



Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie

Značení nanočástic stříbra fluorescenčními barvivy

Bakalářská práce

Autor:	Lucie Válková
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Studijní program:	B1407/ Chemie
Studijní obor:	Nanomateriálová chemie
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2018

Prohlášení

Tímto prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. RNDr. Aleše Panáčka, Ph.D. Veškeré literární zdroje, které byly v rámci vypracování práce použity, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Lucie Válková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D., za cenné rady, ochotu a věnovaný čas při vypracování této práce. Za snímky myších fibroblastů z fluorescenčního mikroskopu děkuji paní Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D. Paní laborantce Karle Slavíčkové děkuji za vstřícnost a pomoc v laboratoři. Mé poděkování patří také Katedře fyzikální chemie PŘF UP v Olomouci za umožnění provedení potřebných experimentů. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za trpělivost a vřelou podporu při studiu.

Bibliografická identifikace

Autor: Lucie Válková
Název práce: Značení nanočástic stříbra fluorescenčními barvivy
Typ práce: Bakalářská práce
Pracoviště: Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce: doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt: Cílem této bakalářské práce je syntéza a fluorescenční značení nanočástic stříbra pomocí Rhodaminu B isothiokyanátu za účelem následné detekce takto značených nanočástic stříbra v biologických systémech pomocí fluorescenční mikroskopie. Nanočástice stříbra byly charakterizovány pomocí UV/Vis spektrofotometrie, dynamického rozptylu světla a transmisní elektronové mikroskopie. Připravené nanočástice s navázaným fluoroforem byly použity ke sledování jejich interakce s eukaryotními buňkami kvasinek a myších fibroblastů prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu.

Klíčová slova: Nanočástice stříbra, Rhodamin B isothiokyanát, fluorescenční značení, fluorescenční mikroskopie
Počet stran: 53
Počet příloh: 0
Jazyk: Český

Bibliographic Identification

Author:	Lucie Válková
Title:	Labeling of silver nanoparticles using fluorescent dyes
Type of thesis:	Bachelor thesis
Department:	Department of Physical Chemistry
Supervisor:	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Year of defence:	2018
Abstract:	<p>The aim of this work is the synthesis of silver nanoparticles and their labeling using fluorescent dye – Rhodamin B isothiocyanate for subsequent detection of such labeled silver nanoparticles in biological systems using fluorescence microscopy. Silver nanoparticles were characterized by UV/Vis spectrophotometry, dynamic light scattering and transmission electron microscopy. The prepared fluorophore-bound nanoparticles were used to monitor their interaction with yeast and mouse fibroblast eukaryotic cells using a fluorescence microscope.</p>
Keywords:	Silver nanoparticles, Rhodamin B isothiocyanate, fluorescent labeling, fluorescence microscopy
Number of pages:	53
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Obsah

Úvod	8
1. Koloidní disperze.....	10
1.1. Historie užívání koloidů.....	10
1.2. Vlastnosti koloidních soustav.....	10
1.2.1. optické vlastnosti.....	11
1.2.1.1. Absorpce záření.....	11
1.2.1.2. Rozptyl záření.....	11
1.2.2. Elektrické vlastnosti.....	12
1.2.2.1. Model elektrické dvojvrstvy	12
1.3. Klasifikace koloidních soustav.....	13
2. Nanočástice stříbra	15
2.1. Syntéza nanočástic stříbra	15
2.1.1. Chemická syntéza	16
2.1.1.1. Tollensův proces	16
2.1.1.2. Redukce pomocí citrátu.....	17
2.1.1.3. Redukce pomocí NaBH ₄	17
2.1.2. Fyzikální syntéza	17
2.1.3. Biologická (zelená) syntéza.....	18
2.2. Vlastnosti nanočástic stříbra.....	19
2.2.1. Optické vlastnosti	19
2.2.2. Antibakteriální vlastnosti.....	20
2.2.3. Antivirové vlastnosti.....	21
2.2.4. Nanotoxicita	21
2.3. Aplikace nanočástic stříbra	22
2.3.1. Biosenzory	22
2.3.2. Medicínské aplikace	22
2.3.3. Dekontaminační technologie	23
2.3.4. Kosmetický průmysl.....	23
3. Fluorescenční značení	24
3.1. Fluorescence	24
3.1.1. Fluorescenční mikroskopie.....	26

3.2. Fluorescenční barviva.....	26
3.2.1. Rhodaminy.....	27
3.2.1.1. Rhodamin B isothiokyanát.....	27
3.3. Vazby fluoroforů na povrch nanočástic	28
4. Materiál a přístrojové vybavení.....	30
4.1. Chemikálie.....	30
4.2. Pomůcky a přístrojové vybavení	30
4.3. Příprava fluorescenčně značených nanočástic stříbra.....	31
4.4. Přečištění a charakterizace vzorků.....	32
4.5. Fluorescenční mikroskopie	32
4.5.1. Kvasinky vystavené značeným nanočásticím stříbra.....	32
4.5.2. Kvasinky vystavené RBITC za absence nanočástic stříbra	33
4.5.3. Myší fibroblasty vystavené značeným nanočásticím stříbra.....	33
5. Výsledky a diskuze	34
5.1. Fluorescenčně značené nanočástice stříbra	34
5.2. Fluorescenční mikroskopie kvasinek.....	40
5.3. Fluorescenční mikroskopie myších fibroblastů.....	44
Závěr.....	48
Summary.....	49
Seznam použité literatury	50
Zdroje obrázků	53

Úvod

Nanomateriály v současné době nachází využití téměř ve všech odvětvích lidské činnosti jako je například potravinářství, zemědělství, kosmetika, průmysl či dekontaminace životního prostředí. Velmi významnou roli sehrávají také v lékařství, především díky svým antibakteriálním vlastnostem, kdy otevírají nové možnosti jak bojovat a předcházet mnoha nemocem. Mezi nanomateriály s největším potenciálem využití se řadí kovové nanočástice, které vykazují zvýšenou chemickou aktivitu v důsledku jejich velké plochy povrchu. Nanočástice lze syntetizovat mnoha různými postupy, jenž vedou k variabilním tvarům, velikostem a stabilitě. Obecně lze tyto postupy rozčlenit do třech základních kategorií – chemická, fyzikální a biologická (zelená) syntéza.

Stále větší pozornost je věnována nanočásticím stříbra, na které je v současné době ve výzkumu kladen velký důraz a jejichž potenciální i praktické využití neustále roste. Pro komerční účely se užívají nejen díky svým jedinečným fyzikálním a chemickým vlastnostem, ale také pro relativně snadnou přípravu a velmi dobrou snášenlivost s živočišnými buňkami. Nanočástice stříbra také disponují antibakteriálními, antivirovými a antifungálními vlastnostmi. I když koncentrace stříbra, které jsou pro mikroorganismy toxické, nepředstavují pro člověka zdravotní riziko, je nutné při jejich užívání dbát jisté obezřetnosti. Nejpoužívanější metodou přípravy v dnešní době je chemická redukce stříbrné soli, která představuje snadný způsob syntézy stříbrných nanočástic v disperzi.

Vzhledem k stále častějším aplikacím nanočástic stříbra v biologických systémech je velmi důležité následné studium nanočástic po zavedení do organismu a jejich interakce s buňkami. Jednu z významných metod detekce umožňujících pozorování biomolekul, buněk a jednotlivých organel, představuje fluorescenční mikroskopie. Je využívána také pro měření interakcí proteinů, změn konformací a enzymatické aktivity. Díky značení nanočástic stříbra fluorescenčním barvivem Rhodaminem B isothiokyanátem, kterému je věnována tato bakalářská práce, je možné pozorovat jejich interakce s biologickými vzorky a organismy prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu.

Teoretická část

1. Koloidní disperze

Koloidní soustavy představují jednu ze tří základních typů tzv. disperzních soustav, jenž tvoří dvě základní části – disperzní fáze (dispersum, disperzní podíl) a disperzní prostředí (dispersens). Představují tak heterogenní směsi, kdy jedna fáze je jemně rozptýlena v druhé kontinuální fázi. Jsou významné hlavně díky svým jedinečným fyzikálně chemickým vlastnostem (např. závislost absorpce elektromagnetického záření na velikosti částic). Velikost částic v koloidních disperzích se pohybuje řádově v rozsahu jednotek nm až po jednotky μm . (1, 2)

1.1. Historie užívání koloidů

Základní povědomí o mezifázových jevech a koloidních systémech měli lidé již od pradávných dob. Nasvědčují tomu dodnes dochované záznamy, spisy a malby, které poukazují na využívání koloidních pigmentů ve starověkých civilizacích po celém světě. Uplatnění nacházely i v potravinářství, především při výrobě sýrů a pivovarnictví. Koloidní roztoky byly využívány také při výrobě keramiky, papíru a mnoha dalších řemeslech.

Pro usnadnění přepravy obrovských balvanů při stavbách monumentálních budov byl zase využíván lubrikační efekt mastných látek, jenž zamezoval tření a minimalizoval tak potřebnou vynaloženou sílu. (1)

1.2. Vlastnosti koloidních soustav

Specifické chování koloidních částic vyplývá z jejich malých rozměrů, resp. z jejich velice rozměrné plochy fázového rozhraní, na níž probíhají povrchové jevy (např. adsorpce, smáčení, adheze, atd.). Výsledné mezifázové vlastnosti řídí interakce mezi koloidními částicemi a tím makroskopické vlastnosti a chování celého koloidního systému. Tyto jevy jsou zodpovědné mimo jiné například za optické vlastnosti systému a jeho stabilitu vůči agregaci. (1)

Se zmenšující se velikostí částic se tedy zvětšuje plocha fázového rozhraní mezi disperzním prostředím a disperzním podílem. S klesající velikostí částic tak roste podíl povrchových molekul, které se stýkají s disperzním prostředím oproti množství molekul uvnitř

dispergovaných částic. Tak například částice s velikostí 1 nm je tvořena přibližně z 30 % povrchovými molekulami. (2)

1.2.1. Optické vlastnosti

Za typické charakteristické chování koloidů v praxi se považuje jejich interakce se světlem. Při dopadu elektromagnetického záření na koloidní soustavu dochází jednak k pravé absorpci a současně také k rozptylu dopadajícího záření. O tom, který z dějů bude převažovat, rozhoduje velikost částic v koloidním systému, jejich hustota a chemické složení disperzního podílu. (2, 3)

1.2.1.1. Absorpce záření

Absorbuje-li soustava záření, dochází k pohlcení kvanta elektromagnetického záření, což způsobuje změnu energie stavů vazebných a valenčních elektronů. Vnitřní energie molekul v daném systému se zvýší a přemění se v energii tepelnou. Absorpce záření (absorbance) lze matematicky popsat pomocí Lambert-Beerova zákona.

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon cd$$

Tato rovnice umožňuje kvantifikovat množství absorbovaného záření na základě podílu intenzity prošlého záření I a intenzity záření dopadajícího I_0 nebo pomocí součinu koncentrace látky c , tloušťky vrstvy, kterou prochází paprsek d a absorpčního koeficientu ϵ . Míru absorpce záření však nelze pomocí Lambert-Beerova zákona určit zcela přesně, neboť je navíc ovlivněna výše zmíněnou závislostí na velikosti částic v systému.

1.2.1.2. Rozptyl záření

Rozptyl záření je složitý úkaz, který podle okolností zahrnuje odraz, ohyb, lom a interferenci světla. Na rozdíl od absorpce nedochází při rozptylu světla ke změnám energetických stavů vazebných elektronů. Přijaté energetické kvantum je náhodně vyzářeno do všech směrů beze změn vlnové délky. Tento jev lze přirovnat k elastickému odrazu fotonu od částice. Poprvé byl rozptyl světla kvalitativně popsán již v 17. století anglickým fyzikem Johnem Tyndallem. Na jeho počest byl po něm pojmenován jev rozšiřujícího se paprsku ve tvaru kužele procházejícího

disperzním prostředím.

Pokud je klasický zdroj světla, jako je žárovka nebo výbojka, nahrazen zdrojem koherentního záření – laserem, potom v určitých směrech dochází k interferenci rozptýleného záření, která intenzitu rozptýleného záření zesílí. Zesílení rozptylu je také významně ovlivněno difúzním pohybem částic, což způsobuje výkyvy intenzity rozptýleného záření v čase od průměrné hodnoty. Toto kolísání bývá označováno jako dynamický rozptyl světla, pomocí něhož lze charakterizovat koloidy a určit tak velikost částic a jejich distribuci v kapalném prostředí. (2, 4). Další možností, jak určit velikost nanočástic, je transmisní elektronová mikroskopie (TEM), kdy na studovaný vzorek dopadají urychlené elektrony z elektronového děla a dochází k tzv. pružnému rozptylu světla. Dopadající elektrony procházejí elektronovým obalem atomů vzorku a v blízkosti jádra se vychylují. Velikost vychýlení je závislá na vzdálenosti procházejícího elektronu od jádra a na elektrickém náboji jádra. Rozptýlené elektrony jsou následně zachyceny clonou objektivu a nepodílí se tak na tvorbě obrazu na stínítku mikroskopu. (5)

1.2.2. Elektrické vlastnosti

Elektrický náboj na povrchu koloidních částic představuje velmi důležitou proměnnou, která rozhoduje o jejich chování v elektrickém poli a je také velmi důležitým faktorem ovlivňujícím stabilitu koloidních soustav. Pohyby elektricky nabitých částic v disperzním prostředí označujeme jako elektrokinetické jevy a patří mezi ně například elektroforéza, elektroosmóza, sedimentační potenciál a potenciál proudění. Jsou způsobeny elektrickým nábojem na fázovém rozhraní mezi disperzním prostředím a disperzním podílem, kde se náboje orientují opačně. Takto orientované opačně nabité náboje tvoří vrstvu nazývanou jako elektrická dvojrstva. Při vytvoření elektrické dvojrstvy dochází k vyrovnání těchto nábojů a je tak dosaženo elektroneutality. (2, 4)

1.2.2.1. Model elektrické dvojrstvy

Opačné uspořádání iontů v elektrické dvojrstvě je způsobeno elektrickým nábojem mezi povrchem koloidních částic a okolní kapalinou. Ten vzniká na povrchu koloidních částic z různých důvodů, například vlivem adsorpce iontů přítomných v kapalině nebo ionizací funkčních skupin na povrchu molekul. Přítomnost elektrického náboje uvnitř koloidu dává

vzniku elektrického pole, díky němuž se v těsné blízkosti částice nabitě ionty uspořádávají opačně a vzniká tak útvar nazývaný elektrická dvojrstva. Mezi povrchem částic a disperzním prostředím vzniká rozdíl elektrických potenciálů, který je závislý na koncentraci a povaze iontů. Znaménko celkového povrchového náboje pak udává znaménko potenciálu povrchového náboje částice.

Jako první vypracoval model elektrické dvojrstvy Helmholtz, jehož teorie je založena na uspořádání elektrické dvojrstvy obdobně jako v deskovém kondenzátoru, kde jsou opačné náboje v obou vrstvách zcela vykompenzovány. Dnes je rozložení opačně nabitých iontů v blízkosti fázového rozhraní nejčastěji popisováno pomocí Stern-Gouy-Chapmanovy teorie, podle níž není možné, aby ionty na povrchu částice byly schopny vázat stejné množství opačně nabitých iontů v protivrstvě. Ionty v disperzním prostředí se totiž vlivem difúze neustále pohybují a rozptylují se proto v celém objemu kapaliny. (2, 4) Dle Sterna může být k iontům na povrchu poután pouze definovaný počet protiiontů. Těsně přiléhající opačně nabitá vrstva iontů na povrchu se nazývá tzv. Sternova vrstva, která je vázána na povrch částice zejména adsorpčními silami a tvoří vnitřní (kompaktní) část elektrické dvojrstvy. Vnitřní část elektrické dvojrstvy se podobá deskovému kondenzátoru a zbývající část opačně nabitých iontů je rozptýlena ve vnější (difúzní) vrstvě a je k povrchu částice přitahována převážně silami elektrostatickými. (1)

1.3. Klasifikace koloidních soustav

Podle různých kritérií a charakteristik lze koloidní soustavy rozdělit do několika podskupin. V závislosti na skupenství disperzního prostředí a disperzního podílu mohou být koloidní systémy rozděleny do osmi skupin (tabulka 1).

Tabulka 1 Klasifikace koloidních soustav dle fázového složení

Disperzní prostředí	Disperzní fáze	Označení koloidní disperze
plynné	plynná	netvoří koloid
	kapalná	aerosol
	pevná	aerosol
kapalné	plynná	pěna
	kapalná	emulze
	pevná	lyosol
pevné	plynná	tuhá pěna
	kapalná	tuhá emulze
	pevná	tuhý sol

Koloidní systémy, které jsou tvořeny kapalným disperzním prostředím a pevnou disperzní fází (lyosoly), mohou být dále klasifikovány podle vlastností fázového rozhraní do třech skupin. Jako soustavy *lyofobní* nazýváme systémy s jasně vymezeným fázovým rozhraním. Tyto systémy nevznikají samovolně, jsou nejčastěji tvořeny anorganickými látkami a k dosažení termodynamické stability je nutno použít stabilizační aditivum. Lyofobní systémy lze dále dělit dle disperzního prostředí. V případě, kdy disperzní prostředí tvoří voda, je lyofobní soustava označována jako *hydrofobní*. Pokud je disperzní prostředí tvořeno organickou kapalinou, bývá soustava klasifikována jako *organosol*.

Naopak systémy, ve kterých je fázové rozhraní rozloženo do větší šířky, se označují jako soustavy *lyofilní*. Jsou tvořeny především vysokomolekulárními látkami a na rozdíl od lyofobních systémů vznikají samovolně rozpuštěním. Vzhledem k tomu, že jsou tyto soustavy termodynamicky stabilní, bývají často označovány jako *koloidní roztoky*. Pokud je disperzní prostředí tvořeno vodou, jedná se tedy o *hydrofilní koloidní soustavu*.

Třetí velkou skupinou koloidních soustav jsou tzv. *asociativní koloidní soustavy*, které rovněž patří mezi lyosoly a vznikají integrací molekul povrchově aktivních látek. Tvoří tak útvary koloidní velikosti a nemají striktně definované fázové rozhraní, jelikož neustále dochází k výměně molekul povrchově aktivní látky mezi disperzním prostředím a koloidní částicí. Speciálním případem koloidních systémů jsou *gely*, které mají jedinečnou schopnost volně přecházet z kapalného skupenství do pevného. Tuto schopnost mají některé lyofobní a většina

lyofilních koloidních soustav, jejichž částice se za určitých podmínek spojují a vytvářejí tak pevné prostorové síťované struktury. (1, 2)

Rozdělení koloidů na hydrofobní a hydrofilní je úzce spojené s rozdělením na koloidy *vrátne (reverzibilní)* a *nevrátne (ireverzibilní)*. Reverzibilní koloidy mohou při konstantní teplotě a tlaku existovat ve stavu jejich nejnižší Gibbsovy energie, což znamená, že jsou termodynamicky stabilní. Disperze tak vznikají samovolně po smíchání jednotlivých složek dohromady. Příkladem vratných koloidů jsou hydrofilní a asociativní koloidní soustavy. Hydrofobní koloidy se naopak řadí do skupiny nevrátných koloidů. Jsou termodynamicky nestabilní, nevznikají samovolně při procesu míchání a jejich příprava vyžaduje speciální postupy. Pro vytvoření nevrátného koloidu je nutná aktivační energie, která může být tak vysoká, že tyto disperze mohou disponovat stabilitou až v řádu několika let. (1)

2. Nanočástice stříbra

Užívání stříbra je známo déle než 2000 let. Již v dávných dobách bylo používáno k lékařským účelům, k výrobě mincí, nádobí apod. Sloučeniny na bázi stříbra zaznamenaly svůj významný rozvoj začátkem 19. století a od té doby jsou užívány v mnoha antimikrobiálních aplikacích. Stříbro je v dnešní době díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a snadné přípravě jeho koloidních částic jedním z nejrozšířenějších kovů v moderních nanotechnologiích. (6, 7, 8)

2.1. Syntéza nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra lze syntetizovat různými postupy, které vedou k variabilním velikostem, morfologii a dokonce i různé stabilitě. Obecně platí, že tyto syntetické metody mohou být rozděleny do tří základních kategorií: chemická, fyzikální a biologická (zelená) syntéza. Každá z těchto metod má své výhody i nevýhody spojené s náklady, morfologií syntetizovaných nanočástic a distribucí jejich velikostí. (9) Metody syntézy nanočástic lze dále rozdělit do dalších dvou velkých skupin. Jedná se o metody kondenzační (bottom-up) a metody dispergační (top-down). V případě top-down metod se jedná o proces, kdy jsou z látek makroskopických připravovány částice v řádu nanometrů pomocí fyzikálně-chemických a mechanických postupů. U bottom-up technik nanočástice vznikají na základě chemické

reakce, či změně rozpouštědla z analyticky disperzních soustav, tedy disperzí, v nichž je velikost částic menší než 10^{-9} m. (2)

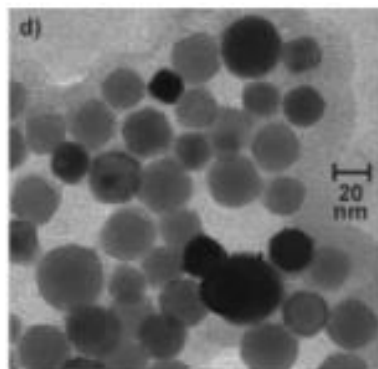
2.1.1. Chemická syntéza

Nejpoužívanější metodou v dnešní době je chemická redukce stříbrné soli, která představuje snadný způsob syntézy stříbrných nanočástic v disperzi. Jako redukční činidla jsou používány například NaBH_4 , askorbát a citrát. Velikost částic závisí na typu redukovacího sacharidu a hodnotě pH. (6) Agregací stabilita, velikost či morfologie vznikajících nanočástic může být ovlivněna přidáním dalších látek do reakční směsi. Příkladem takových látek jsou zejména povrchově aktivní látky, polymery apod. (10)

2.1.1.1. Tollensův proces

Mezi relativně jednoduchou a zároveň velmi efektivní metodu syntézy nanočástic stříbra patří tzv. Tollensův proces. Tato metoda spočívá v redukcí amoniakálního komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ redukovacími cukry, např. glukosou, fruktózou či maltosou. (11) Tollensův proces nabízí možnost řízené přípravy nanočástic stříbra v jediném reakčním kroku. Výhodou je také to, že není třeba nijak zvlášť upravovat teplotu reakce, neboť syntéza probíhá za laboratorní teploty – cca 23°C . (12)

Změnou koncentrace ligandu lze pak ovlivňovat velikost vznikajících nanočástic stříbra v rozmezí 25 až 400 nm. O stabilitě připravených koloidů stříbra bylo také zjištěno, že silně závisí na velikosti nanočástic. Koloidy s velikostí částic menší než 100 nm, připravené při nižších koncentracích amoniaku, jsou stabilní po dobu několika měsíců, zatímco větší částice vykazují vysokou úroveň nestability v důsledku relativně rychlého sedimentačního procesu (řádově hodiny). (10) Při Tollensově procesu syntézy nanočástic stříbra nejsou užívány žádné toxické chemikálie a je tak šetrný k životnímu prostředí. (6)



Obrázek 1 TEM snímek nanočástic stříbra redukováných pomocí maltózy

2.1.1.2. Redukce pomocí citrátu

Nanočástice stříbra lze také syntetizovat z dusičnanu stříbrného v jednom reakčním kroku za použití citrátu trisodného jako redukčního činidla. Jako pomocné redukční činidlo se používá kyselina tříslová, která zároveň slouží jako stabilizátor a ovlivňuje velikost nanočástic. V závislosti na koncentraci kyseliny tříslové vznikají nanočástice o velikosti v rozmezí 18 – 30 nm, které se vyznačují nízkou polydisperzitou. Čím menší koncentraci kyseliny tříslové použijeme, tím menších velikostí lze dosáhnout. Syntéza probíhá za zvýšené teploty (60°C). (13)

2.1.1.3. Redukce pomocí NaBH₄

Syntéza nanočástic stříbra pomocí NaBH₄ představuje poměrně jednoduchou metodu přípravy. Zatímco redukce pomocí citrátu probíhá za zvýšené teploty, proces přípravy pomocí NaBH₄ vyžaduje často chlazení. Do vodného roztoku NaBH₄ chlazeného v ledové lázni je přidáván rovněž zchlazený roztok dusičnanu stříbrného a vznikají tak nanočástice stříbra, jejichž velikost a tvar závisí na poměru těchto dvou reakčních činidel. (14)

2.1.2. Fyzikální syntéza

U fyzikálních metod přípravy nanočástic je nutno vynaložit energii v podobě práce mechanické, tepelné, elektrické apod. Tyto postupy bývají nejčastěji využívány pro přípravu práškových nanomateriálů. (15) Příkladem využití mechanické práce může být mletí za využití tzv. kulových mlýnů, kdy v neúčinnějších kulových mlýnech mohou koule zaujímat až 40 % jejich objemu. Nevýhodou této metody je však kontaminace vznikajících částic materiálem koulí při otěru.

U málo pevných látek lze k přípravě nanočástic použít ultrazvuk. Frekvence nad 2000 Hz vyvolávají v látkách pravidelné stlačování a expanzi. Tlak působící na materiál v něm tak může vytvořit trhliny a po jistém čase až rozpad na koloidní částice.

V současnosti stále využívanější metodou je laserová ablace, která je založena na ozáření vhodného materiálu vysoce fokusovaným paprskem elektromagnetického záření - laserem. Ozařováním povrchu pevné fáze paprskem o velmi vysoké energii dochází k lokálnímu přehřátí materiálu a vysoký tlak způsobuje odtrhávání nanočástic. Současně dochází k odpařování materiálu a následné kondenzaci. (2)

2.1.3. Biologická (zelená) syntéza

Jak už název napovídá, biologická syntéza umožňuje připravovat nanočástice stříbra pomocí živých organismů – bakterií, hub nebo rostlin. Tyto metody jsou ekonomické a šetrné k životnímu prostředí. Nabízí se tak jako vhodná alternativa pro přípravu nanočástic stříbra pro biologické a medicínské aplikace, vzhledem k nízké nanotoxicitě. Biologická syntéza nanočástic stříbra se řadí mezi bottom-up metody, které většinou zahrnují oxidační či redukční reakce. Tuto funkci vykonávají především mikrobiální enzymy nebo rostlinné fytochemikálie s antioxidačními nebo redukčními vlastnostmi, které působí na příslušné sloučeniny a produkují nanočástice. Pro biologickou syntézu jsou nezbytné tři hlavní složky – rozpouštěcí médium pro syntézu, ekologicky šetrné redukční činidlo a netoxické stabilizační činidlo. Nanočástice stříbra tak mohou být redukovány například běžně dostupnými rostlinnými produkty jako je extrakt z aloe vera, listy koriandru setého či plody papáje obecné. (7)

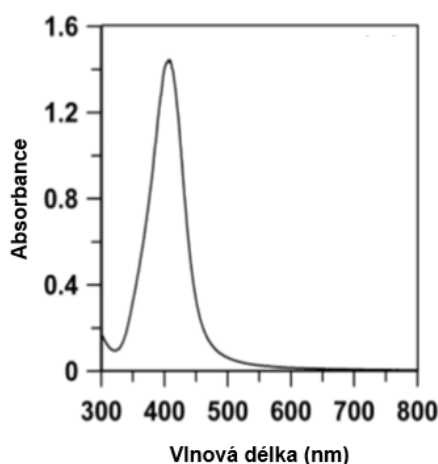
Například v případě aloe vera se jedná o jednoduchou metodu přípravy nanočástic stříbra. Tento postup spočívá v redukcí dusičnanu stříbrného v amoniakálním prostředí po přidavku extraktu z aloe vera, který lze získat jednoduše povařením jeho listů v destilované vodě. Žluté zbarvení roztoku, které značí na přítomnost nanočástic je možné pozorovat po 24 hodinách reakce. Redukce tudíž probíhá poměrně dlouho, což představuje jisté nevýhody oproti chemické syntéze. (16)

2.2. Vlastnosti nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra jsou obecně menší než 100 nm a jsou tvořeny 15 - 20 000 atomy stříbra. V řádu nanometrů stříbro vykazuje pozoruhodně neobvyklé fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, včetně vysoké elektrické a tepelné vodivosti. Dalšími neméně významnými charakteristikami nanočástic stříbra jsou například chemická stabilita, katalytická aktivita a nelineární optické vlastnosti. (15, 17)

2.2.1. Optické vlastnosti

Nanočástice stříbra disponují unikátními optickými vlastnostmi, například specifickou absorpcí světla ve viditelné oblasti, kterou nazýváme povrchovou plazmonovou rezonancí. Jev povrchové plazmonové rezonance nastává, pokud se frekvence dopadajících fotonů rovná vlastní frekvenci vodivostních elektronů na povrchu částice, dochází k rezonanci a silné absorpci záření. Rezonance pro nanočástice stříbra nastává ve viditelné oblasti spektra, a proto jsou vodné disperze stříbra barevné. (18, 19)



Obrázek 2 Absorpční spektrum povrchového plazmonu nanočástic stříbra o velikosti 26 nm

2.2.2. Antibakteriální vlastnosti

Mezi nejvýznamnější vlastnosti nanočástic stříbra patří jejich antibakteriální vlastnosti, které jsou závislé na velikosti a koncentraci působících nanočástic. Antimikrobiální účinnost nanočástic je také závislá na jejich tvaru. (9) Ve studii Kvítka bylo publikováno, že největší antibakteriální účinek vykazovaly nanočástice o velikosti 25 nm, které byly připraveny modifikovaným Tollensovým procesem za pomoci D-maltosy jako redukčního činidla. Větší nanočástice totiž hůře procházejí přes buněčnou stěnu a antibakteriální účinek tudíž není tak značný. (12) Mezi další faktory ovlivňující antibakteriální vlastnosti patří pH roztoku, redoxní stav, iontová síla a iontové složení. Většina údajů o toxicitě nanočástic stříbra je totiž získávána v relativně jednoduchých disperzních prostředích jako je například destilovaná voda nebo buněčná kutivační média, která neodpovídají prostředím uvnitř živých organismů nebo v životním prostředí. Proto povrchové vlastnosti a reaktivita disperzí připravených v laboratoři nemusí být relevantní pro posouzení chování v reálných systémech, jelikož možná agregace nanočástic způsobená například rozdílným pH či iontovou silou vede k různé antibakteriální aktivitě a toxicitě. (20)

Nanočástice stříbra mají schopnost ukotvit se na bakteriální buněčné stěně a následně ji rozrušit, což následně způsobuje strukturní změny v cytoplazmatické membráně a nakonec i zánik celé buňky. Další možný mechanismus antibakteriálního účinku je založen na teorii, že se z nanočástic stříbra mohou uvolňovat stříbrné ionty, které interagují s thiolovými skupinami mnoha enzymů a proteinů a jsou schopny je inaktivovat. (7)

V nedávných studiích však bylo popsáno, že antibakteriální účinky stříbra ztrácí po opakované expozici svou efektivitu díky vznikající rezistenci bakterií vůči nanočásticím stříbra. Děje se tak díky produkci proteinu flagellinu, jenž je produkován bakteriálním bičkem. Tento protein totiž způsobuje agregaci nanočástic a tím tak potlačuje jejich antibakteriální účinek vůči gram-negativním bakteriím. Vyvinutou bakteriální rezistenci lze potlačit pomocí inhibitorů produkce flagelinu jako je například extrakt z kůry granátového jablka. Studie byla prováděna na bakteriálních kmenech *E. coli* a *P. aeruginosa*. (21)

2.2.3. Antivirové vlastnosti

Nanočástice stříbra vykazují nejen efektivní účinnost v boji proti mikroorganismům, včetně bakterií a hub, ale disponují také antivirovými vlastnostmi. (15) Jelikož virová onemocnění, stejně jako ta bakteriální, způsobují často vážné (až fatální) zdravotní komplikace, jsou v současné době předmětem intenzivního studia.

Chemicky syntetizovaná antivirotika mívají často nežádoucí vedlejší účinky, které jsou spojeny s dalšími zdravotními komplikacemi. Vznik nových infekčních chorob a zvýšení rezistence virů vůči doposud užívaným lékům tak proto vyžaduje při léčbě více efektivní terapeutické prostředky. (22)

Autoři dosud publikovaných prací se domnívají, že se nanočástice stříbra mohou vázat na vnější proteiny virových částic, což vede k inhibici vazby a replikace virových částic v kultivovaných buňkách. (23) Nedávné studie také dokázaly, že roztok obsahující kationty stříbra účinně ničí vir HIV a do budoucna se tak nabízí jeho uplatnění na kondomech a lubrikantech. (22) Přestože antivirový mechanismus není plně znám, představují nanočástice stříbra potenciální antivirotika budoucnosti.

2.2.4. Nanotoxicita

Sloučeniny stříbra i stříbro samotné vykazují velký toxický efekt nejen vůči bakteriím, ale v mnoha případech také vůči houbám, virům a řasám. I když pro člověka nepředstavuje z hlediska toxicity stříbro takovou hrozbu, je třeba jisté obezřetnosti při jeho užívání. Některé rozpustné soli se totiž mohou při vstřebávání z trávicího traktu absorbovat do oběhového systému a akumulovat se v lidských buňkách, což představuje zdravotní riziko. Nadměrné užívání koloidního stříbra může vést k argyrii, což je onemocnění, při kterém dochází ke zmodrání kůže, sliznic a očí. Požití byt jen malých množství stříbrných solí může způsobit smrt či karcinogenní bujení. Letální dávka stříbra pro člověka činí 1,3 – 6,2 g v závislosti na tělesné hmotnosti. Naopak nejvyšší povolený denní příjem stříbra ve stravě se pohybuje v intervalu 27 – 70 µg. (8)

2.3. Aplikace nanočástic stříbra

Praktické využití nanočástic stříbra je úzce spojeno s jejich jedinečnými antibakteriálními vlastnostmi a nachází své uplatnění v mnoha oblastech. Mimo sféru vědeckou se čím dál častěji uplatňují i v produktech pro komerční využití. Nanočástice stříbra tak nacházíme v odvětvích jako je například lékařství, farmacie, kosmetika, textilní průmysl, farmaceutický průmysl, optika, elektronika a mnoho dalších. (9)

2.3.1. Biosenzory

Nanočástice stříbra jsou díky svým vlastnostem vhodné pro využití jako biosenzory. Jsou schopny zaznamenat velké množství bílkovin, které jsou normální biosenzory jen těžko schopny rozlišit. Tato jedinečná výhoda nanočástic stříbra může být použita k detekci nejrůznějších abnormalit v lidském těle. Bionanosenzory tak lze aplikovat k diagnostikování různých onemocnění včetně rakoviny. (24)

Protilátky, značené nanočásticemi stříbra, které vykazují nepřímou fluorescenci, lze například využít pro detekci viru H1N1, tedy příčinu lidské chřipky. Výhody značení nanočásticemi stříbra oproti běžnějším metodám značení pomocí radioizotopů a enzymů spočívají v jednoduchém procesu přípravy, značení a stabilitě. (25)

2.3.2 Medicínské aplikace

Využití nanočástic stříbra v lékařství se v současné době stále více rozšiřuje. Vzhledem k jejich antibakteriálním vlastnostem se používají například k impregnaci obvazů při léčbě těžkých popálenin, kdy zabraňují proniknutí infektu do popálených tkání. (8) Obvazy s nanočásticemi stříbra, které jsou impregnovány na aktivním uhlí, se dále také využívají při léčbě infikovaných ran, bércových vředů apod. Obvaz totiž nejen likviduje bakterie v ranách, ale adsorbuje také toxiny a minimalizuje případný zápach. (26)

Velmi významným faktem také je, že nanočástice stříbra zvyšují účinnost antibiotik. Vůči na trhu dostupným antibiotikům se totiž za léta užívání stala spousta bakterií rezistentními, a proto léčebné metody často selhávají. Nanočástice stříbra vykazují vysoký

baktericidní účinek při koncentracích, které pro lidské buňky nejsou cytotoxické. Díky synergickým účinkům nanočástic stříbra s antibiotiky tak může být dosaženo toho, že antibiotika, která díky rezistenci bakterií ztratila svou funkčnost, jsou při léčbě opět efektivní. Antibiotika se také mohou užívat v menších dávkách, což je příznivé například pro trávicí trakt. (6, 21)

Výsledky studie sledující synergické účinky antibiotik s nanočásticemi stříbra proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* uvádí, že pro účinné antibakteriální působení antibiotik je zapotřebí jen malé množství stříbra, jehož koncentrace nevykazují cytotoxický efekt na savčí buňky. Tyto závěry byly stanoveny na základě stanovení pomocí diluční metody určující MIC (minimální inhibiční koncentraci) antibiotika, která již inhibuje viditelný růst bakterií. V závislosti na použitém bakteriálním kmeni byly koncentrace stříbra při testování 5, 2.5, 1.25 a 0.6 mg/l. Pro zjištění, zda je účinek antibiotik specifický či nikoliv, byla v této studii použita celá řada antibiotik s různými chemickými strukturami a různými mechanismy působení, díky čemuž bylo dospěno k závěru, že tyto synergické účinky jsou nespecifické. (27)

2.3.3. Dekontaminační technologie

Nanočástice stříbra nacházejí své uplatnění také při ochraně a dekontaminaci životního prostředí. Tyto metody fungují na principu chemického rozkladu organických i anorganických kontaminantů. Nejčastěji se pro tyto účely využívá nulamocné železo. Pro zvýšení reaktivity se částice železa mohou pokrýt tenkou vrstvou ušlechtilého kovu, například právě stříbrem. (28)

2.3.4. Kosmetický průmysl

Nanomateriály nacházejí uplatnění v celé řadě kosmetických produktů jako přípravky pro péči o vlasy, hydratační krémy či opalovací krémy. Nejčastěji tedy plní ochrannou funkci. Nanočástice stříbra a zlata mají pokožce dodávat čerstvý vzhled. Baktericidní a fungicidní mýdlo obsahující nanočástice stříbra jsou zase účinné v léčbě akné a sluncem popálené pokožky. (29, 30)

3. Fluorescenční značení

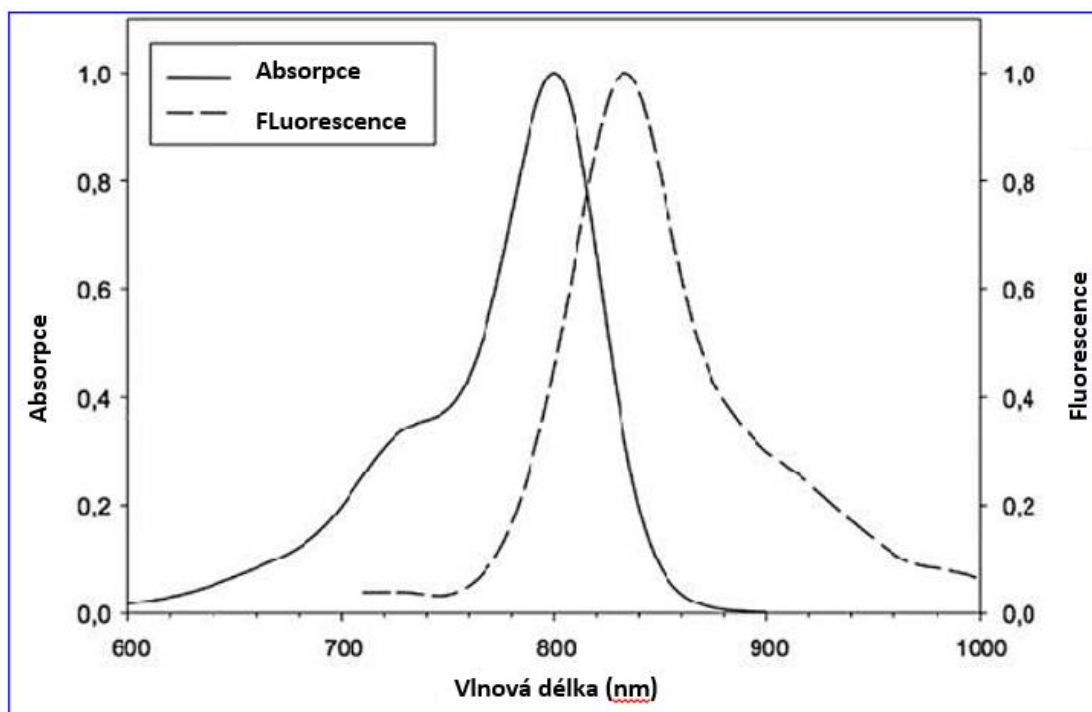
V posledních letech zaznamenaly detekce založené na fluorescenci významný pokrok nejen v přístrojovém vybavení, ale i syntéze nových fluoroforů – fluorescenčních barviv, což umožnilo značný vývoj v biologických aplikacích. Při procesu fluorescenčního značení bývají využívány organické molekuly, fluoreskující proteiny nebo polovodičové nanokrystaly. Organické molekuly mohou vytvářet s analyzovaným vzorkem kovalentní nebo nekovalentní vazby a tvořit tak příslušné komplexy nebo konjugáty, které vykazují fluorescenci. Pokud je organický fluorofor v takovém komplexu s analytem, dochází ke zvýšení absorpčních a emisních vlnových délek. Vzniklé fluorescenční záření může nabývat od krátkých vlnových délek až po velmi dlouhé v závislosti na použitém fluoroforu. (31)

Fluorescenční značky lze využít ke studiu biologických procesů v mnoha vědních oborech a jejich potenciální aplikace jsou předmětem intenzivního studia. Oshinbolu et al., se ve své práci věnovali popisu agregace monoklonálních protilátek na savčích buněčných kulturách za použití fluorescenčních barviv. Ukázalo se však, že fluorescenční barviva nejsou specifickým indikátorem agregace monoklonálních protilátek, ale spíše ukazatelem celkové agregace proteinů. (32) Metody založené na fluorescenčním značení byly dále použity například pro vizualizaci obličejových nervů, čímž je možné eliminovat jejich případné poškození během náročných operací, jako je například parotidektomie – chirurgické odstranění příušní žlázy. Při tomto zákroku často dochází k ochrnutí částí obličeje, čehož by mohlo být zabráněno, díky jeho efektivní vizualizaci během operace pomocí fluorescenčních barviv. (33)

3.1. Fluorescence

Fluorescence je typem luminiscence, konkrétně fotoluminiscence. Jedná se o jev, kdy látka po absorpci elektromagnetického záření vyzáří kvantum záření, které je posunuto k delším vlnovým délkám než záření absorbované. Tento jev se nazývá Stokesův posun a je způsoben krátkou vibrační relaxací bezprostředně po absorpci záření, kdy je část vibrační energie převedena na okolní molekuly. Intenzita (energie) fluorescence je tak menší než intenzita absorbovaného kvanta záření. (34) Při větších Stokesových posunech je snadnější oddělit excitační a fluorescenční záření a je tak usnadněno pozorování na fluorescenčním

mikroskopu. (5) Ke spontánní emisi záření dochází, jakmile přestane působit excitační zdroj, přičemž se jedná o velmi krátký časový úsek v řádu nanosekund. (35) Fluorescenční spektrum tvoří zrcadlový obraz k spektru absorpčnímu a je pro každou látku charakteristické.



Obrázek 3 Absorpční a fluorescenční spektrum indokyaninové zeleně (ICG)

Můžeme rozlišit dva typy fluorescence – primární (autofluorescence) a sekundární. Autofluorescenci je možné pozorovat u některých přirozeně se vyskytujících látek, jako je například zelený pigment chlorofyl. Je to schopnost fluoreskovat bezprostředně po dopadu UV záření. (34, 35) Autofluorescence různých látek se může lišit barvou, neboť záření může být emitováno v různých oblastech spektra. Pokud tedy chceme na nějakou buňku navázat fluorescenční značku, je nutno brát v potaz chemické složení značky, aby se její barva luminescence výrazně odlišovala od barvy autofluorescence buňky. (36) Sekundární fluorescence je pozorovatelná po kovalentním navázání fluorescenčního barviva ke sledované látce, která sama nemá schopnost fluoreskovat. (34, 35) Fluorescence se využívá při kvalitativních i kvantitativních analýzách v nejrůznějších odvětvích a je v současné době hlavní detekční metodou v biologických aplikacích. (37)

3.1.1. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je jednou z velmi významných metod detekce, užívaných především k vizualizaci biomolekul, buněk a jednotlivých organel. (35) Je využívána také pro měření interakcí proteinů, změn konformací a enzymatické aktivity. (38) Tato metoda ale může být aplikována i pro zobrazování anorganických sloučenin a méně často také léků a vitamínů. (5) Aby mohl být biologický vzorek na fluorescenčním mikroskopu detekovatelný, je na proteiny, případně nukleové kyseliny či membrány živých buněk, navázáno velké množství fluorescenčních molekul a poté je zobrazeno rozdělení fluorescenční intenzity na ozářené ploše. Některé proteiny, jako například flaviny a chlorofyl vykazují silnou fluorescenci i bez navázaných fluoroforů. (35)

Pomocí fluorescenční mikroskopie mohou být zobrazeny snímky ve vysoké kvalitě, čehož je docíleno sadou tří filtrů uvnitř fluorescenčního mikroskopu – excitačního filtru, emisního filtru a dichroického zrcadla nazývaného též dichroickým děličem lomu. Díky těmto filtrům mohou být slabé emitované signály odděleny od silného budícího osvětlení. U většiny fluorescenčních mikroskopů odráží dichroické zrcadlo světlo o krátkých vlnových délkách vycházející z lampy na vzorek. Fluorescenční světlo o větších vlnové délce je shromažďované čočkou objektivu a přenášeno přes dichroické zrcadlo na okuláry nebo kameru, přičemž odrazové a přenosové vlastnosti dichroického zrcadla musí být přizpůsobeny excitačnímu a emisnímu spektru použitého fluoroforu. Vzorek musí být osvětlen zářením odpovídajícím vlnovým délkám uvnitř excitačního spektra fluorescenčního barviva a vyzařované fluorescenční světlo musí být shromažďováno v emisním spektru při větších vlnových délkách. (5)

3.2. Fluorescenční barviva

Existuje mnoho typů fluorescenčních barviv a jejich derivátů absorbujících elektromagnetické záření při různých vlnových délkách. Mezi nejznámější patří například fluoresceiny, rhodaminy, cyaniny apod. Další skupinu fluoroforů tvoří deriváty naftalenu, dusíkatých heterocyklů či heterocyklů obsahujících kyslík nebo síru. (31) Různé typy fluorescenčních barviv mohou být použity také současně, přičemž každý z nich je schopen lokalizovat a zaměřit určitou složku ve vzorku. (5) S fluorescenčními barvivy se nesetkáváme pouze ve vědecké

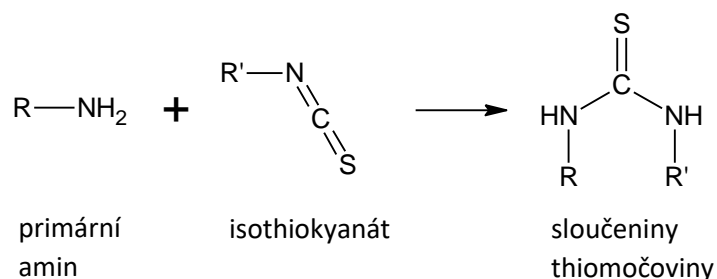
sféře, ale nachází se i v běžně používaných, komerčně dostupných produktech. Například fotoluminiscence barviva fluoresceinu se využívá k diagnostickým účelům při onemocněních rohovky. Využití nachází také ve stavebnictví, kde se přidává do kapaliny ve vodovaze pro zlepšení viditelnosti indikační vzduchové bubliny. Zajímavostí je, že už v roce 1877 se fluorescein využíval k výzkumu podzemních proudů k důkazu podzemního propojení Dunaje a Rýna. (36)

3.2.1. Rhodaminy

Rhodaminy spadají do skupiny xanthenových barviv a patří mezi nejstarší syntetická barviva používaná k barvení tkanin. Absorbují převážně ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra a mnoho derivátů silně fluoreskuje. Absorpční a emisní spektrum je silně ovlivněno substituenty na xanthenovém jádře. Rhodaminová barviva se velmi často využívají jako fluorescenční značky při mikroskopickém studování povrchu. Využití nacházejí také jako fotosenzibilátory – látky citlivé na světlo při diagnostice a léčbě nádorových buněk. (31)

3.2.1.1. Rhodamin B isothiokyanát

Rhodamin B isothiokyanát (RBITC) je prototyp molekuly barviva, které se používá jako fluorescenční značka v mnoha biologických aplikacích. Stejně jako u ostatních fluoroforů, téměř 80 % fluorescence bývá zhaseno, pokud je Rhodamin adsorbován na stříbrné nanoagregáty. Nicméně překvapivě zbylých 20 % fluorescence je dostatečně silných na to, aby mohlo být detekováno fluorescenčním mikroskopem. (37) Isothiokyanáty reagují obecně s nukleofily, jako jsou aminy, hydroxyskupiny a thioly. Stabilní produkty reakcí ale vznikají pouze s primárními aminovými skupinami, jak je znázorněno v reakčním schématu níže. (39)



Obrázek 4 Konjugace primárního aminu s isothiokyanátem

3.3. Vazby fluoroforů na povrch nanočástic

V posledních letech je v oblasti výzkumu stále více pozornosti věnováno interakcím fluoroforů s povrchy kovů a kovových nanočástic, vzhledem k rozsáhlému využití metod detekce založených na fluorescenci. Studium vazby fluoroforů na povrch nanočástic stříbra pomocí fluorescenční korelační spektroskopie se ve své práci zabýval Ray et al. Na nanočástice stříbra o průměru 50 nm byl navázán jednovláknový oligonukleotid a komplementární jednovláknový oligonukleotid byl označen fluorescenčním barvivem Cy5, který byl následně hybridizován s oligonukleotidem vázaným na nanočástice stříbra. Mezi nanočásticemi a fluoroforem byla udržována vzdálenost o velikosti 8 nm pevným hybridizovaným DNA duplexem. Fluorescenčně značené nanočástice (Cy5-DNA-Ag) oproti barvivu navázanému pouze na DNA (Cy5-DNA) vykazovaly více než 10x vyšší intenzitu fluorescence. (40) Fluorescenčně značit lze také core-shell struktury, jak potvrzuje ve své práci Jang et al. Jádro tvořené oxidy železa bylo obaleno vrstvou oxidu křemičitého o různé tloušťce. Nanočástice byly následně konjugovány s fluorescenčním barvivem Cy. Poté byla sledována vzdálenost mezi nanočásticemi a fluoroforem a bylo zjištěno, že intenzita fluorescence přitom závisí na tloušťce vrstvy oxidu křemičitého. Takto připravené nanočástice byly použity jako kontrastní látka ke značení nádoru při magnetické rezonanci a dalších multimodálních zobrazovacích technikách. (41) Fluorescenčně značené nanočástice stříbra byly také využity při detekci viru H1N1 – lidské chřipky, kde sloužily ke značení protilátek viru. Tento typ fluorescenčního imunosenzoru by mohl být v budoucnu využit v oblasti molekulární diagnostiky a dalších biologických aplikací. (25) Zesílení fluorescenčního signálu pomocí nanočástic stříbra se ve své práci věnoval Zhang et al. Nanočástice stříbra o různých velikostech byly obalené monovrstvou tioproninu, kdy velikost částic i obalu byla dána různými poměry dusičnanu stříbrného a tiopropinu. Poté byly ligandy na nanočásticích stříbra částečně nahrazeny thiolátovými jednovláknovými oligonukleotidy značenými fluoresceinem nebo jejich neznačenými komplementárními oligonukleotidy výměnou ligandu. Fluorofory navázané na nanočásticích stříbra vykazovaly povrchově zesílenou fluorescenci v závislosti na velikosti kovových jader. (42)

Experimentální část

4. Materiál a přístrojové vybavení

4.1. Chemikálie

Pro syntézu fluorescenčně značených nanočástic stříbra byly použity následující chemikálie. Na přípravu nanočástic stříbra byl použit dusičnan stříbrný (Fagron, p.a.), hydroxid sodný (Lach-Ner, p.a.), hydroxid amonný (Sigma-Aldrich, 28-30% vodný roztok, p.a.) a D (+)-maltóza monohydrát (Sigma-Aldrich, p.a.), jako redukční činidlo. K modifikaci nanočástic byl použit L-arginin (Sigma-Aldrich, p.a.) a k fluorescenčnímu značení Rhodamin B isothiokyanát (Sigma-Aldrich, p.a)

4.2. Pomůcky a přístrojové vybavení

Po celou dobu laboratorní práce byly používány automatické pipety značky Eppendorf. Rozpouštění vzorků bylo urychleno pomocí ultrazvukové lázně značky Ficher Brand FB11201. K míchání vzorků při přípravě nanočástic byly použity magnetické míchačky MR Hei-Mix S od firmy Heidolph. Inkubace vzorků s fluorescenčním barvivem Rhodaminem B isothiokyanátem probíhala na rolovací třepačce výrobce Stuart. Na přečištění značených nanočástic byly použity dialyzační membrány značky Spectra s indexem MWCO 50 kDa. Velikost nanočástic byla měřena na přístroji Zeta Potencial Analyzer 90 Plus výrobce Brookhaven využívajícím principu dynamického rozptylu světla a pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEM 2010 (Jeol, Japan). Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru značky Specord S600 od firmy AnalytikJena, Germany, který pracuje v oblasti vlnových délek 190-1050 nm. Pro promytí a odstředění kvasinek bylo využito odstředivky značky Hettich Zentrifugen typu EBA 20. Koncentrace stříbra v disperzích byla stanovena metodou atomové absorpční spektroskopie na přístroji ContrAA 300 (Analytik Jena, Germany) využívající plamenovou ionizaci. Interakce buněk s fluorescenčně značenými nanočásticemi stříbra byly pozorovány na fluorescenčním mikroskopu AF5013i T od výrobce Arsenal s.r.o, snímky kvasinek byly pořízeny digitálním fotoaparátem Canon G9.

4.3. Příprava fluorescenčně značených nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra byly připraveny modifikovaným Tollensovým procesem, který je velmi dobře reprodukovatelný a představuje poměrně jednoduchou metodu přípravy. Syntéza probíhala v 50ml kádince za laboratorní teploty a intenzivního míchání na elektromagnetické míchače dle následujícího postupu.

K 5 ml dusičnanu stříbrného ($c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) bylo postupně přidáno 1,25 ml hydroxidu amonného ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 12,75 ml H_2O , 1 ml NaOH ($c = 0,24 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a 5 ml maltózy ($c = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) jako redukčního činidla. Celkový objem reakční směsi tedy činil 25 ml. Po přidavku maltózy byl pozorován barevný přechod od světle žlutého po medově hnědé zbarvení v průběhu cca 5 minut, což signalizovalo konec redukce. Takto připravené částice stříbra jsou dále v textu označovány jako nanočástice Ag.

Aby mohly být nanočástic stříbra fluorescenčně značeny barvivem Rhodaminem B isothiokyanátem (RBITC), byl jejich povrch modifikován navázáním aminokyseliny arginin (ARG), která byla pro syntézu vhodná vzhledem k většímu počtu aminoskupin. Prostřednictvím aminoskupin v molekule argininu je totiž možné navázat isothiokyanátovou skupinu v molekule RBITC. Navázání barviva RBITC na nanočástice bylo uskutečněno dvěma způsoby. V prvním případě byl nejdříve připraven komplex nanočástic stříbra s argininem (Ag-ARG) a na takto modifikované nanočástice byl následně navázán RBITC. Nanočástice značené tímto postupem budou v této práci označeny jako (Ag-ARG)-RBITC. V případě druhém byl nejdříve připraven komplex (ARG-RBITC), který byl poté nastříknut do reakční směsi při redukci nanočástic stříbra. Takto značené nanočástice budou v práci označeny jako (ARG-RBITC)-Ag. Koncentrace argininu i RBITC byly po syntéze v obou vzorcích (Ag-ARG)-RBITC a (ARG-RBITC)-Ag totožné.

Příprava (Ag-ARG)-RBITC probíhala následovně: Nejprve byly prostřednictvím Tollensovy metody připraveny nanočástice stříbra modifikované argininem (Ag-ARG). K 5 ml dusičnanu stříbrného ($c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) bylo přidáno 1,25 ml hydroxidu amonného ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 12,65 ml H_2O , 1 ml NaOH ($c = 0,24 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 5 ml maltózy ($c = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a po 25 sekundách od přidavku maltózy bylo do reakční směsi vpraveno 0,1 ml 0,01% roztoku argininu. Syntéza probíhala opět v 50ml kádince za laboratorní teploty a intenzivního míchání na elektromagnetické míchače, kdy objem reakční směsi činil 25 ml.

Následně bylo do zkumavky odebráno 9,9 ml takto připravené disperze (Ag-ARG) a 0,1 ml RBITC ($c = 9,88 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Připravená směs byla ponechána 1 hodinu inkubovat, aby došlo k navázání barviva na aminokyselinu.

Při přípravě (ARG-RBITC)-Ag, tedy druhém postupu značení, byl nejdříve připraven komplex (ARG-RBITC), který byl následně vpraven do reakční směsi při redukcí nanočástic stříbra. Komplex (ARG-RBITC) byl připraven do zkumavky smícháním 0,65 ml H_2O , 0,1 ml 0,01% roztoku argininu a 0,25 ml RBITC ($c = 9,88 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Zkumavka byla následně umístěna na rolovací třepačku a byla ponechána rovněž jednu hodinu inkubovat, aby došlo k vytvoření vazby mezi aminokyselinou a barvivem. Po hodinové inkubaci byl celý 1 ml připraveného komplexu (ARG-RBITC) nastříknut do reakční směsi při redukcí nanočástic, po 25 sekundách od přidavku maltózy. Celkový objem disperze tedy činil 26 ml.

4.4. Přečištění a charakterizace vzorků

Oba dva vzorky (Ag-ARG)-RBITC a (ARG-RBITC)-Ag byly po přípravě přečištěny pomocí dialýzy, čímž byly zbaveny nenavázaného barviva a argininu. Dialyzační membrána byla naplněna 10 ml vzorku, umístěna do litrové kádinky naplněné vodou zalkalizovanou hydroxidem sodným na $\text{pH} = 11$. Dialýza byla prováděna celkem třikrát v průběhu 24 hodin vždy v 0,8 l zalkalizované vody. První a druhá dialýza probíhaly po dobu 2 hodin a třetí dialýza probíhala do následujícího dne. Po dialýze byly vzorky přelity do zkumavek a byla změřena jejich absorpční spektra a stanovena koncentrace stříbra pomocí AAS. Před měřením na AAS bylo z disperze vzorků (Ag-ARG)-RBITC a (ARG-RBITC)-Ag odebráno 0,25 ml a doplněno do 25 ml 2% kyselinou dusičnou.

4.5. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenčně značené nanočástice stříbra byly poté pozorovány v buňkách, konkrétně v potravinářských kvasinkách a myších fibroblastech. Koncentrace stříbra ve vzorcích činila 42 mg/L v případě vzorku (Ag-ARG)-RBITC a 41 mg/L v případě vzorku (ARG-RBITC)-Ag.

4.5.1. Kvasinky vystavené značeným nanočásticím stříbra

Potravinářské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) pro svou jednoduchou buněčnou stavbu a snadnou dostupnost představovaly vhodný organismus pro fluorescenční mikroskopii připravených nanočástic. Příprava vzorku k pozorování probíhala následovně: Zásobní roztok kvasinek byl připraven rozmícháním 1 g potravinářských kvasnic ve 100 ml destilované vody. Poté bylo do zkumavky odpipetováno 0,1 ml takto připravené suspenze kvasinek, 0,4 ml H₂O a 0,5 ml disperze značených nanočástic ((Ag-ARG)-RBITC nebo (ARG-RBITC)-Ag). Kvasinky s nanočásticemi stříbra byly inkubovány ve zkumavce 15 minut a poté byly 2x promyty a separovány pomocí centrifugace po dobu 2 minut při 2000 otáček/min. Po ukončení každé centrifugace byl supernatant odpipetován a usazené kvasinky byly opět převedeny do suspenze přidáním 1 ml vody s obsahem 2% glukosy. Takto přečištěné suspenze kvasinek byly použity při charakterizaci pomocí UV/Vis spektroskopie pro detekci přítomnosti nanočástic stříbra a RBITC a pro fluorescenční mikroskopii.

4.5.2. Kvasinky vystavené RBITC za absence nanočástic stříbra

Pro srovnání byl stejným postupem připraven i vzorek kvasinek pouze s barvivem RBITC za absence nanočástic stříbra. Do zkumavky bylo odpipetováno 0,1 ml suspenze kvasinek, 0,4 ml destilované vody a 0,5 ml roztoku RBITC o stejné koncentraci jako ve vzorcích (Ag-ARG)-RBITC a (ARG-RBITC)-Ag. Vzorek byl ponechán opět 15 minut inkubovat, a poté bylo dvakrát provedeno promytí pomocí centrifugace a resuspendace 2% roztokem glukosy. Takto přečištěné suspenze kvasinek byly použity při charakterizaci pomocí UV/Vis spektroskopie pro detekci přítomnosti nanočástic stříbra a RBITC a pro fluorescenční mikroskopii.

4.5.3. Myší fibroblasty vystavené značeným nanočásticím stříbra

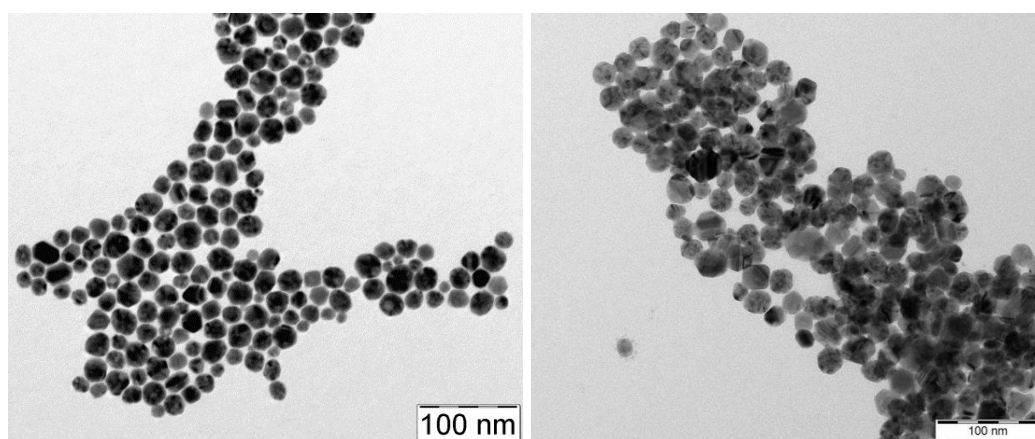
Kultivaci a následnou fluorescenční mikroskopii fibroblastů vystavených značeným nanočásticím stříbra prováděla Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D. na pracovišti Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů v Olomouci. Buňky myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC, USA) byly kultivovány 24 hod. v 96 jamkové titrační destičce a jejich interakce se

značenými nanočásticemi stříbra byly pozorovány v časech 30 min, 1 hod., 3,5 hod. a 24 hod. od aplikace značených nanočástic pomocí fluorescenčního mikroskopu. Před pozorováním byly buňky promyty fosfátovým pufrům (PBS, 0,1 mol·l⁻¹, pH 7,4).

5. Výsledky a diskuze

5.1. Fluorescenčně značené nanočástice stříbra

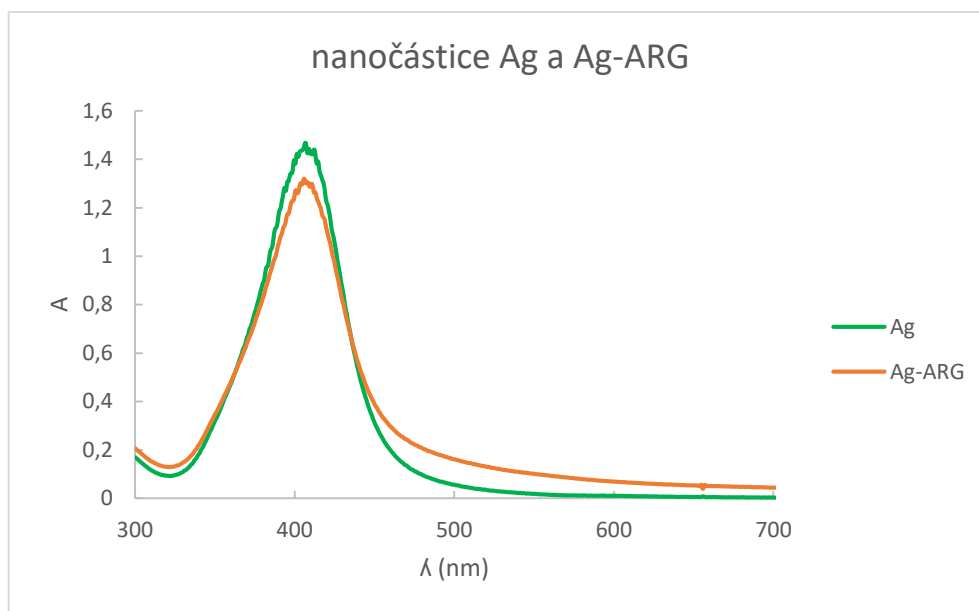
Velikost nanočástic stříbra připravených modifikovaným Tollensovým procesem bez modifikace argininem či barvivem byla charakterizována pomocí dynamického rozptylu světla a činila v průměru 28 nm. U nanočástic modifikovaných argininem (Ag-ARG) se velikost částic dle DLS pohybovala okolo 32 nm. Výsledná velikost nanočástic modifikovaných argininem je větší a byla zřejmě ovlivněna v průběhu redukce nanočástic právě přítomností argininu. Arginin přidáný do disperze 25 sekund od nástřiku redukčního činidla totiž redukcí zpomaluje, což má za následek nárůst průměrné velikosti částic. Velikost částic určenou pomocí DLS potvrdily snímky pořízené pomocí transmisního elektronového mikroskopu, z nichž je patrná přítomnost kulovitých částic stříbra s velikostí v rozmezí 20 – 35 nm (Obrázek 5).



Obrázek 5 TEM snímek nanočástic Ag (vlevo) a Ag-ARG (vpravo)

Z absorpčních spekter nanočástic Ag a Ag-ARG je zřejmé, že absorpční maximum povrchového plazmonu stříbra se pohybuje v oblasti 406 nm. Absorpce povrchového plazmonu nanočástic stříbra modifikovaných argininem (Ag-ARG) nabývá nižších hodnot, než v případě čistého koloidu stříbra a rovněž šířka píku (Ag-ARG) je nepatrně větší. Navíc je ve spektru vzorku

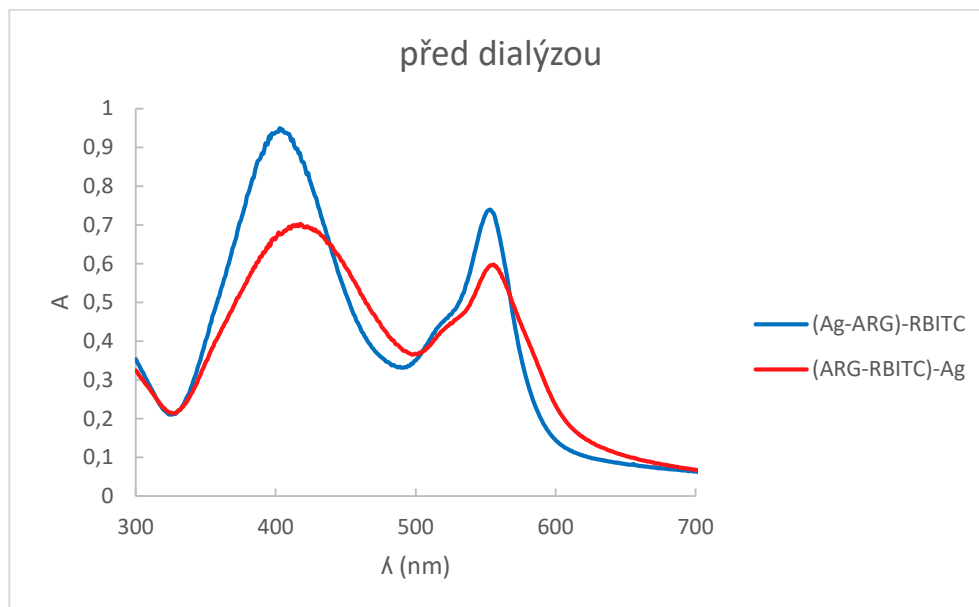
(Ag-ARG) patrná vyšší absorpce záření v oblasti vlnových délek od 400 nm po 700 nm. Tato diference je pravděpodobně způsobena větší velikostí nanočástic Ag-ARG, která byla ovlivněna v průběhu redukce, jak bylo již zmíněno výše, anebo velmi mírnou agregací nanočástic Ag způsobenou argininem.



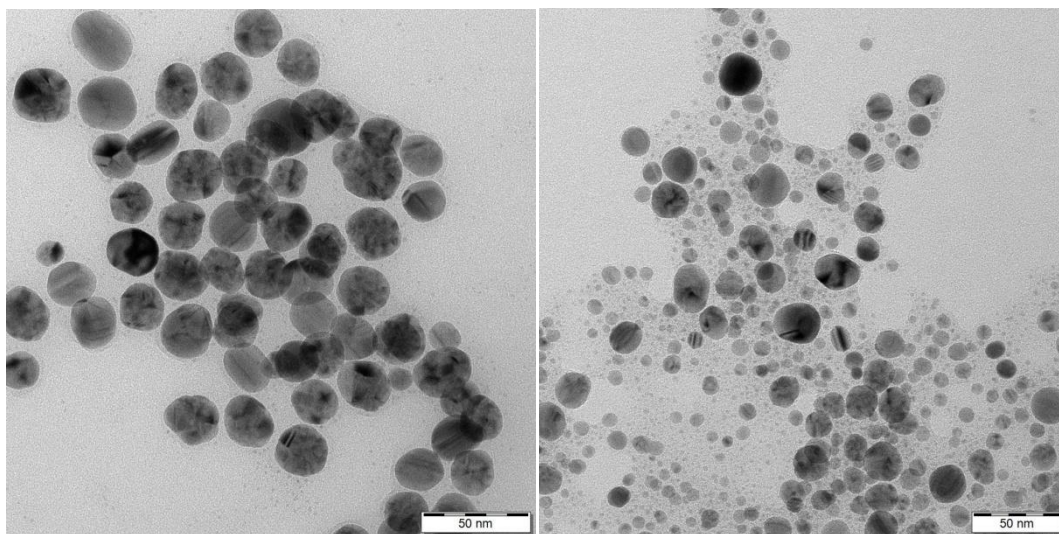
Graf 1 Absorpční spektrum nanočástic stříbra (Ag) a nanočástic stříbra modifikovaných argininem

Fluorescenční značení nanočástic probíhalo dvěma postupy, přičemž odlišnost mezi těmito dvěma metodami spočívala v různém navázání argininu na nanočástice, což může ovlivnit výslednou úspěšnost navázání barviva na nanočástice Ag, případně finální charakteristiky samotných nanočástic Ag. Výsledky obou metod značení nanočástic stříbra se od sebe proto liší, jak je patrné ze snímků z elektronového mikroskopu a z absorpčních spekter. U obou vzorků nanočástic stříbra s navázaným RBITC, v porovnání s nanočásticemi Ag a Ag-ARG bez barviva, hodnota absorpance povrchového plazmonu nanočástic stříbra klesla, jak je možné vidět pro porovnání v grafu 1 a 2. V případě vzorku (Ag-ARG)-RBITC je důvodem poklesu absorpance ulpění částic na stěnách zkumavky při inkubaci a tím snížení koncentrace částic stříbra ve vzorku. V případě vzorku (ARG-RBITC)-Ag je patrné výrazné rozšíření a mírný posun píku k vyšším vlnovým délkám. Tato změna ve spektru je dána nárůstem polydisperzity částic Ag, což potvrdily snímky z TEM (Obrázek 6). Druhý viditelný pík v rozmezí 500 – 600 nm náleží barvivu RBITC, jehož absorpční maximum se nachází při vlnové délce 555 nm.

Absorbance RBITC při 555 nm je u vzorku (ARG-RBITC)-Ag nižší, neboť došlo k částečné ztrátě vzorku adsorpcí barviva na stěnu zkumavky při inkubaci.



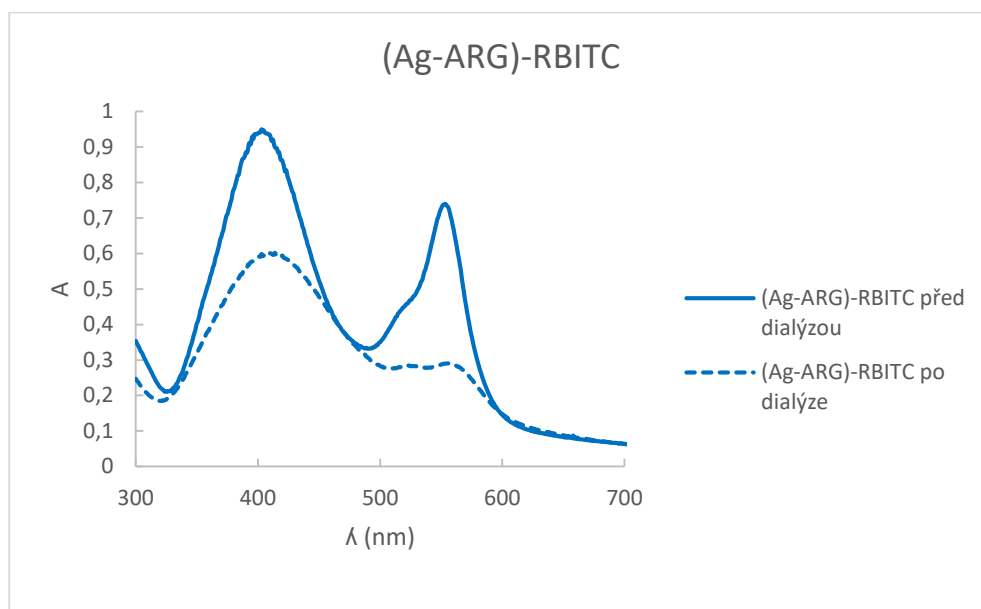
Graf 2 Absorpční spektra značených nanočástic stříbra před dialýzou



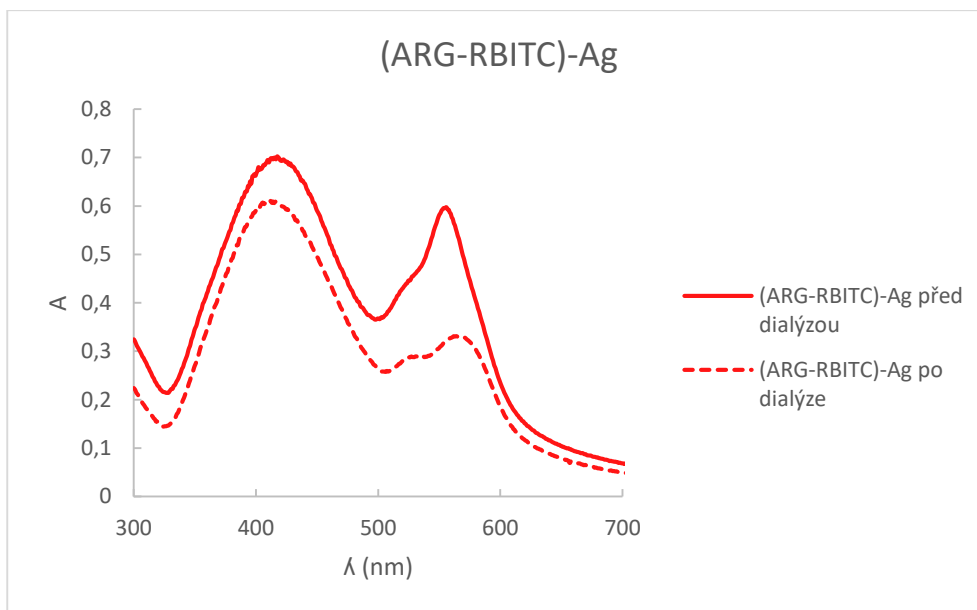
Obrázek 6 TEM snímek nanočástic stříbra vzorku (Ag-ARG)-RBITC (vlevo) a vzorku (ARG-RBITC)-Ag (vpravo).

Po přípravě a hodinové inkubaci byly vzorky (Ag-ARG)-RBITC a (ARG-RBITC)-Ag přečištěny pomocí dialýzy za účelem odstranění nenavázaného barviva a argininu. Po dialýze došlo u obou vzorků k poklesu absorbance RBITC i stříbra, jak je znázorněno v grafech 3 a 4. Přečištěné vzorky byly zbaveny nenavázaného barviva, což způsobilo pokles absorpčního maxima a tedy i koncentrace RBITC. Pokles povrchového plazmónu stříbra u obou vzorků byl

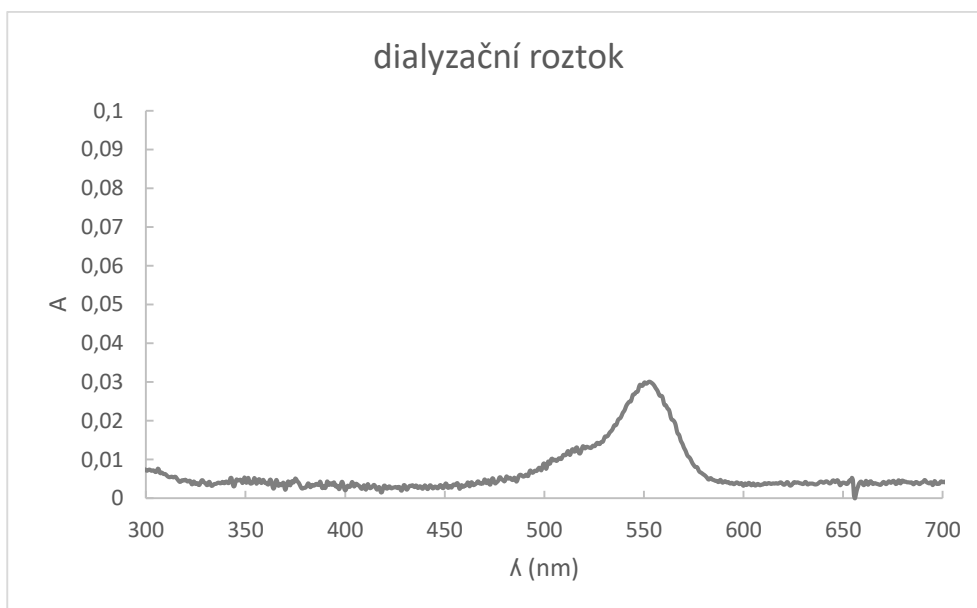
způsoben snížením koncentrace nanočástic stříbra, které se v průběhu dialýzy adsorbovaly na vnitřní stěnu dialyzační membrány (stěny membrány byly zbarveny). Částice stříbra membránou neprocházely, neboť z absorpčního spektra dialyzačního roztoku, ve kterém dialýza probíhala a který byl několikrát měněn, pík stříbra není přítomen (graf 5). Po dialýze se absorpční maximum RBITC u obou vzorků mírně posunulo k delším vlnovým délkám, což je pravděpodobně způsobeno vazbou na stříbro prostřednictvím argininu. Volná barva byla přečištěna a odstraněna. Zatímco před dialýzou se absorpční spektra obou vzorků významně lišila, po přečištění spektra nevykazují větší odlišnosti (graf 6). Konečná koncentrace stříbra stanovená metodou AAS byla u přečištěných vzorků 84 mg/L pro (Ag-ARG)-RBITC a 82 mg/L v případě (ARG-RBITC)-Ag.



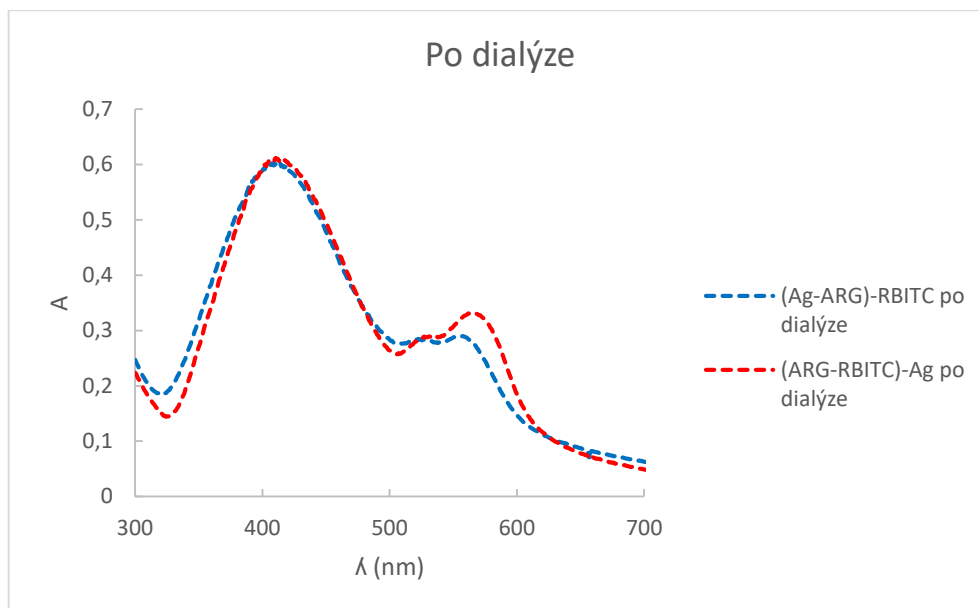
Graf 3 Absorpční spektrum (Ag-ARG)-RBITC před a po dialýze



Graf 4 Absorpční spektrum (ARG-RBITC)-Ag před a po dialýze



Graf 5 Absorpční spektrum dialyzačního roztoku po první dialýze



Graf 6 Absorpční spektra značených nanočástic stříbra po dialýze

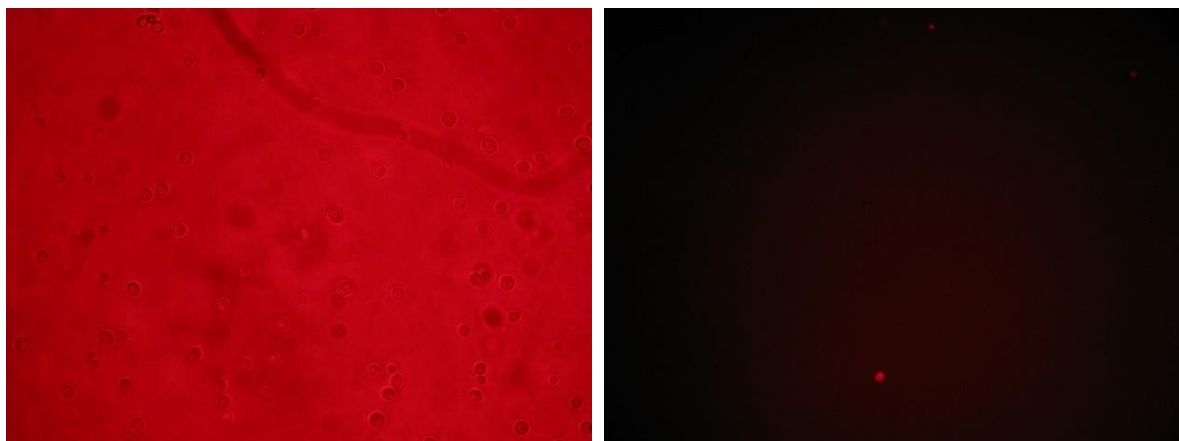
5.2. Fluorescenční mikroskopie kvasinek

Při přípravě vzorku na mikroskopování byly kvasinky smíchány se značenými nanočásticemi stříbra dle postupu popsaného výše a bylo provedeno dvojnásobné promytí pomocí centrifugace. Pro porovnání byly kvasinky také smíchány pouze s roztokem RBITC o přibližně stejné koncentraci jako v disperzích Ag po dialýze. Vzorek barvy byl naředěn tak, aby hodnota absorbance roztoku RBITC při 550 nm byla přibližně stejná jako ve vzorcích (Ag-ARG)-RBITC a (ARG-RBITC)-Ag ($A = 0,32$). Po přečištění byly pořízeny snímky sedimentu kvasinek, které vykazovaly barevnou odlišnost a dokazují, že samotné barvivo bez přítomnosti modifikovaných nanočástic nemá schopnost se na kvasinkách uchytit (Obrázek 7).



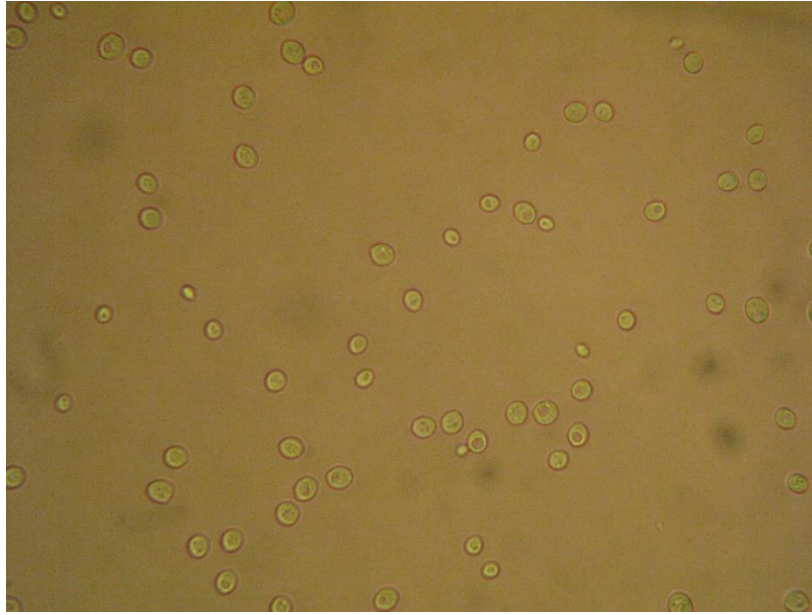
Obrázek 7 Sediment kvasinek vystavených (ARG-RBITC)-Ag (vlevo) a kvasinky vystavené RBITC (vpravo) po separaci

Po separaci byly vzorky kvasinek pozorovány na fluorescenčním mikroskopu a byly pořízeny snímky kvasinek. Přečištěný vzorek kvasinek obsahující pouze RBITC při ozáření rtuťovou výbojkou nevykazoval fluorescenci. V případě vzorků (Ag-ARG)-RBITC a (ARG-RBITC)-Ag byla fluorescence pozorována i po separaci. Obrázek 8 zobrazuje kvasinky vystavené samotnému RBITC za absence stříbra. Ze snímků je patrné, že RBITC neprošel skrze buněčnou stěnu kvasinek a během separace bylo veškeré barvivo přečištěno. Na snímku pořízeném ve fluorescenčním módu svítí pouze jedna kvasinka, jejíž buněčná stěna byla zřejmě poškozena.

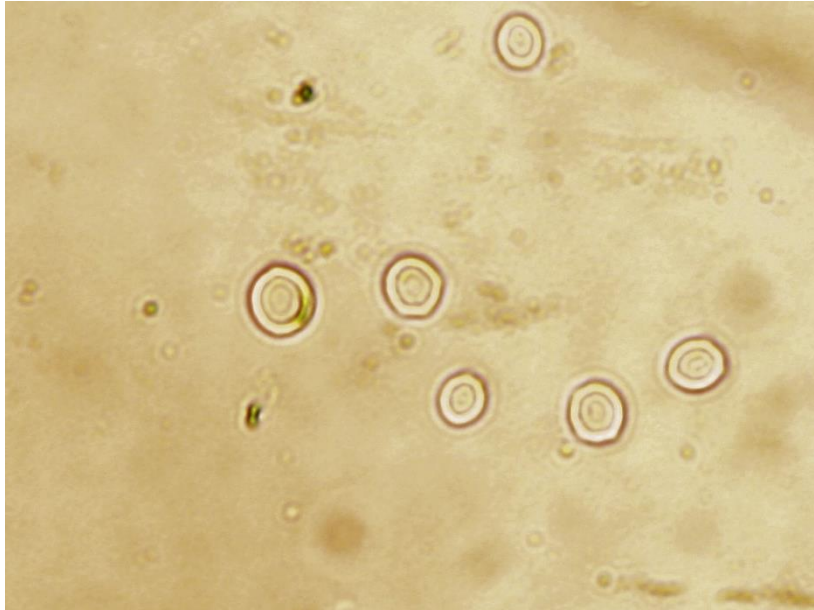


Obrázek 8 Mikroskopický snímek kvasinek vystavených barvivu RBITC bez fluorescenčního módu (vlevo) a ve fluorescenčním módu (vpravo)

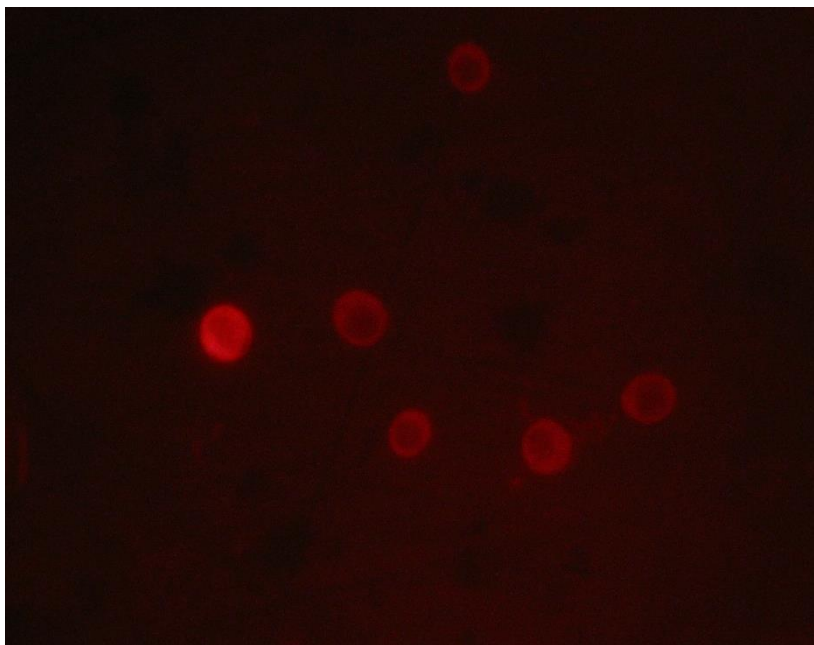
Vzorky (Ag-ARG)-RBITC a (ARG-RBITC)-Ag od sebe při pozorování nevykazovaly žádné větší odlišnosti. Fluorescenci bylo možné v obou případech pozorovat zhruba po 25 minutách od vystavení kvasinek značeným nanočásticím stříbra. Ze snímků je patrné, že barvivo a tedy i nanočástice prostupují nejprve skrze buněčnou stěnu (obrázek 11 a 13). S časem dochází k většímu porušení buněčné stěny, která umožní propustit nanočástic do vnitrobuněčného prostředí kvasinek. Intenzita fluorescence byla v obou případech dostatečně silná k pozorování. U vzorku (ARG-RBITC)-Ag se intenzita fluorescence po 30 minutách inkubace jevila mírně silnější, než v případě (Ag-ARG)-RBITC, což mohlo být způsobeno silnějším toxickým účinkem díky přítomnosti menších částic stříbra ve vzorku (ARG-RBITC)-Ag, které více narušují buněčnou stěnu. Buňky kvasinek, které nebyly vystaveny značeným nanočásticím Ag ani samotnému barvivu zobrazuje obrázek 9.



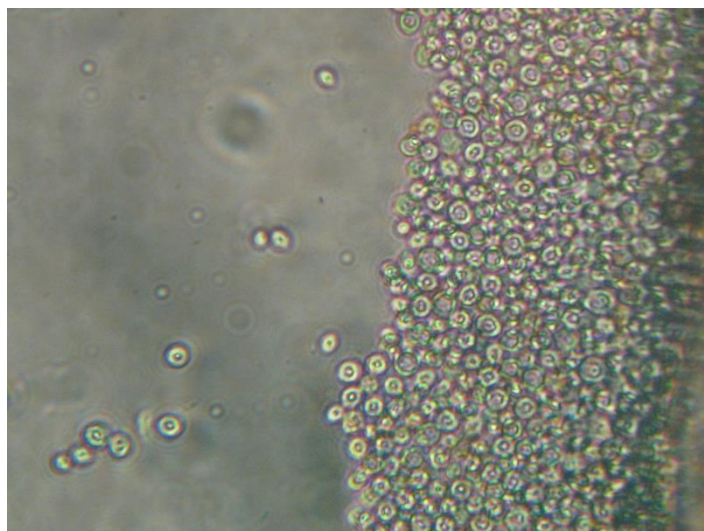
Obrázek 9 Snímek samotných kvasinek v procházejícím bílém světle



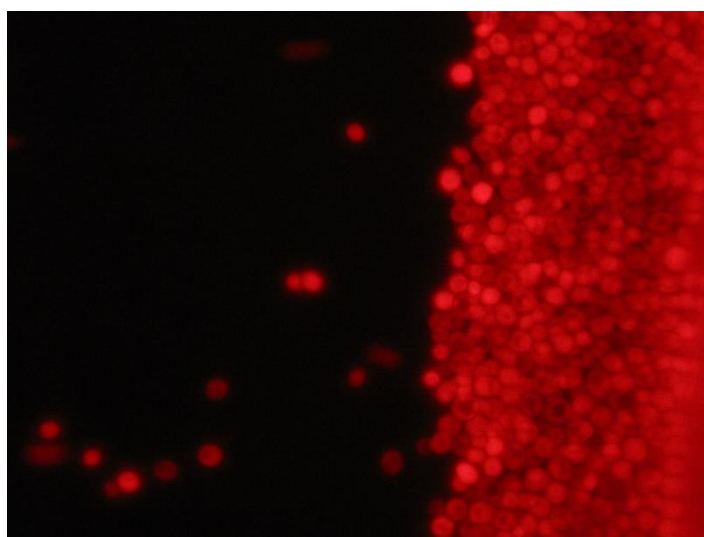
Obrázek 10 Kvasinky v bílém procházejícím světle po 25 minutách inkubace s (Ag-ARG)-RBITC



Obrázek 11 Kvasinky ve fluorescenčním módu po 30 minutách inkubace s (Ag-ARG)-RRBITC



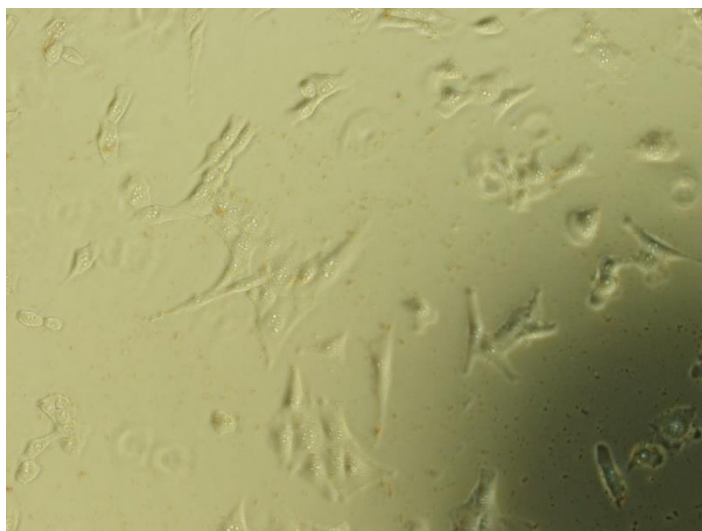
Obrázek 12 Kvasinky v bílém světle vystavené po 35 minutách inkubace s (ARG-RBITC)-Ag



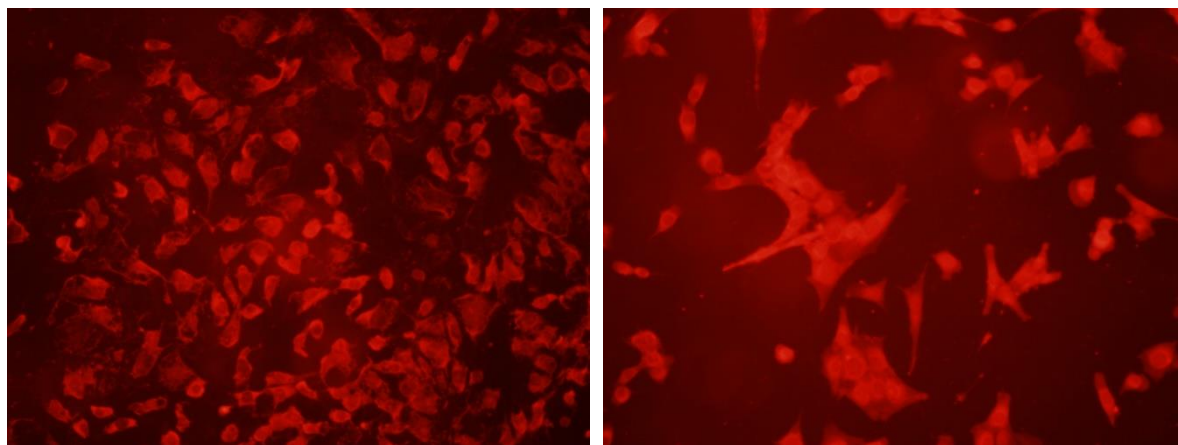
Obrázek 13 Kvasinky ve fluorescenčním módu po 34 minutách inkubace s (ARG-RBITC)-Ag

5.3. Fluorescenční mikroskopie myších fibroblastů

Pozorování myších fibroblastů vystavených značeným nanočásticím stříbra prováděla Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D. v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů v Olomouci. Pro pozorování byly použity buňky NIH/3T3 (obrázek 14), které byly vystaveny oběma vzorkům značených nanočástic (Ag-ARG)-RBITC a (ARG-RBITC)-Ag. Interakce myších fibroblastů se značenými nanočásticemi stříbra byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu v časech 30 min, 1 hod., 3,5 hod. a 24 hod. od aplikace značených nanočástic. U obou vzorků bylo možné už po 30 minutách od inkubace pozorovat fluorescenci. (obrázek 15)

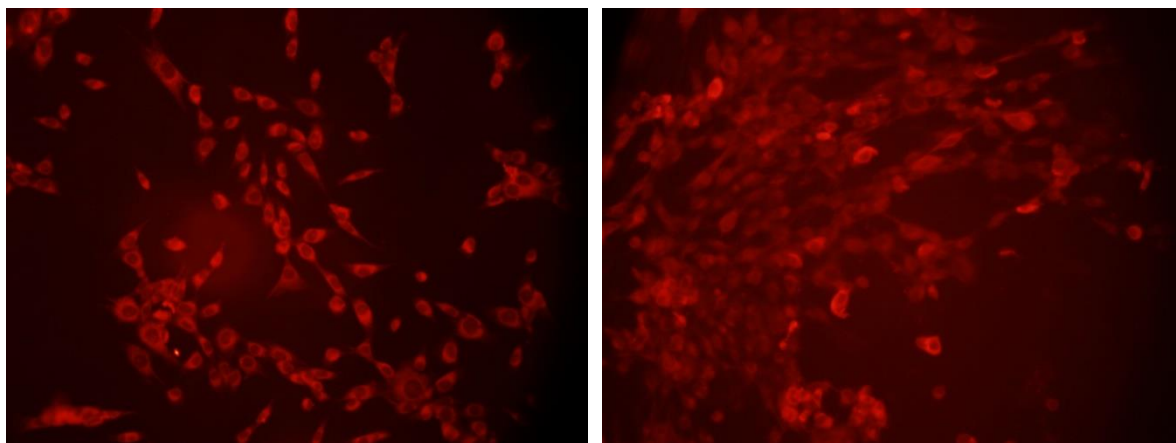


Obrázek 14 snímek myších fibroblastů 30 minut od inkubace s (ARG-RBITC)-Ag v procházejícím bílém světle



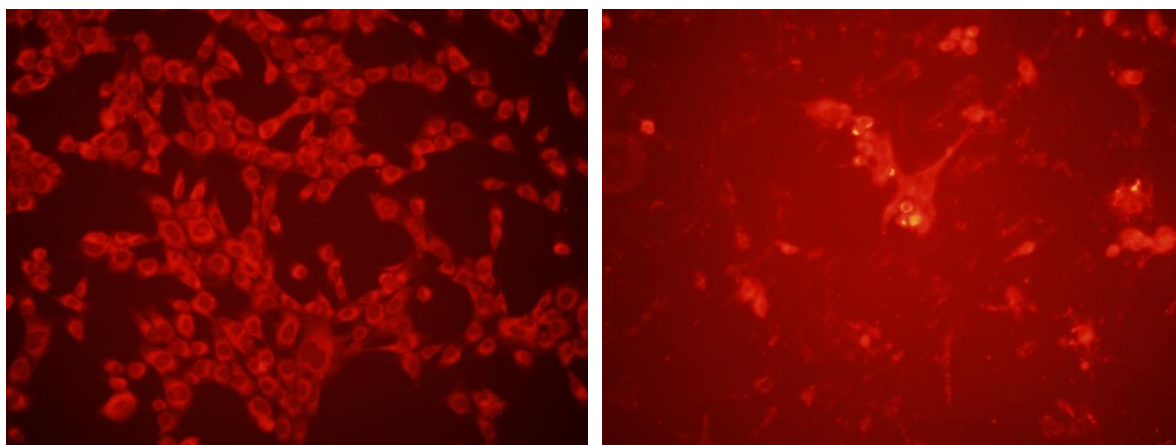
Obrázek 15 Snímky fibroblastů ve fluorescenčním módu po 30 minutách inkubace s (Ag-ARG)-RBITC (vlevo) a (ARG-RBITC)-Ag (vpravo)

Po 1 hod. od aplikace nanočástic se myší fibroblasty vystavené (ARG-RBITC)-Ag začaly mírně deformovat, zatímco v případě vzorku (Ag-ARG)-RBITC nebyly pozorovány žádné změny. (Obrázek 16).



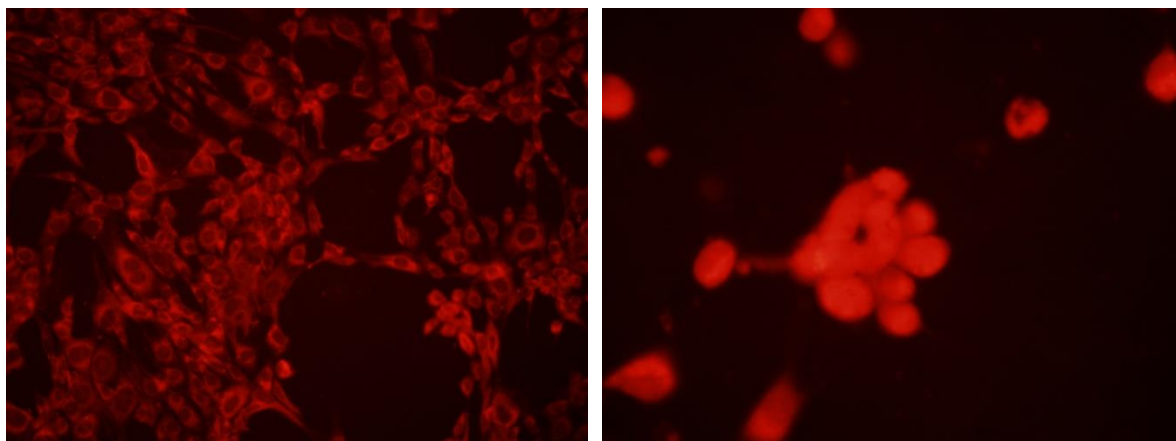
Obrázek 16 Snímky fibroblastů ve fluorescenčním módu po 1 hod. inkubace s (Ag-ARG)-RBITC (vlevo) a (ARG-RBITC)-Ag (vpravo)

V inkubačním čase 3,5 hod. je u myších fibroblastů vystavených (ARG-RBITC)-Ag patrné, že došlo k výraznějšímu narušení a deformaci buněk. Fluorescence RBITC u fibroblastů vystavených (Ag-ARG)-RBITC je intenzivnější než u předešlého pozorování, buňky jsou nedeformované. (Obrázek 17)



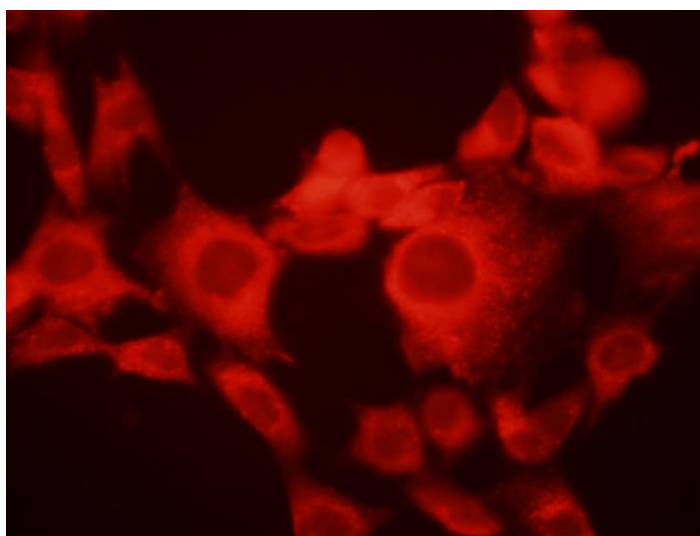
Obrázek 17 Snímky fibroblastů ve fluorescenčním módu po 3,5 hod. inkubace s (Ag-ARG)-RBITC (vlevo) a (ARG-RBITC)-Ag (vpravo)

I po 24hodinové inkubaci vzorek (Ag-ARG)-RBITC vykazoval stále dobrou stabilitu a je patrné, že nanočástice prostupují do organel v cytosolu, ale samotné jádro fluorescenci neposkytuje. Buňky vystavené vzorku (ARG-RBITC)-Ag jsou většinou zdeformované, shluklé a až lyzované a jádro v buňce již není možné rozlišit. (Obrázek 18).



Obrázek 18 Snímky fibroblastů ve fluorescenčním módu po 24 hod. inkubace s (Ag-ARG)-RBITC (vlevo) a (ARG-RBITC)-Ag (vpravo)

Z provedeného pozorování lze usoudit, že značené nanočástice (ARG-RBITC)-Ag jsou tedy pro buňky toxičtější, což je zřejmě způsobeno přítomností menších částic vykazujících obecně vyšší toxicitu. Obrázek 19 zobrazuje myší fibroblasty vystavené (Ag-ARG)-RBITC ve větším zvětšení. Jádro fibroblastu zůstává bez fluorescence, což lze považovat za pozitivní výsledek, neboť nanočástice stříbra nepoškozují jádro a tím tedy nevykazují genotoxicitu či mutagenitu. Téměř veškeré značené nanočástice se vyskytují v buněčném cytosolu a pravděpodobně v endosomech, jenž jsou na snímku patrné jako kuličky okolo jádra v prostředí cytosolu.



Obrázek 19 Snímek fibroblastů ve fluorescenčním módu po 24 hod. inkubace s (Ag-ARG)-RBITC

Závěr

Cílem této bakalářské práce byla syntéza a následné značení nanočástic stříbra fluorescenčním barvivem Rhodaminem B isothiokyanátem (RBITC). Dalším stanoveným cílem bylo takto připravené značené nanočástice aplikovat v biologických vzorcích a umožnit tak vizualizaci jejich interakcí s buňkami pomocí fluorescenční mikroskopie.

Syntéza nanočástic stříbra probíhala podle modifikovaného Tollensova procesu, jenž spočívá v redukci komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ redukujícími cukry. V rámci této práce byla jako redukční činidlo použita maltóza. Fluorescenční značení nanočástic stříbra probíhalo dvěma postupy, které se od sebe lišily způsobem navázání fluoroforu na nanočástice. Vazba fluoroforu na nanočástice byla umožněna prostřednictvím reakce aminoskupiny argininu s isothiokyanátovou skupinou Rhodaminu B. Po syntéze byly vzorky přečištěny pomocí dialýzy, aby došlo k odstranění nenavázaného barviva a argininu. K charakterizaci nanočástic byly použity techniky dynamického rozptylu světla, UV/Vis spektrofotometrie, a transmisní elektronové mikroskopie. Pozorování interakcí značených nanočástic s biologickými vzorky probíhalo prostřednictvím fluorescenční mikroskopie.

Jako modelové biologické vzorky byly použity pekařské kvasinky a buňky myších fibroblastů. Pozorováním bylo zjištěno, že oba vzorky fluorescenčně značených nanočástic stříbra během pár desítek minut s buňkami interagují a je možné pozorovat fluorescenci. V případě myších fibroblastů došlo po aplikaci značených nanočástic (ARG-RBITC)-Ag k jejich výrazné deformaci, z čehož lze usoudit na vyšší toxicitu vzorku v porovnání s (Ag-ARG)-RBITC, který buňky nijak neporušil. Na základě provedeného pozorování lze usuzovat, že Rhodamin B isothiokyanát by mohl být vhodný fluorofor pro značení nanočástic stříbra, díky němuž by byla umožněna vizualizace interakcí nanočástic stříbra s biologickými vzorky.

Summary

The aim of this work was the synthesis and subsequent labeling of silver nanoparticles with fluorescent dye Rhodamine B isothiocyanate (RBITC). Another goal was to apply such synthesized silver nanoparticles labeled by RBITC in biological samples to allow visualization of their interactions with cells using fluorescence microscopy.

Silver nanoparticles were prepared by a modified Tollens method, based on reduction of the complex cation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ using reducing sugar. In this work, maltose was used as a reducing agent. Fluorescence labeling was carried out using two ways that differ from each other by the method of binding fluorophore to nanoparticles. Labeling of silver nanoparticles was enabled by reaction of amino groups of the arginine and isothiocyanate group of Rhodamine B. After the synthesis, the samples were dialyzed in order to remove unbound dyes and arginine. Dynamic light scattering, UV / Vis spectrophotometry, and transmission electron microscopy were used to characterize labeled silver nanoparticles. Biological interactions of labeled silver nanoparticles with cells were observed using fluorescence microscopy.

Baker's yeast and mouse fibroblast cells were used as model biological samples. Observations have shown that both type of RBITC labeled Ag nanoparticles interact with cells within a few tens of minutes and fluorescence can be observed. In the case of mouse fibroblasts, the application of labeled nanoparticles (ARG-RBITC)-Ag resulted in cell deformation, which suggests higher sample toxicity compared to (Ag-ARG)-RBITC that did not damage the cells. Based on the observation, it can be concluded that Rhodamine B isothiocyanate can be considered as suitable fluorophore for labeling of silver nanoparticles, allowing visualization of the interactions of silver nanoparticles with biological samples.

Seznam použité literatury

1. **Norde, W.** Colloids and Life sciences and Bionanotechnology, Boca Raton 2011, 2-18, ISBN 978-1-4398-1718-6.
2. **Panáček, A., Kvítek, L.** Základy koloidní chemie, Olomouc 2007, 6-9, ISBN 978-80-244-1669-4.
3. **Steen, W. M., Mazumder, J.** Laser Material Processing, London 2010, 96, ISBN 978-1-84996-061-8.
4. **Cosgrove, T.** Colloid science: principles, methods and applications, Chichester 2010, ISBN 9781444320190.
5. **Tkaczyk, T. S.** Field guide to microscopy, Bellingham 2010, 90-95, ISBN 9780819472465.
6. **Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R. a další.** Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *The Journal of Physical Chemistry B.* 110(33), 2006, 16248-16253.
7. **Prabhu, S. a Poulouse, E.K.** Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters.* 2(32), 2012, 1-10.
8. **Bobrowska-Grzesik, E., Ciba, J., Grossman A. a další.** Chemical Elements compendium, Český Těšín 2013, 13-14, ISBN: 978-80-86380-66-7.
9. **Ge, L., Li, Q., Wang, M. a další.** Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine.* 9(1), 2014, 2399–2407.
10. **Kvítek, L., Pucek, R., Panáček, A. a další.** The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *Journal of Materials Chemistry.* 15(10), 2005, 1099-1105.
11. **Yin, Y. D., Li, Z. Y., Zhong, Z. Y. a další.** Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. *Journal of Materials Chemistry.* 12(3), 2012, 522-527.
12. **Kvítek, L., Panáček, A., Pucek, R. a další.** Antibacterial activity and toxicity of silver - nanosilver versus ionic silver. *Journal of Physics: Conference Series.* 304(1), 2015, 1-8.
13. **Dadosh, T.** Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size. *Materials Letters.* 63(26), 2009, 2236-2238.
14. **Nzekwe, I.T., Agubata, C.O., Umeyor, C. E. a další.** Synthesis of Silver Nanoparticles by Sodium Borohydride Reduction Method: Optimization of Conditions for High Anti-staphylococcal Activity. *British Journal of Pharmaceutical Research.* 14(5), 2016, 1-9.

15. **Tran, Q. H., Nguyen, V. Q., Le, A-T.** Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 4(3), 2013, 1-20.
16. **Chandran, S.P., Chaudhary, M., Pasricha, R. a další.** Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe Wera Plant Extract. *Biotechnology Progress*. 22(2), 2006, 577–583.
17. **.Chen X., Schluesener H.J.** Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*. 176(1), 2008, 1-12.
18. **Schaadt, D. M., Feng, B., Yu, E. T.** Enhanced semiconductor optical absorption via surface plasmon excitation in metal nanoparticles. *Applied Physics Letters*. 86(6), 2005, 63106
19. **Aziz, S. B., Abdulwahid, R. T., Rasheed, M. A. a další.** Polymer Blending as a Novel Approach for Tuning the SPR Peaks of Silver Nanoparticles. *Polymers*. 9(10), 2017, 486.
20. **Marambio-Jones, C., Hoek, E. M. V.** A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*. 12(5) 2010, 1531-1551.
21. **Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M. a další.** Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature nanotechnology*. 13(1), 2018, 65–71.
22. **Khandelwal, N., Kaur, G., Kumar, N. a další.** Application of silver nanoparticles in viral inhibition: A new hope for antivirals. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 9(1), 2014, 175 – 186.
23. **Wenchu, L., Kapalunenko, V., Yeyuan, W. a další.** The bactericidal spectrum and virucidal effects of silver nanoparticles against the pathogens in sericulture. *Molecules*. 3(3) 2011, 8894-918.
24. **Zhou, W., Ma, Y., Yang, H. a další.** A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*. 6(1), 2011, 381–386.
25. **Li, Y, Hong, M., Qui, B. a další.** Highly sensitive fluorescent immunosensor for detection of influenza virus based on Ag autocatalysis. *Biosensors and Bioelectronics*. 54, 2014, 358–364.
26. **Housecroft, C. E., Sharpe, A. G.** Inorganic chemistry, Harlow 2012, 816, ISBN 978-0-273-74275-3.
27. **Panáček, A., Smékalová, M., Kilianová, M. a další.** Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules*. 21(26), 2016, 1-17.
28. **Nováková, T., Šváb, M., Šváb, M.** Využití nanočástic v dekontaminačních technologiích: současný stav. *Chemické Listy*. 103(1), 2009, 524–532.
29. **Lohani, A., Verma, A., Joshi, H. a další.** Nanotechnology-Based Cosmeceuticals. *ISRN Dermatology*, 2014, 1-14.

30. **Gajbhiye, S., Sakharwade, S.** Silver Nanoparticles in Cosmetics. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications.*, 6, 2016, 48 – 53.
31. **M. Sameiro T. Gonçalves** Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes, *Chemical Reviews.* 109(1), 2009, 190–212
32. **Oshinbolu, S., Shah, R., Finka, G. a další** Evaluation of fluorescent dyes to measure protein aggregation within mammalian cell culture supernatants. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(3), 2018, 909-917.
33. **Melo, G. M., Cervantes, O., Covolan, L. a další.** Facial nerve identification with fluorescent dye in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 31(2), 2016, 92-102.
34. **Guilbault, G.G.** Practical fluorescence, New York 1990, 2-9, ISBN 978-0824783501.
35. **Atkins, P., De Paula, J.** Fyzikální chemie, Praha 2013, 474-478, ISBN 978-80-7080-830-6.
36. **Pelant, I., Valenta, J.** Luminiscence doma, v přírodě a v laboratoři, Praha 2014, 61-63, ISBN 978-80-200-2394-0.
37. **Kim, K., Lee, H. B., Mi Lee, Y. a další.** Rhodamine B isothiocyanate-modified Ag nanoaggregates on dielectric beads: A novel surface-enhanced Raman scattering and fluorescent imaging material. *Biosensors and Bioelectronics.* 24(7), 2009, 1864–1869.
38. **Toseland, C. P.** Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of Chemical Biology.* 6(3), 2013, 85-95.
39. **Tabujew, I., Peneva, K.** Functionalization of Cationic Polymers for Drug Delivery Applications, *RSC Polymer Chemistry Series.* 13, 2015, 1-29
40. **Ray, K., Zhang, J., Lakowicz, J. R.** Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopic Study of Fluorophore-Labeled Silver Nanoparticles, *Analytical Chemistry.* 80(19), 2008, 7313–7318
41. **Jang, E. S., Lee, S. Y., Cha, E-J. a další.** Fluorescent Dye Labeled Iron Oxide/Silica Core/Shell Nanoparticle as a Multimodal Imaging Probe. *Pharmaceutical Research.* 31(12), 2014, 3371-3378
42. **Zhang, J., Malicka, J., Gryczynski, I.** Surface-Enhanced Fluorescence of Fluorescein-Labeled Oligonucleotides Capped on Silver Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B.* 109, 2005, 7643-7648
43. **Dohnalová, L. a Dohnal, V.** Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické listy.* 109(1), 2015, stránky 444–450.
44. **Morones, J.R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A. a další.** The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 16(10), 2005, 2346-2353.

Zdroje obrázků

Obrázek 1 **Kvítek, L., Pucek, R., Panáček, A. a další.** The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *Journal of Materials Chemistry*. 15(10), 2005, 1099-1105.

Obrázek 2 **Panáček, A., Smékalová, M., Kilianová, M. a další.** Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules*. 21(26), 2016, 1-17.

Obrázek 3 **Topagolu, N., Gulsoy, M., Yuksel, S.** Antimicrobial Photodynamic Therapy of Resistant Bacterial Strains by Indocyanine Green and 809-nm Diode Laser. *Photomedicine and Laser Surgery*, 31(4), 2013, 155-162.