeho následnou interferencí.



**Obrázek 14:** Emisní spektrum Au-Fe nanoklastrů ( $\text{AuFeCl}_2$ ) při excitaci vlnovou délkou 270 nm.

Naopak železo jsme ve vzorcích charakterizovali Mössbauerovou spektroskopií a relaxometrií. Ve spektru na Obrázku 15 můžeme pozorovat dublet a rovněž si můžeme povšimnout izomerního posunu spektrálních čar. Ze zjištěných parametrů spektra je

zřejmé, že se jedná o oxid železitý. Ve snaze identifikovat blíže tento dublet, bylo provedeno i měření vzorku při 5 K (není uvedeno) a z výsledků bylo patrné, že došlo k magnetickému rozštěpení. Při této teplotě se ještě nezformoval sextet a dublet byl jen velmi málo zastoupen. Tyto aspekty naznačují, že jde o nanočástice s úzkou distribucí velikostí.



**Obrázek 15:** Mössbauerovské spektrum dialyzovaného vzorku ( $\text{AuFeCl}_2$ ) obohaceného o  $^{57}\text{Fe}$ . Spektrum bylo měřeno při teplotě 300 K.

Při měření příčné relaxivity dosahuje nejnižší hodnoty referenční vzorek (viz Tabulka 6), což je logické, protože do tohoto vzorku jsme železo nepřidávali a obsahuje zhruba 100x méně železa (viz Tabulka 4) než ostatní vzorky. Naopak nejvyšší hodnoty příčné relaxivity dosahuje vzorek  $\text{AuFeCl}_2$ .

**Tabulka 6:** Hodnoty podélné relaxivity  $r_1$ , příčné relaxivity  $r_2$  a poměru kontrastu a šumu (CNR).

Vzorek	$r_1$ [ $\text{l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$r_2$ [ $\text{l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	CNR [%]
Au	0,0038	0,0097	40,0
$\text{AuFeSO}_4$	0,0021	0,0342	58,6
$\text{AuFeCl}_2$	0,0037	0,0372	58,4
$\text{AuFeCl}_3$	0,0057	0,0350	46,8

## 5.3 Externí faktory ovlivňující vlastnosti připravených vzorků

### 5.3.1 Vliv teploty

Po charakterizaci jsme studovali vliv teploty na optické vlastnosti nanoklastrů a na strukturu BSA. Vliv teploty je zejména důležitý při ověření toxicity a též při použití nanoklastrů pro zobrazování *in vitro* a *in vivo*.

Při pokojové teplotě kvantový výtěžek nejprve klesá a poté roste, nejvyšší hodnota je dosažena po 20 minutách inkubace, kdežto při 37 °C pozorujeme s rostoucím časem pouze jeho nárůst (viz Tabulka 7). Také vidíme, že po 20 minutách je kvantový výtěžek vyšší v případě pokojové teploty a že vlnová délka maxima klesá s rostoucím časem při obou teplotách přibližně o 10 nm.

**Tabulka 7:** Kvantové výtěžky  $\Phi$  a emisní vlnové délky maxima  $\lambda_{max}$  dialyzovaných vzorků inkubovaných při teplotách 20 °C a 37 °C po dobu 20 minut, 6 hodin a 24 hodin.

Vzorek	Teplota [°C] Doba inkubace	$\Phi$ [%]		$\lambda_{max}$ [nm]	
		20	37	20	37
Au	20 minut	2,78 ± 0,02	2,51 ± 0,03	638,1 ± 0,1	650,1 ± 0,5
	6 hodin	1,93 ± 0,05	2,55 ± 0,03	632,4 ± 0,6	642,4 ± 0,5
	24 hodin	2,26 ± 0,02	2,88 ± 0,10	632,6 ± 1,1	639,5 ± 0,4
AuFeCl <sub>2</sub>	20 minut	3,39 ± 0,05	2,45 ± 0,03	633,9 ± 0,1	649,8 ± 1,3
	6 hodin	1,97 ± 0,01	2,56 ± 0,03	628,1 ± 0,1	642,0 ± 0,1
	24 hodin	2,41 ± 0,03	2,96 ± 0,03	629,7 ± 0,1	641,4 ± 0,4

Zatímco procentuální zastoupení  $\alpha$ -helixu ve struktuře proteinu při pokojové teplotě s časem stoupá, při teplotě 37 °C dochází k trendu opačnému (viz Tabulka 8).

**Tabulka 8:** Procentuální zastoupení  $\alpha$ -helixu ve struktuře BSA dialyzovaných vzorků inkubovaných při teplotách 20 °C a 37 °C po dobu 20 minut, 6 hodin a 24 hodin.

Vzorek	Teplota [°C] Doba inkubace	$\alpha$ -helix [%]	
		20	37
Au	20 minut	14,73 ± 0,51	13,25 ± 1,06
	6 hodin	16,27 ± 0,23	15,85 ± 1,06
	24 hodin	17,83 ± 0,67	12,80 ± 1,27
AuFeCl <sub>2</sub>	20 minut	13,67 ± 0,80	15,05 ± 1,06
	6 hodin	15,85 ± 0,78	14,70 ± 1,70
	24 hodin	16,07 ± 0,68	12,10 ± 1,13

Z Tabulky 9 lze vyčíst, že hydrodynamický průměr je při pokojové teplotě zhruba o 1 nm větší než při 37 °C.

**Tabulka 9:** Hodnoty hydrodynamického průměru  $d_H$  dialyzovaných vzorků inkubovaných při teplotách 20 °C a 37 °C po dobu 20 minut a 24 hodin.

Vzorek	Teplota [°C] Doba inkubace	$d_H$ [nm]	
		20	37
Au	20 minut	6 ± 1	5 ± 1
	24 hodin	7 ± 1	5 ± 1
AuFeCl <sub>2</sub>	20 minut	6 ± 1	5 ± 1
	24 hodin	6 ± 1	5 ± 1

### 5.3.2 Vliv iontového složení roztoku

Kromě vlivu teploty jsme zkoumali i vliv iontového složení roztoku na vlastnosti našeho systému, konkrétně jsme se věnovali fluorescenčním vlastnostem připravených nanoklastrů ve fyziologickém roztoku a v PBS v porovnání s deionizovanou vodou při inkubaci při 37 °C.

K největšímu nárůstu kvantového výtěžku dochází při inkubaci vzorku v PBS, a to jak z hlediska časového, tak i z hlediska samotného vlivu složení roztoku (viz Tabulka 10). Naopak v diH<sub>2</sub>O jsou hodnoty kvantových výtěžků v každém čase nejmenší. Ve všech rozpouštědlech však dochází mezi 20 minutami a 24 hodinami k nárůstu kvantového výtěžku.

**Tabulka 10:** Kvantové výtěžky  $\Phi$  dialyzovaných vzorků inkubovaných v  $\text{diH}_2\text{O}$ , ve fyziologickém roztoku (FR) a v PBS při teplotě  $37^\circ\text{C}$  po dobu 20 minut, 6 hodin a 24 hodin.

Vzorek	Doba inkubace Prostředí	$\Phi$ [%]		
		20 minut	6 hodin	24 hodin
Au	$\text{diH}_2\text{O}$	$2,51 \pm 0,03$	$2,55 \pm 0,03$	$2,88 \pm 0,10$
	FR	$3,11 \pm 0,01$	$3,02 \pm 0,05$	$3,39 \pm 0,10$
	PBS	$3,60 \pm 0,10$	$4,57 \pm 0,05$	$5,36 \pm 0,05$
AuFeCl <sub>2</sub>	$\text{diH}_2\text{O}$	$2,45 \pm 0,03$	$2,56 \pm 0,03$	$2,96 \pm 0,03$
	FR	$2,94 \pm 0,01$	$2,94 \pm 0,09$	$3,16 \pm 0,02$
	PBS	$3,44 \pm 0,08$	$4,51 \pm 0,05$	$5,13 \pm 0,11$

Také poloha maxima fluorescenčního pásu se mění vlivem přítomnosti testovaných roztoků v průběhu času: v případě  $\text{diH}_2\text{O}$  a FR je emisní vlnová délka maxima po 20 minutách inkubace okolo 650 nm, kdežto v případě PBS je již o 3 až 4 nm nižší (viz Tabulka 11). Ve všech případech poloha maxima fluorescenčního pásu postupně klesá. Po 24 hodinách jsou její hodnoty pro  $\text{diH}_2\text{O}$  a PBS okolo 640 nm, zatímco ve FR se maximum fluorescence posunulo pouze k 644 nm.

**Tabulka 11:** Emisní vlnové délky maxima  $\lambda_{\text{max}}$  dialyzovaných vzorků inkubovaných v  $\text{diH}_2\text{O}$ , ve fyziologickém roztoku (FR) a v PBS při teplotě  $37^\circ\text{C}$  po dobu 20 minut, 6 hodin a 24 hodin.

Vzorek	Doba inkubace Prostředí	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]		
		20 minut	6 hodin	24 hodin
Au	$\text{diH}_2\text{O}$	$650,1 \pm 0,5$	$642,4 \pm 0,5$	$639,5 \pm 0,4$
	FR	$650,0 \pm 0,9$	$644,9 \pm 1,1$	$644,0 \pm 0,7$
	PBS	$646,2 \pm 0,1$	$642,0 \pm 0,3$	$639,4 \pm 0,7$
AuFeCl <sub>2</sub>	$\text{diH}_2\text{O}$	$649,8 \pm 1,3$	$642,0 \pm 0,1$	$641,4 \pm 0,4$
	FR	$650,1 \pm 0,3$	$646,0 \pm 1,1$	$644,5 \pm 1,8$
	PBS	$647,4 \pm 0,4$	$642,0 \pm 1,1$	$639,7 \pm 0,3$

Sekundární struktura proteinu se pod vlivem iontového složení roztoku mírně mění. Procentuální zastoupení  $\alpha$ -helixu je v případě FR a PBS vyšší než u vzorku v  $\text{diH}_2\text{O}$  (viz Tabulka 12). V průběhu času dochází k poklesu zastoupení  $\alpha$ -helikální složky, a to téměř ve všech případech.



**Tabulka 12:** Procentuální zastoupení  $\alpha$ -helixu ve struktuře BSA dialyzovaných vzorků inkubovaných v  $\text{diH}_2\text{O}$ , ve fyziologickém roztoku (FR) a v PBS při teplotě  $37^\circ\text{C}$  po dobu 20 minut, 6 hodin a 24 hodin.

Vzorek	Doba inkubace Prostředí	$\alpha$ -helix [%]		
		20 minut	6 hodin	24 hodin
Au	$\text{diH}_2\text{O}$	$13,25 \pm 1,06$	$15,85 \pm 1,06$	$12,80 \pm 1,27$
	FR	$17,30 \pm 1,13$	$16,65 \pm 0,49$	$15,45 \pm 0,07$
	PBS	$18,25 \pm 0,35$	$17,30 \pm 1,27$	$15,30 \pm 0,00$
AuFeCl <sub>2</sub>	$\text{diH}_2\text{O}$	$15,05 \pm 1,06$	$14,70 \pm 1,70$	$12,10 \pm 1,13$
	FR	$16,50 \pm 0,28$	$17,50 \pm 0,57$	$15,95 \pm 0,49$
	PBS	$17,70 \pm 3,25$	$17,05 \pm 4,60$	$14,55 \pm 2,33$

Iontové složení roztoku ovlivňuje rovněž hydrodynamický průměr částic v jednotlivých typech vzorků: v případě FR a PBS je dvojnásobný oproti vzorkům v  $\text{diH}_2\text{O}$  (viz Tabulka 13). Delší doba inkubace se již dále neprojevuje žádnými velkými změnami.

**Tabulka 13:** Hodnoty hydrodynamického průměru  $d_H$  dialyzovaných vzorků inkubovaných v  $\text{diH}_2\text{O}$ , ve fyziologickém roztoku (FR) a v PBS při teplotě  $37^\circ\text{C}$  po dobu 20 minut, 6 hodin a 24 hodin.

Vzorek	Doba inkubace Prostředí	$d_H$ [nm]	
		20 minut	24 hodin
BSA	$\text{diH}_2\text{O}$	$4 \pm 1$	$3 \pm 1$
	FR	$7 \pm 1$	$7 \pm 1$
	PBS	$7 \pm 1$	$6 \pm 1$
Au	$\text{diH}_2\text{O}$	$5 \pm 1$	$5 \pm 1$
	FR	$10 \pm 1$	$9 \pm 1$
	PBS	$10 \pm 1$	$10 \pm 1$
AuFeCl <sub>2</sub>	$\text{diH}_2\text{O}$	$5 \pm 1$	$5 \pm 1$
	FR	$8 \pm 1$	$10 \pm 1$
	PBS	$9 \pm 1$	$9 \pm 1$

V Tabulce 14 jsou uvedeny hodnoty doby života excitovaného stavu, přičemž nejdelší složka dosahuje hodnot zhruba okolo 400 ns. Další složky dosáhly hodnot řádově v jednotkách ns až stovkách ps. Rozdíly mezi testovanými iontovými roztoky jsou v rámci intervalu spolehlivosti.

**Tabulka 14:** Doby života excitovaného stavu  $\tau$  dialyzovaných vzorků ( $AuFeCl_2$ , 98BSA-AuNCs) inkubovaných v  $diH_2O$ , ve fyziologickém roztoku (FR) a v PBS při teplotě 37 °C po dobu 6 hodin. V ostrých závorkách jsou uvedeny 68% intervaly spolehlivosti. Vzorek 98BSA-AuNCs je tvořen pouze zlatem a byl připraven stejným způsobem jako  $AuFeCl_2$ .

Vzorek	Prostředí	$\tau_1$ [ns]	$\tau_2$ [ns]	$\tau_3$ [ns]	$\tau_4$ [ns]
98BSA-AuNCs*	$diH_2O$	369,2 (332,7;423,0)	11,1 (7,8;16,8)	2,0 (1,6;2,5)	0,2 (0,1;0,3)
	$diH_2O$	378,6 (335,1;435,2)	6,0 (5,2;7,1)	1,0 (0,8;1,2)	0,06 (0,01;0,71)
$AuFeCl_2$	FR	455,6 (390,3;585,9)	7,2 (5,9;10,6)	1,4 (1,1;1,9)	0,13 (0,10;0,16)
	PBS	474,5 (414;590,9)	7,74 (6,4;10,0)	1,526 (1,16;2,079)	0,178 (0,139;0,228)

\* hodnoty převzaty z Andryšková a kol. (2020).

## 6 Diskuze

Prvotní vzorky jsme připravovali postupem, který se od toho uvedeného v kapitole 4.2 liší ve dvou skutečnostech. Místo 5mM koncentrace zásobního roztoku prekurzorů železa jsme používali 11mM a vzorky jsme po syntéze nevkládali do ledu. Díky těmto odlišnostem jsme na dně vialek pozorovali sedimentované agregáty (viz Obrázek 4) již po několika hodinách od syntézy. Jelikož k tomuto jevu nedocházelo u referenčního vzorku, jenž obsahuje pouze zlato, přisoudili jsme agregaci železné složce. Z toho důvodu jsme si přichystali koncentrační řadu (viz Obrázek 4) přidáváním zásobního roztoku prekurzoru a deionizované vody v různých poměrech. Následující dny jsme vždy ve stejnou dobu pořizovali fotografie vzorků, ze kterých jsme následně určovali, ve kterém dni začal vzorek dané koncentrace železa agregovat (graficky shrnuto na Obrázku 5).

Nejen železná složka má své úskalí, jež se časem projevuje. Pokud se v roztoku nachází dostatečné množství zlatitých iontů, mohou po určitém čase nanoklastry přerůst v nanočástice, což v konečném důsledku znamená ztrátu fluorescenčních vlastností. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli provádět dialýzu vzorků, která do určité míry umožňuje přebytečné ionty odstranit. Jelikož jsme chtěli dosáhnout co možná nejvyšší intenzity fluorescence, největšího množství železa ve vzorku a současně jsme si chtěli být jistí, že před provedením dialýzy nedojde k agregaci, zvolili jsme pro všechny další experimenty 5mM koncentraci zásobního roztoku všech prekurzorů železa.

Dialýza však představuje zásah do našeho systému. Během ní totiž dochází současně k ředění roztoku a k postupnému snižování pH v okolí proteinu a přístupných nanoklastrů. Proto jsme vzápětí studovali vliv dialýzy na strukturu BSA a na optické vlastnosti Au-Fe nanoklastrů.

Nejprve vzorky porovnáme pomocí metod poskytujících informace o sekundární struktuře proteinu. Při pohledu na spektra cirkulárního dichroismu (viz Obrázek 6) lze s určitostí říci, že se protein v případě nedialyzovaných i dialyzovaných vzorků (jejichž pH však bylo po dialýze upraveno) svou sekundární strukturou neliší, což znamená, že změny, ke kterým během dialýzy dochází, jsou reverzibilní. Jak bylo totiž zmíněno výše, pH prostředí se při dialýze postupně snižuje, což dle výsledků Chi a kol. (2018) ovlivňuje procentuální zastoupení  $\alpha$ -helixu ve struktuře proteinu, a proto pH po dialýze upravujeme. Zastoupení je v obou případech okolo 16 %, přičemž Topalá a kol. (2014) uvádějí, že procentuální zastoupení  $\alpha$ -helixu v BSA činí přibližně 74 %. Tento výrazný rozdíl není

však způsoben dialýzou, ale už samotnou syntézou nanoklastrů, během které protein vystavujeme postupně silně kyselému (přibližně pH 2) a silně zásaditému prostředí (přibližně pH 12). V případě infračervených spekter (viz Obrázek 7) se soustředíme na oblast v rozsahu 1800 – 1250  $\text{cm}^{-1}$ , která je charakteristická pro vibrace amidové vazby (Ji a kol. 2020). Velký rozdíl mezi nedialyzovanými a dialyzovanými vzorky je patrný v rozmezí 1600 – 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Tento výsledek nemusí nutně odporovat cirkulárnímu dichroismu, jelikož v případě infračervené spektroskopie měříme vzorek v usušeném stavu.

Pohledem na excitačně-emisní spektra (viz Obrázek 8) si můžeme povšimnout několika odlišností. Snadno viditelným rozdílem je různá intenzita fluorescence, která je v případě dialyzovaných vzorků vyšší, což je ve shodě s hodnotami kvantového výtěžku uvedenými v Tabulce 3. Další rozdíl je ve vlnové délce maxima emise, jež v případě dialyzovaných vzorků podléhá hypsochromnímu posunu. Během syntézy vystavujeme protein jak kyselému, tak zásaditému pH, a protože konformace BSA je závislá na pH okolního prostředí, mohla se na povrch proteinu dostat nějaká cysteinová rezidua. Ve srovnání s vnitřní částí proteinu nejsou nanoklastry na jeho povrchu prostorově omezeny, a tudíž by mohly být větší. To, že by při dialýze mohly být odstraněny, by mohlo vysvětlit posun emise a různý tvar spekter.

Na Obrázku 9 si zase můžeme povšimnout toho, že kdybychom vzorky nedialyzovali, docházelo by u nich s časem k postupnému bathochromnímu posunu, což jen vyjadřuje skutečnost, že nedialyzované vzorky obsahují dostatečné množství zlatitých iontů k dalšímu růstu, který by mohl vést ke vzniku nanočástic (ty však už, na rozdíl od nanoklastrů, nevykazují fluorescenci nýbrž plasmonovou rezonanci, jak je porovnáno na Obrázku 11).

To lze rovněž vyvodit z hodnot zeta potenciálu (viz Tabulka 5), jenž v případě všech dialyzovaných vzorků nabývá zápornějších hodnot. Ty mohou být vysvětleny tím, že podstatnou část kladných iontů zlata (a také železa) jsme z roztoku během dialýzy odstranili, díky čemuž jsme vzorky stabilizovali, a to jak proti přerůstání v nanočástice, tak proti agregaci. Ve srovnání s nedialyzovanými vzorky, které podlely agregaci již po několika dnech, nedošlo k agregaci dialyzovaných vzorků ani po pěti měsících od přípravy.

Tyto výsledky souhlasí také s výsledky z ICP-MS (viz Tabulka 4), kdy při dialýze ve třetím dni od syntézy vzorků došlo k odstranění určitého množství zlatitých iontů. Zajímavostí je, že BSA už samo o sobě obsahuje železo, což zdůvodňuje vyšší hmotnost

železa v nedialyzovaném vzorku. Drtivá většina tohoto železa je ovšem během dialýzy odstraněna, což znamená, že k proteinu nebylo pevně vázáno.

Pro měření některých metod bylo nutné vzorky ředit, proto jsme také zkoumali, jak je tímto fluorescence ovlivňována. Zjistili jsme, že dochází jak k poklesu intenzity fluorescence (viz Obrázek 10), tak k hypsochromnímu posunu (viz Obrázek 11). Když jsme vzorky znovu promíchali, vrátila se intenzita téměř na původní hodnotu a začala opět klesat. Vysvětlili jsme si to tím, že po zředění a promísení dochází pravděpodobně k usazování větších částic, což má za následek snižování intenzity a posun spektra. Protože během této doby není fluorescence stabilní, veškerá měření jsme prováděli až po 20 minutách od zředění.

Abychom vůbec mohli charakterizovat námi připravené vzorky, bylo nejprve nutné ověřit, zda zlaté nanoklastry nepřerostly v nanočástice, přestože jsme provedli dialýzu. Jak již bylo zmíněno výše, při přerůstání v nanočástice ztrácejí nanoklastry postupně své fluorescenční vlastnosti. Intenzita fluorescence však může být ovlivněna mnoha faktory, jakými jsou například teplota nebo pH okolního prostředí (Chib a kol. 2015), a proto není její měření výhodné. Oba systémy se nicméně liší svými absorpčními spektry (viz Obrázek 12), kdy v případě nanočástic můžeme absorpční pás při 520 nm přisoudit efektu povrchové plazmonové rezonance (Li a kol. 2011), který se u nanoklastrů z důvodu jejich menší velikosti nevyskytuje. Kromě těchto spekter je pozorovatelná také změna barvy roztoku z tmavě oranžové na růžovou až fialovou, která je odrazem rozdílných absorpcí právě v důsledku zmíněného efektu. V ultrafialové oblasti spektra nanoklastrů se nachází charakteristický pás při 277 nm odpovídající absorpci aromatických aminokyselinových residuí obsažených v proteinu (Topalá a kol. 2014).

Abychom mohli studovat fluorescenční chování našeho systému, museli jsme zjistit, v jaké spektrální oblasti nanoklastry emitují a jakou vlnovou délkou je máme excitovat. Proto jsme nejdříve provedli měření 3D excitačně-emisních spekter (viz Obrázek 13), které vykazují tři charakteristické oblasti. Oblast A přísluší převážně tryptofanovým residuům BSA (Chib a kol. 2015, Topalá a kol. 2014). Oblast B je často přiřazována buďto malým nanoklastrům emitujícím v modré oblasti (Mali a kol. 2013), nebo oxidovaným tyrozinovým residuům BSA (Andrýsková a kol. 2020). A nakonec zde máme ještě oblast C, jež náleží nanoklastrům emitujícím v oblasti červené (Mali a kol. 2013). Právě v této oblasti jsme hledali maximum intenzity fluorescence, které obdržíme při excitaci vzorku vlnovou délkou 270 nm.

Je známo, že BSA ve své struktuře obsahuje celkem 35 cysteinových residuí, která mohou sloužit jako nukleační centra zlatých nanoklastrů (Le Guével a kol 2011, Russel a kol. 2015, Dixon a Egusa 2018). Ze simulací molekulové dynamiky, kterou provedl Russell a kol. (2015), vyplývá, že v BSA mohou vznikat nanoklastry odlišných velikostí a na různých místech. To by mohlo vysvětlit existenci dvou maxim v emisním spektru (viz Obrázek 14). Emisní vlnová délka je totiž závislá na velikosti kovového jádra (Zheng a kol. 2004), z čehož lze usoudit, že připravené nanoklastry mají různou velikost. Výsledné spektrum je poté dáno kombinací spekter nanoklastrů jednotlivých velikostí, takže vidíme pouze jakousi obálku.

Prostřednictvím fluorescence jsme mohli charakterizovat zlatou složku. Vlastnosti železné složky jsme studovali pomocí Mössbauerovy spektroskopie a relaxometrie. Aby mohly být naše vzorky využity při zobrazování magnetickou rezonancí, musejí přinejmenším reagovat na pulzní magnetické pole. Podle nabitovaných hyperjemných parametrů (viz Obrázek 15) bylo zjištěno, že se v našem systému železo nachází ve formě superparamagnetických nanočástic oxidu železitého ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), přičemž nanočástice oxidů železa se užívají jako  $T_2$  kontrastní látky poskytující při zobrazování negativní signál (Huang a kol. 2018) v důsledku toho, že procesy spojené se spin-spinovou relaxací vedou ke ztrátám intenzity signálu (Tromsdorf a kol. 2007).

Ze vztahu (5) lze vyvodit, že pro dosažení nejvyššího kontrastu potřebujeme, aby rozdíl relaxačních dob (resp. jejich reciprokových hodnot) tkáně v přítomnosti a v nepřítomnosti kontrastní látky byl co největší. Jinými slovy, snažíme se o to, abychom obdrželi co nejvyšší hodnoty ze součinu relaxivity a koncentrace kontrastní látky, jejíž zvyšování je ovšem limitováno cytotoxicitou. Získané hodnoty relaxivity jsou uvedeny v Tabulce 6. Porovnáním s výsledky Guo a kol. (2019), Pan a kol. (2017) a Wang a kol. (2015b) pozorujeme, že naše hodnoty jsou o několik řádů menší, což by mohlo být způsobeno jinými povrchovými vlastnostmi, různou velikostí či odlišným stupněm agregace nanočástic (Tromsdorf a kol. 2007). Srovnáme-li ovšem referenční vzorek se vzorky, které železo obsahují (viz Tabulka 6), zjistíme, že určitá míra kontrastu je pozorovatelná.

Abychom mohli predikovat chování našeho materiálu v biologickém systému, zkoumali jsme po charakterizaci vliv teploty a iontového složení roztoku na strukturu BSA a na optické vlastnosti nanoklastrů. Teplotu 37 °C pro inkubaci jsme zvolili pro otestování, jelikož jde o teplotu lidského těla (budoucí využití nanoklastrů coby kontrastní látky pro zobrazování), a rovněž proto, že jsou při této teplotě inkubovány v PBS

nanoklastry spolu s buňkami pro testování životaschopnosti těchto buněk. Z toho důvodu jsme zkoumali i vliv tohoto pufru.

Lze si povšimnout, že po 20 minutách inkubace při pokojové teplotě mají oba systémy větší kvantový výtěžek než při teplotě 37 °C (viz Tabulka 7). Toto pozorování odpovídá výsledkům Chib a kol. (2015), Jia a kol. (2018) a Xu a kol. (2014), kteří s rostoucí teplotou zaznamenali pokles intenzity fluorescence. Jia a kol. (2018) to vysvětlují tím, že s rostoucí teplotou roste frekvence srážek molekul, a tím i množství nezářivých přechodů, zatímco množství zářivých přechodů zůstává konstantní, což v konečném důsledku vede ke snižování intenzity fluorescence. Dodáním tepla může docházet k narušení vodíkových vazeb a nepolárních hydrofobních interakcí, které mohou způsobit lokální změnu v blízkém okolí tryptofanu, což ovlivní jeho optické vlastnosti (Chib a kol. 2015). Tyto změny se ovšem projeví i na fluorescenci nanoklastrů, jelikož mezi nimi a tryptofanem probíhá FRET, který byl demonstrován Raut a kol. (2014).

Změny v kvantovém výtěžku a emisní vlnové délce maxima mohou být výsledkem konformačních změn proteinu, přestože sekundární struktura nevykazuje výrazné změny (viz Tabulka 8). Hodnoty hydrodynamického průměru zůstávají i po 24 hodinách pro obě teploty konstantní (viz Tabulka 9), nedochází tedy ke vzniku žádných dimerů či vyšších struktur.

Z Tabulek 10 a 11 je patrné, že nanoklastry vykazují solvatochromní efekt, což potvrzují i výsledky Díez a kol. (2009) a Zhou a kol. (2009). Na rozdíl od diH<sub>2</sub>O a FR došlo v případě PBS k prudkému nárůstu kvantového výtěžku, což můžeme pravděpodobně přisuzovat větší iontové síle (viz Tabulka 10). Také Xu a kol. (2014) pozorovali vyšší intenzitu fluorescence nanoklastrů v PBS oproti těm ve vodě. FR sice také obsahuje ionty (sodné a chloridové), avšak ty se nacházejí rovněž v diH<sub>2</sub>O, jelikož jsme při syntéze užívali NaOH a prekurzory obsahující chloridy. Dialýza by však měla téměř veškeré ionty z diH<sub>2</sub>O odstranit, takže by se tato dvě prostředí měla lišit pouze v jejich koncentraci, což možná může vysvětlit větší kvantový výtěžek v případě FR (oproti diH<sub>2</sub>O).

V Tabulce 13 můžeme vypořádat, že v případě všech tří vzorků dochází ve FR a PBS k přibližně zdvojnásobení hodnoty hydrodynamického průměru oproti vzorkům v diH<sub>2</sub>O, což by odpovídalo vzniku dimeru BSA v rozpouštědle o větší iontové síle. Tuto domněnku podporují výsledky Zhang a kol. (2007), kteří zjistili, že při nízkých hodnotách

iontové síly ( $I < 0,3 \text{ M}$ ) převládají mezi molekulami BSA odpudivé elektrostatické síly, a naopak při vyšší iontové síle ( $I > 1 \text{ M}$ ) byly pozorovány síly přitažlivé.

Důsledkem vzniku dimeru by mohla být jemná změna v sekundární struktuře proteinu (viz Tabulka 12). Ta by také mohla odrážet i drobné rozvolňování proteinu, během kterého by mohlo dojít k odhalení některých nanoklastrů rozpouštědla. Rovněž by se rozvolňováním mohla změnit i vzdálenost a poloha mezi nanoklastry a tryptofanovými residui, což by ovlivnilo FRET. Obě tyto možnosti mají samozřejmě vliv na optické vlastnosti nanoklastrů.

Změny v procentuálním zastoupení  $\alpha$ -helixu jsou ovšem jak v různých iontových prostředích (viz Tabulka 12), tak i při různých teplotách (viz Tabulka 8) pomalé, což naznačuje, že dochází k postupnému přizpůsobování systému odlišným vnějším podmínkám.

Doba života excitovaného stavu Au-Fe nanoklastrů činí v průměru zhruba 400 ns (viz Tabulka 14), což je přibližně o dva řády více než v případě ostatních komponent (např. rozpouštědlo, protein, komplexy se zlatem), jejichž doby života jsou řádově v desítkách ps až v jednotkách ns. Pokud porovnáme vzorky obsahující zlato i železo a vzorek obsahující pouze zlato, všimneme si, že rozdíly jejich dob života jsou v rámci intervalu spolehlivosti. To nepřímě vyjadřuje, že vazebná místa zlatitých a železnatých (případně železitých) iontů jsou různá a že ionty železa neovlivňují vaznost iontů zlata. V opačném případě by se to na době života excitovaného stavu projevilo.



## 7 Závěr

V této diplomové práci byly nejprve v přehledu problematiky popsány odlišné způsoby přípravy, vlastnosti a různé možnosti využití zlatých a Au-Fe nanoklastrů. V experimentální části jsme se poté zabývali syntézou a charakterizací připravených Au-Fe nanoklastrů a vlivem vnějších faktorů na jejich optické vlastnosti a na strukturu hovězího sérového albuminu.

Na začátku experimentální práce jsme se věnovali agregaci vzorků, kterou jsme však úspěšně eliminovali díky včasné dialýze, jejíž vliv jsme proto posléze studovali. Díky hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem bylo zjištěno, že během dialýzy dochází k odstranění určitého množství zlatitých iontů z roztoku, což potvrzují i hodnoty zeta potenciálu. Z výsledků cirkulárního dichroismu vyplývá, že sekundární struktura dialyzovaných vzorků se od těch nedialyzovaných neliší. V infračervených spektrech jsou sice změny v oblastech amidů patrné, avšak ty by mohly souviset s tím, že v rámci této metody jsou vzorky měřeny v usušeném stavu. V případě dialyzovaných vzorků ovšem došlo ke změně tvaru emisního spektra, k hypsochromnímu posunu a rovněž ke zvýšení kvantového výtěžku.

Následně jsme prováděli charakterizaci materiálu. Při pohledu na emisní spektra jsme usoudili, že se v našem systému vyskytují zlaté nanoklastry různých velikostí. Složku obsahující Fe jsme zkoumali pomocí Mössbauerovy spektroskopie, díky které bylo zjištěno, že se železo v našich vzorcích nachází ve formě superparamagnetických nanočástic oxidu železitého. Z měření relaxačních časů byly určeny hodnoty relaxivit vzorků a prostřednictvím zobrazování magnetickou rezonancí byl vypočítán poměr kontrastu a šumu. Výsledné relaxivity jsou ve srovnání s literaturou nízké, tudíž je nutné na tomto problému ještě zapracovat. Nicméně určitá míra kontrastu je pozorovatelná.

Po charakterizaci jsme studovali vliv teploty a iontového složení roztoku na výše zmíněné parametry. Z hodnot procentuálního zastoupení  $\alpha$ -helixu ve struktuře proteinu bylo vidět, že v důsledku obou vlivů dochází pouze k drobným změnám sekundární struktury. Naproti tomu hodnoty hydrodynamického průměru se u vzorků inkubovaných ve fyziologickém roztoku a v pufru (PBS) oproti vzorkům v deionizované vodě zvýšily dvojnásobně. Na základě výsledků z fluorescenční spektroskopie navrhuje pro použití nanoklastrů při zobrazování, aby se nejdříve ponechaly v PBS při 37 °C po dobu 24 hodin a až následně inkubovaly s testovanými buňkami. Tento postup by mohl zvýšit intenzitu fluorescence, a tudíž i účinnost měření.

## 8 Seznam použité literatury

- Adhikari B., Banerjee A. (2010) Facile Synthesis of Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters and Hg<sup>II</sup> Sensing. *Chemistry of Materials* **22**, 4364-4371.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015) *Molecular biology of the cell*. 6. vydání, Garland Science, New York, Spojené státy americké, 1465 stran.
- Andrýsková P., Machalová Šišková K., Michetschlängerová Š., Jiráková K., Kubala M., Jiráček D. (2020) The Effect of Fatty Acids and BSA Purity on Synthesis and Properties of Fluorescent Gold Nanoclusters. *Nanomaterials* **10**:343.
- Bao Y., Zhong C., Vu D.M., Temirov J.P., Dyer R.B., Martinez J.S. (2007) Nanoparticle-Free Synthesis of Fluorescent Gold Nanoclusters at Physiological Temperature. *The Journal of Physical Chemistry C* **111**, 12194-12198.
- Bhattacharjee S. (2016) DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **235**, 337-351.
- Brouwer A.M. (2011) Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **83**, 2213-2228.
- Cao X.L., Li H.W., Yue Y., Wu Y. (2013) pH-Induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@BSA and its effects on NCs emission. *Vibrational Spectroscopy* **65**, 186-192.
- Clogston J.D., Patri A.K. (2011) Zeta Potential Measurement. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 697, (McNeil S.E.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 8 stran.
- Curry S. (2004) Plasma albumin as a fatty acid carrier. *Advances in Molecular and Cell Biology* **33**, 29-46.
- Dixon J.M., Egusa S. (2018) Conformational Change-Induced Fluorescence of Bovine Serum Albumin-Gold Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **140**, 2265-2271.
- Díez I., Pusa M., Kulmala S., Jiang H., Walther A., Goldmann A.S., Müller A.H.E., Ikkala O., Ras R.H.A. (2009) Color Tunability and Electrochemiluminescence of Silver Nanoclusters. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 2122-2125.
- Díez I., Ras R.H.A. (2010) Few-Atom Silver Clusters as Fluorescent Reporters. *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II* **9**, 307-332.
- Duan H., Nie S. (2007) Etching Colloidal Gold Nanocrystals with Hyperbranched and Multivalent Polymers: A New Route to Fluorescent and Water-Soluble Atomic Clusters. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 2412-2413.
- Fang Y.M., Song J., Li J., Wang Y.W., Yang H.H., Sun J.J., Chen G.N. (2011) Electrogenerated chemiluminescence from Au nanoclusters. *Chemical Communications* **47**, 2369-2371.
- Frangioni J.V. (2003) *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**, 626-634.
- Glassford S.E., Byrne B., Kazarian S.G. (2013) Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1834**, 2849-2858.
- González B.S., Rodríguez M.J., Blanco C., Rivas J., López-Quintela M.A., Martinho J.M.G. (2010) One Step Synthesis of the Smallest Photoluminescent and Paramagnetic PVP-Protected Gold Atomic Clusters. *Nano Letters* **10**, 4217-4221.
- Guo H., Zhang Y., Liang W., Tai F., Dong Q., Zhang R., Yu B., Wong W.Y. (2019) An inorganic magnetic fluorescent nanoprobe with favorable biocompatibility for dual-modality bioimaging and drug delivery. *Journal of Inorganic Biochemistry* **192**, 72-81.
- Habeeb Muhammed M.A., Ramesh S., Sinha S.S., Pal S.K., Predeep T. (2008) Two Distinct Fluorescent Quantum Clusters of Gold Starting from Metallic Nanoparticles by pH-Dependent Ligand Etching. *Nano Research* **1**, 333-340.
- Habeeb Muhammed M.A., Verma P.K., Pal S.K., Kumar R.C.A., Paul S., Omkumar R.V., Pradeep T. (2009) Bright, NIR-Emitting Au<sub>23</sub> from Au<sub>25</sub>: Characterization and Applications Including Biolabeling. *Chemistry – A European Journal* **15**, 10110-10120.

- Han L., Xia J.M., Hai X., Shu Y., Chen X.W., Wang J.H. (2017) Protein-Stabilized Gadolinium Oxide-Gold Nanoclusters Hybrid for Multimodal Imaging and Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **9**, 6941-6949.
- Huang C.L., Hsieh W.J., Lin C.W., Yang H.W. Wang C.K. (2018) Multifunctional liposomal drug delivery with dual probes of magnetic resonance and fluorescence imaging. *Ceramics International* **44**, 12442-12450.
- Chen X., Baker G.A. (2013) Cholesterol determination using protein-templated fluorescent gold nanocluster probes. *Analyst* **138**, 7299-7302.
- Chen Y., Qiao J., Liu Q., Qi L. (2018) Ovalbumin-stabilized gold nanoclusters with ascorbic acid as reducing agent for detection of serum copper. *Chinese Chemical Letters* **29**, 366-370.
- Chen Y., Zheng X., Wang X., Wang C., Ding Y., Jiang X. (2014) Near-Infrared Emitting Gold Cluster-Poly(acrylic acid) Hybrid Nanogels. *ACS Macro Letters* **3**, 74-76.
- Chi Z., Hong B., Ren X., Cheng K., Lu Y., Liu X. (2018) Investigation on the conformational changes of bovine serum albumin in a wide pH range from 2 to 12. *Spectroscopy Letters* **51**, 279-286.
- Chib R., Butler S., Raut S., Shah S., Borejdo J., Gryczynski Z., Gryczynski I. (2015) Effect of Quencher, Denaturants, Temperature, pH on the Fluorescent Properties of BSA Protected Gold Nanoclusters. *Journal of Luminescence* **168**, 62-68.
- Cho S., Shin H.Y., Kim M.I. (2017) Nanohybrids consisting of magnetic nanoparticles and gold nanoclusters as effective peroxidase mimics and their application for colorimetric detection of glucose. *Biointerphases* **12**:01A401.
- Jacques V., Dumas S., Sun W.C., Troughton J.S., Greenfield M.T., Caravan P. (2010) High-Relaxivity Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents Part 2 Optimization of Inner- and Second-Sphere Relaxivity. *Investigative Radiology* **45**, 613-624.
- Ji Y., Yang X., Ji Z., Zhu L., Ma N., Chen D., Jia X., Tang J., Cao Y. (2020) DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components. *ACS Omega* **5**, 8572-8578.
- Jia Y., Zhao T., Jiang Y., Sun W., Zhao Y., Xin J., Hou Y., Yang W. (2018) Green, fast, and large-scale synthesis of highly fluorescent Au nanoclusters for Cu<sup>2+</sup> and temperature sensing. *Analyst* **143**, 5145-5150.
- Jiang H., Zhang Y., Wang X. (2014) Single cytidine units-templated syntheses of multi-colored water-soluble Au nanoclusters. *Nanoscale* **6**, 10355-10362.
- Jin L., Shang L., Guo S., Fang Y., Wen D., Wang L., Yin J., Dong S. (2011) Biomolecule-stabilized Au nanoclusters as a fluorescence probe for sensitive detection of glucose. *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 1965-1969.
- Kawasaki H., Hamaguchi K., Osaka I., Arakawa R. (2011) pH-Dependent Synthesis of Pepsin-Mediated Gold Nanoclusters with Blue, Green, and Red Fluorescent Emission. *Advanced Functional Materials* **21**, 3508-3515.
- Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1751**, 119-139.
- Kennedy T.A.C., MacLean J.L., Liu J. (2012) Blue emitting gold nanoclusters templated by polycytosine DNA at low pH poly-adenine DNA at neutral pH. *Chemical Communications* **48**, 6845-6847.
- Koenig S.H., Brown R.D. (1990) Field-Cycling Relaxometry of Protein Solutions and Tissue: Implications for MRI. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **22**, 487-567.
- Le Guével X., Hötzer B., Jung G., Hollemeyer K., Trouillet V., Schneider M. (2011) Formation of Fluorescent Metal (Au, Ag) Nanoclusters Capped in Bovine Serum Albumin Followed by Fluorescence and Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C* **115**, 10955-10963.
- Lee C.C., MacKay J.A., Fréchet J.M.J., Szoka F.C. (2005) Designing dendrimers for biological applications. *Nature Biotechnology* **23**, 1517-1526.
- Leung R.W.K., Yeh S.C.A., Fang Q. (2011) Effects of incomplete decay in fluorescence lifetime estimation. *Biomedical Optics Express* **2**, 2517-2531.
- Li B., Du Y., Dong S. (2009) DNA based gold nanoparticles colorimetric sensors for sensitive and selective detection of Ag(I) ions. *Analytica Chimica Acta* **644**, 78-82.

- Li M., Johnson S., Guo H., Dujardin E., Mann S. (2011) A Generalized Mechanism for Ligand-Induced Dipolar Assembly of Plasmonic Gold Nanoparticle Chain Networks. *Advanced Functional Materials* **21**, 851-859.
- Li L., Li Z., Zhang H., Zhang S. Majeed I., Tan B. (2013) Effect of Polymer Ligand Structures on Fluorescence of Gold Clusters Prepared by Photoreduction. *Nanoscale* **5**, 1986-1992.
- Lin H., Li L., Lei C. Xu X., Nie Z., Guo M., Huang Y., Yao S. (2013) Immune-independent and label-free fluorescent assay for Cystatin C detection based on protein-stabilized Au nanoclusters. *Biosensors and Bioelectronics* **41**, 256-261.
- Lin Y.H., Tseng W.L. (2010) Ultrasensitive Sensing of  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  Based on the Fluorescence Quenching of Lysozyme Type VI-Stabilized Gold Nanoclusters. *Analytical Chemistry* **82**, 9194-9200.
- Link S., Beeby A., FitzGerald S., El-Sayed M.A., Schaaf T.G., Whetten R.L. (2002) Visible to Infrared Luminescence from a 28-Atom Gold Cluster. *The Journal of Physical Chemistry B* **106**, 3410-3415.
- Liu K., Rykov A.I., Wang J., Zhang T. (2015) Recent Advances in the Application of Mößbauer Spectroscopy in Heterogeneous Catalysis. In: *Advances in Catalysis*. Vol. 58, 1. vydání, (Jentoft F.C.), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, USA, 330 stran.
- Liu G., Shao Y., Wu F., Xu S., Peng J., Liu L. (2013) DNA-hosted fluorescent gold nanoclusters: sequence-dependent formation. *Nanotechnology* **24**:015503.
- Liu C.L., Wu H.T., Hsiao Y.H., Lai C.W., Shih C.W., Peng Y.K., Tang K.C., Chang H.W., Chien Y.C., Hsiao J.K., Cheng J.T., Chou P.T. (2011) Insulin-Directed Synthesis of Fluorescent Gold Nanoclusters: Preservation of Insulin Bioactivity and Versatility in Cell Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 7056-7060.
- Luo M., Di J., Li L., Tu Y., Yan J. (2018) Copper Ion Detection with Improved Sensitivity through Catalytic Quenching of Gold Nanocluster Fluorescence. *Talanta* **187**, 231-236.
- Mali B., Dragan A.I., Karolin J., Geddes C.D. (2013) Photophysical Characterization and  $\alpha$ -Type Delayed Luminescence of Rapidly Prepared Au Clusters. *The Journal of Physical Chemistry C* **117**, 16650-16657.
- McPartlin M., Mason R., Malatesta L. (1969) Novel Cluster Complexes of Gold(0)-Gold(1). *Chemical Communications* **7**, 334-334.
- Mihaljevič M., Strnad L., Šebek O. (2004) Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy* **98**, 123-130.
- Miles A.J., Wallace B.A. (2006) Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. *Chemical Society Reviews* **35**, 39-51.
- Naldini L., Cariati F., Simonetta G., Malatesta L. (1966) Gold-Tertiary Phosphine Derivatives with Intermetallic Bonds. *Chemical Communications* **18**, 647-648.
- Nasaruddin R.R., Chen T., Yan N., Xie J. (2018) Roles of thiolate ligands in the synthesis, properties and catalytic application of gold nanoclusters. *Coordination Chemistry Reviews* **368**, 60-79.
- Negishi Y., Nobusada K., Tsukuda T. (2005) Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap between Gold(I)-Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 5261-5270.
- Oliva R., Banerjee S., Cinar H., Ehrst C., Winter R. (2020) Alteration of Protein Binding Affinities by Aqueous Two-Phase Systems Revealed by Pressure Perturbation. *Scientific Reports* **10**:8074.
- Pan U.N., Khandelia R., Sanpui P., Das S., Paul A., Chattopadhyay A. (2017) Protein-Based Multifunctional Nanocarriers for Imaging, Photothermal Therapy, and Anticancer Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **9**, 19495-19501.
- Prosser V., Bakule R., Balgavý P., Beneš K., Čápek V., English J., Janáček O., Jelínek O., Jelínková E., Ludvík J., Nešpůrek S., Pančoška P., Pilař J., Pilný J., Sedlák B., Šichová H., Štěpánek J., Valvoda V., Vondřejš V., Zachová J. (1989) *Experimentální metody biofyziky*. 1. vydání, Academia, Praha, Česká republika, 716 stran.
- Rancourt D.G. (1998) Mössbauer spectroscopy in clay science. *Hyperfine Interactions* **117**, 3-38.

- Raut S., Chib R., Butler S., Borejdo J., Gryczynski Z., Gryczynski I. (2014) Evidence of energy transfer from tryptofan to BSA/HSA protected gold nanoclusters. *Methods and Applications in Fluorescence* **2**:035004.
- Roy S., Palui G., Banerjee A. (2012) The as-prepared gold cluster-based fluorescent sensor for the selective detection of As<sup>III</sup> ions in aqueous solution. *Nanoscale* **4**, 2734-2740.
- Russell B.A., Kubiak-Ossowska K., Mulheran P.A., Birch D.J.S., Chen Y. (2015) Locating the nucleation sites for protein encapsulated gold nanoclusters: a molecular dynamics and fluorescence study. *Physical Chemistry Chemical Physics* **17**, 21935-21941.
- Schaeffer N., Tan B., Dickinson C., Rosseinsky M.J., Laromaine A., McComb D.W., Stevens M.M, Wang Y., Petit L., Barentin C., Spiller D., Cooper A.I., Lévy R. (2008) Fluorescent or not? Size-dependent fluorescence switching for polymer-stabilized gold clusters in the 1.1-1.7 nm size range. *Chemical Communications* **34**, 3986-3988.
- Shang L., Azadfar N., Stockmar F., Send W., Trouillet V., Bruns M., Gerthsen D., Nienhaus G.U. (2011a) One-Pot Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Gold Clusters for Cellular Fluorescence Lifetime Imaging. *Small* **7**, 2614-2620.
- Shang L., Dong S., Nienhaus G.U. (2011b) Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today* **6**, 401-418.
- Shang L., Stockmar F., Azadfar N., Nienhaus G.U. (2013) Intracellular Thermometry by Using Fluorescent Gold Nanoclusters. *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 11154-11157.
- Shang L., Xu J., Nienhaus G.U. (2019) Recent advances in synthesizing metal nanocluster-based nanocomposites for application in sensing, imaging and catalysis. *Nano Today* **28**:100767.
- Shang L., Yang L., Stockmar F., Popescu R., Trouillet V., Bruns M., Gerthsen D., Nienhaus G.U. (2012) Microwave-assisted rapid synthesis of luminescent gold nanoclusters for sensing Hg<sup>2+</sup> in living cells using fluorescence imaging. *Nanoscale* **4**, 4155-4160.
- Shibu E.S., Sugino S., Ono K., Saito H., Nishioka A., Yamamura S., Sawada M., Nosaka Y., Biju V. (2013) Singlet-Oxygen-Sensitizing Near-Infrared-Fluorescent Multimodal Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 10559-10563.
- So P.T.C., Dong C.Y., Masters B.R., Berland K.M. (2000) Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2**, 399-429.
- Sun J., Jin Y. (2014) Fluorescent Au nanoclusters: recent progress and sensing applications. *Journal of Materials Chemistry C* **2**, 8000-8011.
- Tankovskaia S.A., Abrosimova K.V., Paston S.V. (2018) Spectral demonstration of structural transitions in albumins. *Journal of Molecular Structure* **1171**, 243-252.
- Tao Y., Lin Y., Ren J., Qu X. (2013) A dual fluorometric and colorimetric sensor for dopamine based on BSA-stabilized Au nanoclusters. *Biosensors and Bioelectronics* **42**, 41-46.
- Thomas R. (2004) *Practical Guide to ICP-MS*. 1. vydání, Scientific Solutions, Gaithersburg, Maryland, USA, 324 stran.
- Tian D., Qian Z., Xia Y., Zhu C. (2012) Gold Nanocluster-Based Fluorescent Probes for Near-Infrared and Turn-On Sensing of Glutathione in Living Cells. *Langmuir* **28**, 3945-3951.
- Topalá T., Bodoki A., Oprean L., Oprean R. (2014) Bovine serum albumin interactions with metal complexes. *Clujul Medical* **87**, 215-219.
- Tromsdorf U.I., Bigall N.C., Kaul M.G., Bruns O.T., Nikolic M.S., Mollwitz B., Sperling R.A., Reimer R., Hohenberg H., Parak W.J., Förster S., Beisiegel U., Adam G., Weller H. (2007) Size and Surface Effects on the MRI Relaxivity of Manganese Ferrite Nanoparticle Contrast Agents. *Nano Letters* **7**, 2422-2427.
- Wang Y., Cui Y., Zhao Y., Liu R., Sun Z., Li W., Gao X. (2012) Bifunctional peptides that precisely biomineralize Au clusters and specifically stain cell nuclei. *Chemical Communications* **48**, 871-873.
- Wang X., Wu P., Hou X., Lv Y. (2013a) An ascorbic acid sensor based on protein-modified Au nanoclusters. *Analyst* **138**, 229-233.
- Wang Y., Xu C., Zhai J., Gao F., Liu R., Gao L., Zhao Y., Chai Z., Gao X. (2015a) Label-Free Au Cluster Used for *in vivo* 2D and 3D Computed Tomography of Murine Kidneys. *Analytical Chemistry* **87**, 343-345.

- Wang C., Yao Y., Song Q. (2015b) Gold nanoclusters decorated with magnetic iron oxide nanoparticles for potential multimodal optical/magnetic resonance imaging. *Journal of Materials Chemistry C* **3**, 5910-5917.
- Wang J., Zhang G., Li Q., Jiang H., Liu C., Amatore C., Wang X. (2013b) *In vivo* self-bio-imaging of tumors through *in situ* biosynthesized fluorescent gold nanoclusters. *Scientific reports* **3**:1157.
- Wen Q., Gu Y., Tang L.J., Yu R.Q., Jiang J.H. (2013) Peptide-Templated Gold Nanocluster Beacon as a Sensitive- Label-Free Sensor for Protein Post-translational Modification Enzymes. *Analytical Chemistry* **85**, 11681-11685.
- Wu X., He X., Wang K., Xie C., Zhou B., Qing Z. (2010) Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging *in vivo*. *Nanoscale* **2**, 2244-2249.
- Wu Z., Jin R. (2010) On the Ligand's Role in the Fluorescence of Gold Nanoclusters. *Nano Letters* **10**, 2568-2573.
- Wu Y.T., Shanmugam C., Tseng W.B., Hsieh M.M., Tseng W.L. (2016) Gold Nanocluster-Based Fluorescent Probe for Simultaneous pH and Temperature Sensing and its Application to Cellular Imaging and Logic Gates. *Nanoscale* **8**, 11210-11216.
- Xie J., Zheng Y., Ying J.Y. (2009) Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 888-889.
- Xie J., Zheng Y., Ying J.Y. (2010) Highly selective and ultrasensitive detection of Hg<sup>2+</sup> based on fluorescence quenching of Au nanoclusters by Hg<sup>2+</sup>-Au<sup>+</sup> interactions. *Chemical Communications* **46**, 961-963.
- Xu Y., Sherwood J., Qin Y., Crowley D., Bonizzoni M., Bao Y. (2014) The role of protein characteristics in the formation and fluorescence of Au nanoclusters. *Nanoscale* **6**, 1515-1524.
- Yan L., Cai Y., Zheng B., Yuan H., Guo Y., Xiao D., Choi M.M.F. (2012) Microwave-assisted synthesis of BSA-stabilized and HSA-protected gold nanoclusters with red emission. *Journal of Materials Chemistry* **22**, 1000-1005.
- Yang T.Q., Peng B., Shan B.Q., Zong Y.X., Jiang J.G., Wu P., Zhang K. (2020) Origin of the Photoluminescence of Metal Nanoclusters: From Metal-Centered Emission to Ligand-Centered Emission. *Nanomaterials* **10**:261.
- Yu Y., Chen X., Yao Q., Yu Y., Yan N., Xie J. (2013) Scalable and Precise Synthesis of Thiolated Au<sub>10-12</sub>, Au<sub>15</sub>, Au<sub>18</sub>, and Au<sub>25</sub> Nanoclusters via pH Controlled CO Reduction. *Chemistry of Materials* **25**, 946-952.
- Yue Y., Li H.W., Liu T.Y., Wu Y. (2014) Exploring the role of ligand-BSA in the response of BSA-protected gold-nanoclusters to silver (I) Ions by FT-IR and circular dichroism spectra. *Vibrational Spectroscopy* **74**, 137-141.
- Yue Y., Liu T.Y., Li H.W., Liu Z., Wu Y. (2012) Microwave-assisted synthesis of BSA-protected small gold nanoclusters and their fluorescence-enhanced sensing of silver(I) ions. *Nanoscale* **4**, 2251-2254.
- Zhang H., Huang X., Li L., Zhang G., Hussain I., Li Z., Tan B. (2012) Photoreductive synthesis of water-soluble fluorescent metal nanoclusters. *Chemical Communications* **48**, 567-569.
- Zhang H., Liu Q., Wang T., Yun Z., Li G., Liu J., Jiang G. (2013) Facile preparation of glutathione-stabilized gold nanoclusters for selective determination of chromium (III) and chromium (VI) in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* **770**, 140-146.
- Zhang F., Skoda M.W.A., Jacobs R.M.J., Martin R.A., Martin C.M., Schreiber F. (2007) Protein Interactions Studied by SAXS: Effect of Ionic Strength and Protein Concentration for BSA in Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry B* **111**, 251-259.
- Zhang L., Wang E. (2014) Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today* **9**, 132-157.
- Zhang Y., Zhang C., Xu C., Wang X., Liu C., Waterhouse G.L.N., Wang Y., Yin H. (2019) Ultrasmall Au nanoclusters for biomedical and biosensing applications: A mini-review. *Talanta* **200**, 432-442.
- Zheng T., Bott S., Huo Q. (2016) Techniques for Accurate Sizing of Gold Nanoparticles Using Dynamic Light Scattering with Particular Application to Chemical and Biological Sensing Based on Aggregate Formation. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 21585-21594.

- Zheng Y., Lai L., Liu W., Jiang H., Wang X. (2017) Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters. *Advances in Colloid and Interface Science* **242**, 1-16.
- Zheng J., Nicovich P.R., Dickson R.M. (2007) Highly Fluorescent Noble-Metal Quantum Dots. *Annual Review of Physical Chemistry* **58**, 409-431.
- Zheng J., Zhang C., Dickson R.M. (2004) Highly Fluorescent, Water-Soluble, Size-Tunable Gold Quantum Dots. *Physical Review Letters* **93**:077402.
- Zhou R., Shi M., Chen X., Wang M., Chen H. (2009) Atomically Monodispersed and Fluorescent Sub-Nanometer Gold Clusters Created by Biomolecule-Assisted Etching of Nanometer-Sized Gold Particles and Rods. *Chemistry – A European Journal* **15**, 4944-4951.
- Zhu M., Aikens C.M., Hollander F.J., Schatz G.C., Jin R. (2008) Correlating the Crystal Structure of A Thiol-Protected Au<sub>25</sub> Cluster and Optical Properties. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 5883-5885.

## 9 Internetové zdroje

- [1] BeStSel (Beta Structure Selection) [online]. [22. 7. 2020]. Dostupný z: <http://bestsel.elte.hu/index.php>.