

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyzikální chemie

Barbara Špačková

**Studium imobilizace fluorescenčních barviv  
na povrch nanočástic stříbra**

*Diplomová práce*

Olomouc 2017

Vedoucí práce: doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Prohlašuji tímto, že jsem svou práci vypracovala samostatně. Všechny literární rešerše a informace, které jsem užila pro vypracování práce, jsou zmíněny v rejstříku použitých zdrojů. Souhlasím se zpřístupněním této práce v knihovně Katedry fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Barbara Špačková

Za trpělivost, ochotu, čas a cenné rady bych chtěla poděkovat vedoucímu své práce doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D., paní Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D. za poskytnuté snímky z optického mikroskopu, za vstřícný přístup a pomoc paní Karle Slavičkové. Dále bych chtěla poděkovat pracovišti Katedry fyzikální chemie PřF UP v Olomouci, že mi umožnilo vykonat nezbytné experimenty potřebné k vytvoření této práce. V neposlední řadě mé díky patří mým rodičům, kteří mi umožnili studovat na vysoké škole, za jejich trpělivost a všestrannou podporu.

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Barbara Špačková
Název práce:	Studium imobilizace fluorescenčních barviv na povrch nanočástic stříbra
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	Tato práce se zaměřuje na vývoj a optimalizaci metody imobilizace vybraných fluorescenčních barviv na povrch nanočástic stříbra pro následné použití takto modifikovaných nanočástic, jako fluorescenčně značených nanočástic pro účely detekce pomocí fluorescenční mikroskopie. Dalším cílem práce bylo pozorování interakce fluorescenčně modifikovaných nanočástic stříbra s myšími fibroblasty a kvasinkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pomocí fluorescenční mikroskopie.
Klíčová slova:	Fluorescenční mikroskopie, Rhodamin B, nanočástice stříbra
Počet stran:	73
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

**Bibliographic identification:**

Author's first name and surname:	Barbara Špačková
Title:	Study of immobilization fluorescent dyes on the surface of nanosilver
Type of thesis:	Master's thesis
Department:	Department of physical chemistry
Supervision:	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Year of presentation:	2017
Abstract:	This work focuses on the development and optimization of methods immobilizing selected fluorescent dyes on to the surface of silver nanoparticles for subsequent use of fluorescently labeled nanoparticles for detection using fluorescence microscopy. Another aim was to observe the interaction of silver nanoparticles modified by fluorescent dye with mouse fibroblasts and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by fluorescence microscopy.
Key words:	Fluorescence microscopy, Rhodamin B, silver nanoparticles
Number of pages:	73
Number of appendices:	0
Language:	Czech

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 DISPERZNÍ SOUSTAVY</b> .....	<b>10</b>
1.1 DĚLENÍ DISPERZNÍCH SYSTÉMŮ .....	10
1.2 KLASIFIKACE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ .....	10
1.3 KINETICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV .....	11
1.3.1 Brownův pohyb .....	11
1.3.2 Difúze .....	12
1.3.3 Osmóza.....	13
1.3.4 Sedimentace .....	13
1.4 OPTICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV .....	14
1.5 ELEKTRICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDŮ .....	15
1.5.1 Elektrická dvojvrstva .....	15
<b>2 NANOČÁSTICE STŘÍBRA</b> .....	<b>17</b>
2.1 VLASTNOSTI NANOČÁSTIC STŘÍBRA .....	17
2.1.1 Fyzikální vlastnosti .....	17
2.1.1.1 Tvar a krystalizace .....	18
2.1.1.2 Optické vlastnosti .....	18
2.1.2 Katalytické vlastnosti .....	19
2.1.3 Biologické vlastnosti .....	19
2.1.3.1 Antibakteriální účinky .....	20
2.1.3.2 Antifungální účinky .....	21
2.1.3.3 Antivirální účinky .....	22
2.1.3.4 Mechanismus účinku nanočástic stříbra .....	22
2.1.3.5 Toxicita nanočástic stříbra .....	24
2.2 SYNTÉZA NANOČÁSTIC STŘÍBRA.....	25
2.2.1 Dispergační metody .....	25
2.2.1.1 Laserová ablace.....	25
2.2.2 Kondenzační metody.....	25
2.2.2.1 Fotochemická syntéza.....	26
2.2.3 Biologická syntéza .....	27
2.3 APLIKACE NANOČÁSTIC STŘÍBRA .....	27
2.3.1 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie .....	28
2.3.2 Nanosenzory.....	28
2.3.3 Biologické, medicínské a environmentální aplikace.....	29
2.3.3.1 Dezinfekce vzduchu.....	29
2.3.3.2 Dezinfekce vody .....	29
2.3.3.3 Využití nanočástic stříbra jako impregnace.....	30
2.3.3.4 Stříbrné obvazy .....	30
<b>3 FLUORESCENCE</b> .....	<b>31</b>
3.1 SPEKTROFLUORIMETRIE .....	36
3.1.1 Fluorescenční mikroskopie .....	36
3.1.2 Fluorescenční mikroskop .....	37

3.2	FLUOROFORY .....	38
3.2.1	Fluorescenční značky .....	39
3.2.2	Fluorescenční sondy .....	39
3.2.2.1	Vazby fluorescenčních sond na bílkoviny .....	40
3.2.2.2	Vazby fluoroforů na nanočástice .....	41
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....</b>	<b>44</b>
4.1	CHEMIKÁLIE.....	44
4.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	44
4.2.1	Příprava nanočástic stříbra fluorescenčně značených pomocí Rhodaminu B isothiokyanátu .....	45
4.2.2	Fluorescenční mikroskopie fibroblastů vystavených značeným nanočásticím stříbra .....	47
4.2.3	Fluorescenční mikroskopie kvasinek vystavených značeným nanočásticím stříbra .....	47
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>49</b>
5.1	FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ NANOČÁSTICE STŘÍBRA .....	49
5.2	INTERAKCE ZNAČENÝCH NANOČÁSTIC STŘÍBRA S FIBROBLASTY .....	53
5.3	INTERAKCE ZNAČENÝCH NANOČÁSTIC STŘÍBRA S KVASINKAMI .....	59
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>63</b>
	<b>SUMMARY .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>65</b>

## ÚVOD

Oblast aplikací nanotechnologií se stává v uplynulých letech velmi rozsáhlou a perspektivní vzhledem k výjimečným vlastnostem, které vyvíjené nanočástice vykazují. Nanomateriály a jejich užití se již neodmyslitelně rozšířily ze sfér čistě vědeckých do oblastí, kdy se s nimi setkáváme v každodenním životě.

Právě vzhledem k neúprosnému tempu, kterým nanotechnologie pronikají do širokého rozsahu oborů, je nezbytné se dále a pečlivě zabývat dopady užívání nanomateriálů. Ačkoli již bylo provedeno nespočet studií, které se zabývají účinky použití nanomateriálů na živé systémy, je nutné se touto problematikou zabývat více do hloubky a snažit se porozumět efektům, které tyto aplikace mohou spolu nést, jako potencionální hrozba pro živé organismy a životní prostředí.

Nanočástice stříbra nacházejí své uplatnění především díky jejich vynikajícím antibakteriálním, optickým a katalytickým vlastnostem. Jsou známy aplikace jako impregnace medicínského vybavení, produkce vzduchových a vodních filtrů, či aplikace v oblasti nanosenzoriky.

Vzhledem k aktuálnosti tohoto tématu jsem si zvolila ve spolupráci se svým vedoucím doc. RNDr. Alešem Panáčkem, Ph.D. za téma své diplomové práce „Studium imobilizace fluorescenčních barviv na povrch nanočástic stříbra“. Jelikož je toto téma velice obsáhlé, zaměřili jsme na studium imobilizace Rhodaminu B isothiokyanátu na povrch nanočástic stříbra pro následnou detekci pomocí fluorescenční mikroskopie. Dalším cílem této práce je pozorování interakce úspěšně modifikovaných nanočástic stříbra s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a myšími fibroblasty.



# **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 DISPERZNÍ SOUSTAVY

Disperzní soustavy se skládají ze dvou základních složek – disperzní fáze, která je rozptýlena v disperzním prostředí. Ve většině případů se disperzní fáze chemicky liší od disperzního prostředí (Kvítek, Panáček, 2007).

### 1.1 Dělení disperzních systémů

Disperzní soustavy je možné dělit podle několika hledisek. Nejčastějšími kritérii klasifikace disperzních soustav je velikost nebo tvar částic, či skupenství disperzní fáze a prostředí.

Podle velikosti dispergovaných částic dělíme soustavy na monodisperzní (stejně velké částice) a polydisperzní (různá velikost částic). V případě, že soustava obsahuje částice, které mají stejný tvar, označujeme takovou soustavu jako homodisperzní (Kvítek, Panáček, 2007).

Podle počtu jednotlivých fází dělíme disperzní soustavy na heterogenní a homogenní. Heterogenní soustavy jsou složeny minimálně ze dvou fází. Mezi disperzní fází a disperzním prostředím existuje jistá hranice, kterou označujeme jako fázové rozhraní. Homogenní soustavy tvoří dvě složky a pouze jedna fáze. Disperzní fáze je tak jemně rozptýlena v disperzním prostředí, že zde neexistuje fázové rozhraní (Kvítek, Panáček, 2007; Pouchlý, 2008).

Nejčastěji se disperzní systémy člení dle velikosti dispergovaných částic na:

- **Analytické disperze** – velikost částic  $d < 10^{-9}$  m. Řadí se mezi homogenní soustavy. Jedná se zpravidla o pravé roztoky nízkomolekulárních látek. Vykazují termodynamickou stálost, vysokou difúzi a osmózu. Jsou nefiltrovatelné.
- **Koloidní disperze** – velikost částic  $10^{-9}$  m  $< d < 10^{-6}$  m. Řadí se mezi mikroheterogenní soustavy. Jsou to pravé roztoky vysokomolekulárních látek, nano i mikrodisperze dalších látek. Termodynamicky jsou stálé i nestálé. Je možné je filtrovat přes ultrafiltry. Vyskytuje se u nich slabá osmóza a difúze.
- **Hrubé disperze** – velikost částic  $d > 10^{-6}$  m. Klasifikují se jako makroheterogenní soustavy. Jsou termodynamicky nestálé a je možná jejich filtrace přes filtrační papír. Není u nich pozorována difúze i osmóza (Panáček, 2007).

### 1.2 Klasifikace koloidních systémů

Koloidní soustavy lze dělit podle několika kritérií, jako je tomu v případě disperzních systémů. Pokud zvolíme jako klasifikační hledisko skupenský stav disperzní fáze a disperzního

prostředí, je možné koloidní soustavy dělit do 8 skupin. Obecně je možné koloidní soustavy pojmenovat jako soly. Předpona *aero* popisuje soly s plynným disperzním prostředím. Předpona *lyo* charakterizuje soly s kapalným disperzním prostředím (Kvítek, Panáček, 2007; Vojucki, 1984).

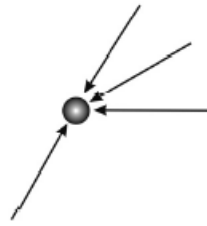
**Tabulka 1** Rozdělení koloidních soustav podle fázového složení (Kvítek, Panáček, 2010)

Disperzní prostředí	Disperzní fáze	Pojmenování koloidní disperze
<b>Plynné</b>	plynný	netvoří koloid
	kapalný	aerosoly
	pevný	aerosoly
<b>Kapalné</b>	plynný	pěny
	kapalný	emulze
	pevný	lyosoly
<b>Pevné</b>	plynný	tuhé pěny
	pevný	tuhé emulze
	pevný	tuhé soly

### 1.3 Kinetické vlastnosti koloidních soustav

#### 1.3.1 Brownův pohyb

Brownův pohyb lze popsat jako důsledek nárazů molekul disperzního prostředí do koloidních částic, které jsou způsobeny tepelným pohybem těchto částic. Intenzita tohoto pohybu roste se zvyšující se teplotou a klesající velikostí částice. Brownův pohyb lze pozorovat zejména při difúzi, sedimentaci a podstatně ovlivňuje stabilitu koloidní soustavy (Everett, 1988; Kvítek, Panáček, 2007; Pouchlý, 2008).



**Obrázek 1** Srážky molekul disperzního prostředí s koloidní částicí (Kvítek, Panáček, 2007)

### 1.3.2 Difúze

Jedná se o následek Brownova pohybu. Hnací silou difúze je rozdíl chemických potenciálů difundující látky, tedy koncentrační gradient v různých částech systému. Difúze probíhá vždy z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí s nižší koncentrací. Cílem je vyrovnat koncentraci v celé soustavě.

Difúzi popisuje I. Fickův zákon:

$$\frac{dn}{dt} = -SD \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

kde  $S$  je plocha kolmá ke směru difúze,  $D$  je difúzní koeficient [ $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ],  $dn/dt$  látkové množství v čase,  $dc/dx$  koncentrační gradient.

Takzvaná Einsteinova rovnice popisuje vztah mezi difúzním koeficientem, koeficientem třením a absolutní teplotou:

$$D = \frac{kT}{B} \quad (2)$$

kde  $k$  je Boltzmanova konstanta,  $T$  je termodynamická teplota a  $B$  je konstanta tření.

Koeficient tření popisuje Stokesova rovnice:

$$B = 6\pi\eta r \quad (3)$$

kde  $\eta$  je viskozita prostředí (Everett, 1988; Kvítek, Panáček, 2007; Pouchlý, 2008).

### 1.3.3 Osmóza

Osmóza popisuje děj, kdy jsou dva různě koncentrované systémy separovány polopropustnou membránou, která dovoluje průchod pouze molekulám disperzního prostředí. Tok rozpouštědla probíhá ze zředěnějšího roztoku do koncentrovanějšího. Hnací silou je vyrovnání chemických potenciálů na obou stranách membrány. Průchod rozpouštědla se zastaví při působení přetlaku na straně více koncentrovaného systému. V případě, kdy membrána odděluje roztok od čistého rozpouštědla, se tento přetlak označuje jako osmotický tlak  $\pi$ . Pokud působí na roztok oddělený polopropustnou membránou od čistého rozpouštědla, tlak větší, než je rovnovážný osmotický tlak, rozpouštědlo proudí opačným směrem než při osmóze. Tento děj se označuje jako reverzní osmóza (Everett, 1988; Kvítek, Panáček, 2007).

Osmotický tlak v pravých roztocích vyjadřuje van't Hoffova rovnice:

$$\pi = cRT \quad (4)$$

kde  $c$  je molární koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ] a  $R$  je univerzální plynová konstanta.

### 1.3.4 Sedimentace

Každá soustava podléhá působení zemskému gravitačnímu poli. Její vliv je zanedbatelný pouze v případě systémů, které vykazují vyšší stupeň disperzity. Odstředivé silové pole vyvolané rychlými otáčkami má větší účinky než gravitační pole. Oba typy působících sil mohou uvést disperzi do pohybu a nazýváme je sedimentace. Na kulovitou částici v kapalině působí pod vlivem gravitačního pole vztlaková síla  $F_{vztl}$  a viskózní odpor  $F_{vis}$ , který popisuje Stokesův vztah:

$$F_g = F_{vztl} + F_{vis} \quad (5)$$

Následně je možné vyjádřit gravitační sílu vztaženou na vztlakovou sílu:

$$F_g = \frac{4}{3}\pi r^3(\rho - \rho_0)g \quad (6)$$

V případě, že se částice pohybují určitou rychlostí, dojde k vyrovnání sil:

$$\frac{4}{3}\pi r^3(\rho - \rho_0)g = 6\pi\eta r v \quad (7)$$

Rovnovážnou rychlost sedimentace částice v pod vlivem působení gravitačního pole vyjadřuje následující vztah:

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)g}{9\eta} \quad (8)$$

kde  $\rho$  je hustota dispergovaných částic,  $\rho_0$  je hustota disperzního prostředí a  $g$  je gravitační zrychlení. Z tohoto vztahu lze odvodit, že rychlost sedimentace roste s druhou mocninou velikosti částice, s rozdílem hustoty částice a prostředí. Je nepřímo úměrná viskozitě prostředí (Everett, 1988; Kvítek, Panáček, 2007).

Při centrifugaci působí na částice síla odstředivá  $F_{odsř}$ , nikoli gravitační. Rychlost pohybující se částice, kdy dojde k vyrovnání velikosti sil  $F_{odsř}$  a  $F_g$  lze vypočítat podle vztahu:

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)\omega x}{9\eta} \quad (9)$$

kde  $\omega$  je úhlová rychlost a  $x$  je vzdálenost od osy otáčení (Kvítek, Panáček, 2007; Pouchlý, 2008).

#### 1.4 Optické vlastnosti koloidních soustav

Pokud dopadá elektromagnetické záření na koloidní soustavu, dojde zároveň k pravé absorpci, ale i k rozptylu záření. Ve vztahu k charakteru studované soustavy jeden z těchto jevů převládá nad druhým. To, který jev převládne, velmi závisí na velikosti přítomných částic (Kvítek, Panáček, 2007; Pouchlý, 2008).

Absorpce záření popisuje děj, při kterém dochází k pohlcení energetického kvanta elektromagnetického záření. To vede ke změně energetických stavů vazebných a valenčních elektronů.

Lambert-Beerův zákon popisuje absorpci světla látkou  $A$ .

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon cd \quad (10)$$

kde  $I$  je intenzita prošlého záření,  $I_0$  je intenzita dopadajícího záření,  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient,  $c$  je molární koncentrace a  $d$  je tloušťka vrstvy, kterou záření prochází (Kvítek, Panáček, 2007; Pouchlý, 2008).

Rozptyl záření je děj, při kterém nedochází při interakci se světelným paprskem ke změně energetických stavů vazebných elektronů. Kvantum přijaté energie je vyzářeno všemi směry, aniž by došlo ke změně vlnové délky. Rozptyl zahrnuje odraz, lom, ohyb a interferenci světla. Dochází k indukci elektrického dipólu v částici vlivem elektromagnetického pole dopadajícího záření. Indukovaný dipól následně emituje záření o stejné vlnové délce jako dopadající záření. Kromě toho nastává částečná polarizaci odraženého světelného paprsku (Kvítek, Panáček, 2007; Pouchlý, 2008).

Zmíněných optických vlastností je možné využít k charakterizaci koloidů. Například k určování velikosti částic.

## 1.5 Elektrické vlastnosti koloidů

Elektrický náboj koloidních částic hraje důležitou roli v souvislosti se stabilitou systému, ale také s chováním nabitých částic, na které působí elektrické pole (Everett, 1988; Kvítek, Panáček, 2007).

### 1.5.1 Elektrická dvojvrstva

Elektrokinetickými jevy označujeme děje, kdy se elektricky nabitě částice disperzní fáze pohybují vůči disperznímu prostředí. Řadíme mezi něj děje jako je elektroforéza, sedimentační potenciál, elektroosmóza a potenciál proudění. Elektroforéza a elektroosmóza souvisí s pohybem částic vlivem vnějšího elektrického pole. Sedimentační potenciál a potenciál proudění popisují děj, kdy dochází k mechanickému pohybu částic vyvolanému elektrickým polem (tzv. jevy inverzní). Tyto jevy jsou důsledkem existence elektrického náboje na fázovém rozhraní mezi disperzní fází a disperzním prostředím. Dochází k uspořádání opačných nábojů v blízkosti tohoto rozhraní. Vzniká tzv. elektrická dvojvrstva (Everett, 1988; Kvítek, Panáček, 2007).

Elektrický náboj na povrchu koloidních částic vzniká buď ionizací funkčních skupin povrchových molekul, nebo adsorpcí iontů v disperzním prostředí. Vznikající elektrický náboj vytváří elektrické pole, díky kterému dochází v těsné blízkosti částice k uspořádání opačně nabitých iontů. Vzniká objekt složený ze dvou vrstev opačně nabitých iontů tzv. elektrická dvojvrstva. Mezi nabitým povrchem a objemovou fází disperzního prostředí se vytváří rozdíl elektrických potenciálů  $\varphi$  (Everett, 1988; Kvítek, Panáček, 2007).

Jako první se teorií elektrické dvojvrstvy zabýval Helmholtz, který pozoroval podobnost v uspořádání deskového kondenzátoru. Vytvořil model, ve kterém rozdělil druhou

polovinu elektrické dvojvrstvy s kompenzujícími ionty na dvě části. Kompaktní a difúzní. Na hranici kompaktní a difúzní části setrvává nevykompenzovaný náboj o hodnotě, která určuje elektrokinetický potenciál ( $\zeta$  potenciál). Zeta potenciál je odpovědný za existenci elektroforézy, elektroosmózy, potenciálu proudění a sedimentačního potenciálu (Everett, 1988; Kvítek, Panáček, 2007).

Jelikož Helmholtzova představa o struktuře elektrické dvojvrstvy neodpovídala realitě byla později doplněna Gouyem, Chapmanem a Sternem. Dle Gouyho-Chapmanovy teorie nelze, aby ionty na povrchu částice vázaly ekvivalentní množství protiiontů v protivrstvě. To je dáno tím, že se pohybují vlivem difúze a jsou tak roptýleny v celém objemu kapalně fáze. K první vrstvě iontů je vázán pouze určitý počet protiiontů. Zbylé opačně nabitě ionty jsou soustředěny v tzv. vnější (difúzní) vrstvě. První vrstva iontů, která určuje povrchový náboj koloidní částice se nazývá vnitřní neboli kompaktní vrstva. Avšak Gouyho-Chapmanova teorie elektrické dvojvrstvy v praxi selhávala, protože autoři představy ionty aproximovali bodovými náboji a již nepočítali s jejich reálnými rozměry. Tuto teorii také nebylo možné aplikovat na vysoce koncentrované soustavy (Kvítek, Panáček, 2007).

Stern následně načrtl novou představu struktury elektrické dvojvrstvy. Zahrnul do ní finální rozměry iontů a specifické neelektrické interakce iontů. Podle této teorie jsou k vnitřní vrstvě iontů přitahovány elektrostatickými a adsorpčními silami ionty opačného znaménka. K povrchu těsně přiléhá vrstva protiiontů, která se označuje jako Sternova vrstva. Sternova vrstva je utvářena ionty, které se váží z velké části adsorpčními silami a společně s ionty, které jsou vázány na povrchu částice, vytvoří výše zmíněnou kompaktní vnitřní vrstvu. Ostatní protiionty vzdálenější od částice, jsou přitahovány elektrostatickými silami. Jsou rovněž složkou difúzní vrstvy. Pohybuje-li se částice s elektrickou dvojvrstvou proti nepohyblivému disperznímu prostředí, pak se také pohybuje kompaktní vrstva iontů s částicí, zatímco difúzní vrstva se s částicí nepohybuje. Rozhraní, které odděluje pohyblivou a nepohyblivou část elektrické dvojvrstvy, je pojmenováno jako pohybové rozhraní. Potenciál, který existuje v dané vzdálenosti od povrchu částice, je zodpovědný za její interakci s vnějším elektrickým polem. Tento potenciál se nazývá elektrokinetický potenciál neboli  $\zeta$ -potenciál (Kvítek, Panáček, 2007; Pouchlý, 2008).



## 2 NANOČÁSTICE STŘÍBRA

Nanotechnologie jsou rychle se rozvíjející sférou, jejichž aplikace lze nalézt nejen čistě na vědeckém poli, ale také ve výrobcích každodenní potřeby. *Nano* pochází z řečtiny a doslova je možné jej přeložit jako trpaslík ve smyslu extrémně malého tělesa. Termín nanotechnologie byl poprvé použit profesorem Norio Taniguchim z univerzity v Tokiu v roce 1974 pro popis přesné výroby materiálů na nano škále. Nanočástice jsou shluky atomů o velikostech v rozsahu 1-100 nm. (Rai et al., 2009)

Nanočástice stříbra (AgNPs) jsou považovány za jedny z nejdůležitějších nanomateriálů z pohledu jejich praktického využití. Již starověké civilizace využívaly léčebných účinků stříbra, ačkoliv se nejednalo o jejich nano formu. Z historie víme, že své uplatnění našlo stříbro v 19. st. například i ve fotografickém průmyslu. Stejně jako byly fotografie založené na fotocitlivosti stříbra nahrazeny ve 20. století digitálními fotografiemi, bylo užití stříbra v medicíně velmi rychle vytlačeno antibiotiky, ačkoli vlastnosti koloidního stříbra skrývají nezměrný potenciál. Nevyřešenou otázkou zůstávají vedlejší efekty využívání nanomateriálů, jejich vliv na životní prostředí a na živé organismy. Ačkoli se nanočástice různých materiálů v přírodě běžně vyskytují, uměle vytvářené nanočástice vykazují odlišné interakce s živými organismy (Panáček et al., 2011).

### 2.1 Vlastnosti nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra se vyznačují výjimečnými vlastnostmi, díky kterým se staly velmi široce aplikovaným materiálem. Výjimečné vlastnosti jsou výsledkem souhrnu vlastností, jako je velikostní distribuce částic, stabilita, modifikace povrchu, optické vlastnosti, biologické vlastnosti apod.

#### 2.1.1 Fyzikální vlastnosti

Nanočástice stříbra mají unikátní vlastnosti, a to především díky jejich velmi malé velikosti. Mnoho fyzikálních vlastností nanočástic, jako je rozpustnost a stabilita, jsou dány povahou jejich povrchu. Velký specifický povrch je důležitý pro aplikace, jako je například katalýza. Dané vlastnosti nanočástic stříbra se liší v řádech nanometrů. Molekuly asociují s povrchem nanočástice a tyto povrchové vazby molekul vytváří dielektrickou vrstvu, která brání agregaci částic. Povrch nanočástic stříbra je dynamický a je ovlivňován lokálním prostředím.

Různé podmínky se budou projevovat na nanočásticích různými způsoby. Velmi solné prostředí rozruší dvojvrstvu a dochází k agregaci. Bílkoviny a jiné molekuly se s nanočásticemi často spojují a tím dochází ke stabilizaci.

Povrch nanočástic stříbra je možné funkcionalizovat širokým výběrem materiálů. Pro tyto účely se používá například polyvinylpyrrolidone (PVP), pro biologické aplikace bílkovin, peptidů nebo oligonukleotidů. Nanočástice lze také funkcionalizovat s molekulami, které dokáží změnit povrchový náboj z negativního na pozitivní. Nanočástice stříbra mohou být také funkcionalizovány, aby poskytly reaktivní skupiny pro následnou konjugaci. Oxid křemičitý ( $\text{SiO}_2$ ), oxid hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) a oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ) s precizně řízenou tloušťkou mohou být použity k zapouzdření nanočástic stříbra, změně optických vlastností nebo přidružení fluorescenční vrstvy (NanoComposix Europe, 2017).

### **2.1.1.1 Tvar a krystalizace**

Nanočástice stříbra lze připravit v různých velikostech a tvarech v závislosti na způsobu přípravy. Stříbrné kuličky, tyčinky, drátky a destičky mohou být vyrobeny při změně způsobu přípravy. Anizotropní tvary typicky vznikají za přítomnosti stabilizačního polymeru, který se přednostně váže k jedné krystalové ploše, což vede k tomu, že v jednom směru roste krystal rychleji než v ostatních (NanoComposix Europe, 2017).

### **2.1.1.2 Optické vlastnosti**

Díky optickým vlastnostem stříbra vzrůstá zájem o využití AgNPs v senzorech a jiných produktech. Nanočástice stříbra jsou nesmírně účinné při absorpci a rozptylu světla.

Na rozdíl od různých barviv a pigmentů mají barvu, které závisí na velikosti a tvaru částic. Silná interakce nanočástic se světlem je způsobena tím, že vodivost elektronů na povrchu kovové částice podstoupí kolektivní oscilaci při excitaci záření o specifických vlnových délkách. Tento jev je znám jako plasmónová rezonance (Li, Xie, 2010; Lubick, 2008; Zielińska et al., 2009).

Povrchová plasmónová rezonance (SPR) je rezonanční oscilace stimulovaná dopadajícím světlem. Rezonance vzniká tehdy, jestliže se frekvence dopadajících fotonů rovná vlastní frekvenci povrchových elektronů (Homola et al., 1999; Patching, 2014; Zheng et al., 2014).

Výrazné citlivosti SPR na nepatrné změny indexu lomu, které mohou dosáhnout až  $10^{-8}$ , je možné využít v senzorových aplikacích. Mezi širokou škálou aplikací SPR patří měření materiálových a konstrukčních parametrů tenkých vrstev adsorbovaných na podložce (Homola et al., 1999).

Metoda SPR je využívána při studiu tenkých vrstev a jevů na rozhraní kov-dielektrikum. Povrchové plasmóny jsou termínem, který popisuje hromadné excitace elektronů, které jsou vázány na rozhraní mezi vodičem a izolantem. Generovány jsou v planární multivrstvě nebo na periodickém rozhraní. Plasmonové vlny neboli oscilace bývají vyvolány průchodem elektronového svazku nebo vznikají jako reakce na elektromagnetickou vlnu. Pokud dopadne na prostředí obsahující dostatečný počet volných nábojů elektromagnetická vlna, částečně se odrazí. Části prostupuje do prostředí pod vodivou vrstvou. Plasmonové oscilace lze vybudit použitím polarizovaného světla (tzv. p-polarizací). Není však možné vybudit plasmóny dopadem světla přímo ze vzduchu, a to z důvodu, že je vlnový vektor světla ve vzduchu menší než minimální kritická vlnová délka, která je potřebná pro excitaci plasmónu v kovu (Lesňák et al., 2013; Patching, 2014; Zielińska et al., 2009).

### 2.1.2 Katalytické vlastnosti

Vzhledem k tomu, že mají kovové nanočástice dostupnou obrovskou plochu povrchu, lze je využít v heterogenní katalýze. Kovové koloidní disperze jsou běžně používány jako redukční katalyzátory, ale velmi ojediněle jako oxidační katalyzátory. Výjimkou je stříbro, které se často používá jako oxidační katalyzátor, a to například při přípravě ethylenoxidu z ethylenu. Redoxní vlastnosti malých metalických částic pocházejí z vlastností kovu samotného. Katalytické vlastnosti kovových materiálů závisí především na částicové velikosti. V průběhu tvorby částic vzniká povrch o extrémní velikosti s vynikajícími katalytickými vlastnostmi a možností snadno měnit momentální redoxní potenciál (Liz-Marzán, Kamat, 2004; Pucek et al., 2004).

### 2.1.3 Biologické vlastnosti

Nanočástice stříbra vykazují vysokou antimikrobiální a baktericidní aktivitu vůči gram-pozitivním, gram-negativním i multirezistivním bakteriím jako je *Staphylococcus aureus*. Antimikrobiální aktivity AgNPs se využívá v medicíně k redukcí infekcí při léčbě popálenin, prevenci kolonizace bakterií na protézách, katétrech, cévních štěpech a v materiály využívaných v zubním lékařství, aniž by měly akutní toxický efekt na lidské buňky. Mohou být

taktéž využity k eliminaci bakterií na textilních materiálech a k úpravě vody. Vykazují i potenciální cytoprotektivní aktivitu vůči viru HIV. Nezpůsobují rezistenci vůči bakteriím jako je tomu v případě antibiotik. (Panáček et al., 2006).

Antimikrobiální a baktericidní testy se provádějí pomocí standardní ředící mikrometody určující minimální inhibiční koncentraci (MIC) vedoucí k inhibici růstu bakterií. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) je minimální koncentrace vzorku požadovaná k dosažení ireverzibilní inhibice, tedy k úmrtí bakterií po definovanou periodu inkubace. Jedná se o nejnižší koncentraci, která inhibuje viditelný růst použitých bakterií (Panáček et al., 2006).

### 2.1.3.1 Antibakteriální účinky

Nanočástice stříbra připravené modifikovanou Tollensovou metodou za použití různých redukujících sacharidů projevují antibakteriální účinky vůči rezistentním druhům bakterií jako *Staphylococcus aureus*. Aktivita byla testována standardní mikrodiluční metodou, podle níž se určuje minimální inhibiční koncentrace (MIC). Nanočástice menších velikostí vykazovaly vyšší antibakteriální účinek. AgNPs připravené za použití maltózy o velikosti 25 nm vykazují největší antibakteriální aktivitu. Naopak nejnižší aktivitu vykazují nanočástice připravené za použití galaktózy, jako redukční látky, jelikož nanočástice mají největší velikost a velmi snadno agregují. Antibakteriální účinek nanočástic stříbra byl pozorován již při koncentraci  $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Panáček et al., 2006).

Velikost nanočástic stříbra hraje velkou roli v účinnosti AgNPs vůči bakteriím. Důkazem toho je, že při redukci velikosti nanočástic z 89 nm na 7 nm, klesá minimální inhibiční koncentrace ze  $12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  na  $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v případě *E. coli*. a ze  $34 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  na  $7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v případě *S. aureus* (Khurana et al., 2014). Podle hodnot MIC uvedených v tabulce 2 bylo taktéž potvrzeno, že s rostoucí velikostí nanočástic klesá jejich antibakteriální účinek.

**Tabulka 2** Srovnání hodnot antibakteriální aktivity (MIC; mg/l) v závislosti na velikosti nanočástic stříbra (Panáček, 2013)

Velikost nanočástic (nm)	Antibakteriální aktivita MIC (mg/l)
28	1-10
36	10-20
54	27-54
77	> 54

Dalším aspektem, který ovlivňuje účinnost AgNPs, je jejich tvar. Byla porovnávána antibakteriální aktivita iontového stříbra, trojúhelníkových a kulovitých nanočástic. Nejvyšší aktivitu projevovaly nanočástice trojúhelníkového tvaru (Pal et al., 2007).

Volba stabilizátoru také ovlivňuje antibakteriální účinky AgNPs. Byl pozorován efekt použití stabilizačních činidel SDS, Tween 80 a PVP 360 na aktivitu AgNPs. Provedený experiment ukázal, že použitím stabilizátoru došlo ke zvýšení účinnosti AgNPs vůči studovaným bakteriím. V případě *Staphylococcus aureus* nestabilizované AgNPs vykazovaly MIC 3,38 mg·l<sup>-1</sup>. U modifikovaných nanočástic stříbra byla pozorována MIC 1,69 mg·l<sup>-1</sup>. Další zmíněné stabilizátory vykazovaly taktéž pozitivní vliv na aktivitu AgNPs vůči studovaným bakteriím (Kvítek et al., 2009).

### 2.1.3.2 Antifungální účinky

Klinické testy vykazovaly účinnost AgNPs vůči 44 kmenů 6 houbových druhů a ATCC kmenů *Trichophyton mentagrophytes* a *Candida albicans*. Aktivita AgNPs vůči *C. albicans* probíhá tak, že dojde k narušení struktury buněčné membrány a inhibici normálního pučícího procesu v průběhu destrukce membránové integrity. AgNPs inhibují *Candida spp.* při koncentraci kolem 1 mg·l<sup>-1</sup>. Antifungální aktivita nanočástic stříbra je srovnatelná s aktivitou iontového stříbra (Panáček et al., 2009; Tran et al., 2013). V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty MIC stabilizovaných a nestabilizovaných AgNPs. Dané hodnoty potvrzují vysokou antifungální účinnost AgNPs.

**Tabulka 3** Minimální inhibiční koncentrace (MIC) nestabilizovaných a stabilizovaných nanočástic vůči kvasinkám (Panáček, 2013)

Testovaný kmen	Minimální inhibiční koncentrace (mg/l)					
	AgNO <sub>3</sub>	Nestabilizované nanočástice stříbra	Stabilizované nanočástice stříbra			
			SDS	Tween 80	Brij	PVP 360
<i>C. albicans I</i>	0,42	0,42	0,052	0,1	0,1	0,1
<i>C. albicans II</i>	0,42	0,21	0,1	0,21	0,21	0,21
<i>C. parapsilosis</i>	1,69	1,69	0,84	0,84	0,84	0,84
<i>C. tropicalis</i>	0,84	0,84	0,42	0,42	0,42	0,42

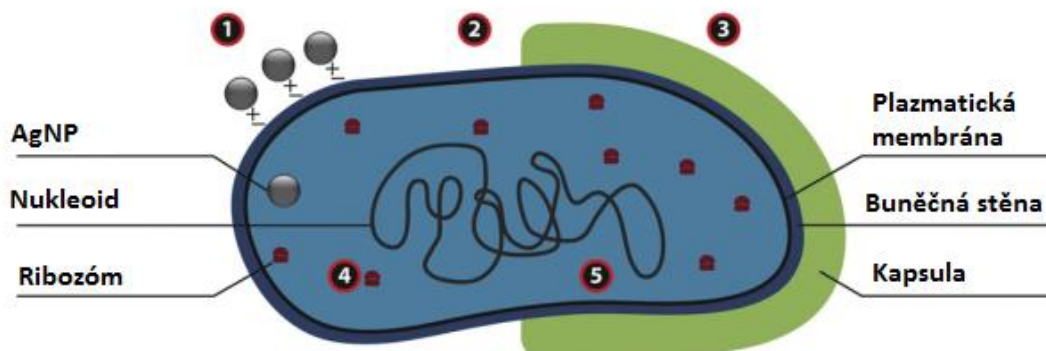
### 2.1.3.3 Antivirální účinky

Testy ukázaly, že při interakci mezi AgNPs (1-10 nm) s virem HIV-1, se nanočástice dokáží uchytit na virus. Předpokládá se, že AgNPs interagují s virem HIV-1, tak že se naváží na aktivní ložiska síry gp120 glykoproteinu. Gp 120 je povrchový glykoprotein viru HIV, který hraje důležitou roli při adsorpci viru na hostitelskou buňku. Navázání AgNPs na vir HIV-1 vyústí v oslabení upevnění viru na hostitelské buňce. Těto aktivity AgNPs, která se projevuje v prvotní fázi replikace, by bylo možné využít při přípravě vhodného virucidního činidla nebo inhibitoru virálního vstupu. Nanočástice stříbra mohou inhibovat i produkci RNA viru hepatitidy B a vykazují inhibiční efekt k viru H1N1 (chřipkový vir A) (Tran et al., 2013).

### 2.1.3.4 Mechanismus účinku nanočástic stříbra

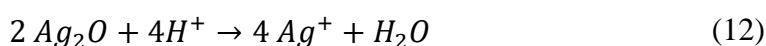
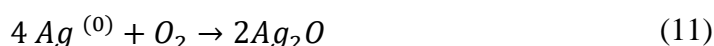
Mechanismus baktericidního efektu AgNPs probíhá tak, že se nanočástice připojí na povrch buněčné membrány a poruší její funkce, jako jsou propustnost a dýchání. Pomocí metody energiově disperzní spektroskopie (EDX) se prokázalo, že nanočástice stříbra pronikají do buňky. Mohou penetrovat skrz buněčnou stěnu. Narušení membránové morfologie způsobuje zvýšenou propustnost vedoucí k nekontrolovatelnému transportu skrz plazmatickou membránu. Následuje buněčná smrt. Jakmile je narušena buněčná stěna, dojde k uvolnění stříbrných iontů do plasmatické membrány. Tento nekontrolovatelný transport stříbrných iontů zvyšuje interakce se sírou nebo fosforem, které jsou obsaženy v proteinech a tím

neodvratitelně naruší replikační kapacitu DNA. Tento proces vede k deaktivaci enzymů obsažených v bakteriální buňce (Durán et al., 2015; Panáček et al., 2009; Rai et al., 2009).



**Obrázek 2** Mechanismus antibakteriálního účinku nanočástic stříbra: 1) elektrostatická přitažlivost, 2) produkce volných radikálů, změny v permeabilitě, 3) tvorba fosfotyrosinových profilů z bílkovin, zahrnující buněčný cyklus a syntézu kapsulárních polysacharidů, 4) interakce s thiolovou skupinou, inhibice proteinové syntézy a funkcí, 5) interakce s molekulami obsahujícími fosfor (DNA) (Durán et al., 2015)

AgNPs mohou být oxidovány ve vodném roztoku při přístupu vzduchu, což vede k uvolnění stříbrných iontů ( $\text{Ag}^+$ ) za kyselých podmínek. Tento proces popisují rovnice (11) a (12) (Lu et al., 2013; Nasiri et al., 2016).



Transport stříbra skrz narušenou buněčnou stěnu závisí na tloušťce schránky stabilizačního činidla. Klesající velikost nanočástic zvyšuje bakteriální interakce mezi buňkou a nanočásticí, což dělá buňku velmi propustnou. Nekontrolovatelné uvolňování stříbrných iontů do buněčné cytoplazmy vede k apoptóze bakteriální buňky. Jak interakce buněčné stěny bakteriální buňky, tak uvolňování stříbrných iontů do plazmatické membrány a antibakteriální aktivita AgNPs je řízena hydrodynamickou velikostí. Nikoli fyzikální či krystalickou velikostí nanočástic (Khurana et al., 2014). Antibakteriální aktivita AgNPs závisí také na povrchových modifikacích (surfaktant/polymer) (Durán et al., 2015; Panáček et al., 2009; Rai et al., 2009).

Aminokyseliny (AMK), jako je cystein a jiné složky obsahující thiolové skupiny (thioglykolát sodný), neutralizují aktivitu stříbra vůči bakteriím. Naopak aminokyseliny obsahující disulfidovou vazbu, neobsahující síru, obsahující síru (cystathion, kyselina cysteová, l-methionin, taurin, bisulfát sodný a tiosulfát sodný), nemohou neutralizovat aktivitu stříbrných iontů. AgNPs se navazují na klíčové funkční skupiny enzymů. Stříbrné ionty způsobují uvolnění  $K^+$  iontů z bakterie. Bakteriální plazma nebo cytoplazmatická membrána, které jsou spojeny s mnoho důležitými enzymy, jsou důležitým cílovým místem pro aktivitu stříbrných iontů (Jung et al., 2008; Li et al., 2010).

AgNPs lze kombinovat s antibiotiky jako je penicilin G, amoxicillin, erytromycin, clindamycin a vankomycin. Lze tak docílit zvýšení účinnosti antibakteriálních vlastností například vůči *E. coli* a *S. aureus* (Rai, et al., 2009).

### 2.1.3.5 Toxicita nanočástic stříbra

Většina studií považuje nanočástice stříbra za netoxické. Ale díky jejich velmi malým velikostem a variabilním vlastnostem jsou považovány za potencionálně riskantní pro životní prostředí (Rai et al., 2009). Z tohoto důvodu je stále snaha porozumět efektu vystavení organismů a životního prostředí nanočásticím.

*In vitro* testy ukázaly, že obecně je cytotoxicita nanočástic stříbra založena na indukci reaktivních forem kyslíku (ROS). Vystavení působení AgNPs vede ke snížení glutathionu (GSH), vzrůstu hladin ROS, peroxidaci lipidů a zvýšení exprese genů reagujících na ROS. To vede k poškození DNA, apoptóze a nekróze. Cytotoxicita a genotoxicita AgNPs je závislá na velikosti, koncentraci a době expozice (Tran et al, 2013).

Bylo provedeno jen velmi málo testů toxikologie *in vivo*. V řadě případů byla zaznamenána reprodukční selhání, vývojové vady a morfologické deformace vnitřních orgánů (Rai et al., 2009; Tran et al., 2013).

Při studiu cytotoxicity stříbrných nanočástic vůči lidským fibroblastům bylo zjištěno, že vykazují inhibiční efekt již při koncentraci  $0,28 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Inhibiční efekt byl zvýšen stabilizací nanočástic a nejnižší MIC byla  $0,05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Pro srovnání, nanočástice stříbra efektivně inhibovaly růst testovaných kvasinek při koncentraci nižší, než je jejich cytotoxický limit vůči testovaným lidským fibroblastům ( $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Naopak iontové stříbro inhibuje růst testovaných kvasinek při koncentraci srovnatelné s cytotoxickou hladinou iontového stříbra vůči testovaným lidským fibroblastům. Cytotoxicita nanočástic stříbra vůči mitochondriální



aktivitě klesá s klesající koncentrací AgNPs (Li et al., 2011; Prabhu et al., 2012; Rai et al., 2009).

## 2.2 Syntéza nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra bývají nejčastěji připravovány tzv. mokkými metodami, které jsou založeny na redukci stříbrného prekursoru s použitím chemických nebo fyzikálních prostředků. Redukce stříbrných iontů lze dosáhnout i použitím mikrovln, ultrazvuku nebo gama záření (Khaydarov et al., 2009). Dále metody, které pro syntézu nanočástic stříbra využívají extraktů z rostlin, řas, bakterií nebo hub a jsou označovány jako tzv. zelené metody (Sivera et al., 2014).

### 2.2.1 Dispergační metody

Vzhledem k tomu, že dispergace neprobíhá samovolně, je potřeba pro přípravu koloidních soustav vynaložit jistou práci. V případě fyzikálního postupu přípravy se jedná mechanickou práci. Při přípravě koloidních částic mletím se využívá tzv. kulových mlýnů. U málo pevných látek lze k rozmělnění využít ultrazvuk. Mezi dispergační metody se řadí i postupy, které využívají elektrického proudu (Kvítek, Panáček 2007, Vojuckij, 1984).

#### 2.2.1.1 Laserová ablace

Jedná se o jednoduchou a všestrannou metodu, která nezanechává v systému zbytková chemická činidla. Takto připravené částice jsou velmi čisté. Z důvodu vysoké čistoty je možné tyto částice použít v oblasti SERS studií. Velikost připravených částic závisí na intenzitě a vlnové délce laseru, který byl při přípravě použit. Dalšími aspekty, které mohou ovlivnit velikost vzniklých částic, jsou délka ozařování, volba rozpouštědla či přítomnost iontů v roztoku (Brause et al., 2002; Pucek et al., 2004).

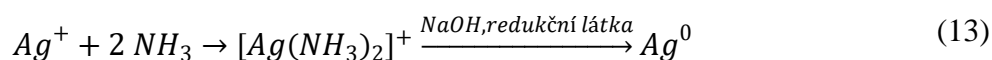
### 2.2.2 Kondenzační metody

Kondenzační metody využívají při tvorbě částic shlukování jednotlivých atomů. Lze takto připravit vysoce dispergované a monodisperzní koloidní soustavy. Kondenzace je možné docílit buď fyzikálními metodami, nebo chemickými reakcemi. Fyzikální kondenzační postupy se opírají o změnu rozpustnosti látek. Chemické postupy umožňují přípravu většího počtu koloidních soustav různého chemického složení (Kvítek, Panáček 2007; Vojuckij, 1984).

Příkladem kondenzační metody, která využívá k redukcí anorganického činidla, je příprava AgNPs redukcí  $\text{AgNO}_3$  za použití borohydridu sodného ( $\text{NaBH}_4$ ). Nanočástice připravené touto metodou vykazují velikosti v rozmezí 5-20 nm. Jsou stabilní po dobu až několika měsíců. Tato metoda přípravy nanočástic stříbra se často využívá při experimentech povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) (Kvítek, Pucek, 2005).

Metodu přípravy, která využívá organického činidla citrátu sodného ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), navrhli Lee a Meisel. Syntéza AgNPs probíhá po přidavku roztoku citrátu sodného k roztoku dusičnanu stříbrného. Příprava nanočásti probíhá za varu zhruba po dobu 1 hodiny (Lee, Meisel, 1982). Lze takto připravit částice v rozsahu velikostí 30-120 nm, které vykazují vyšší polydisperzitu než za použití  $\text{NaBH}_4$ . Pokud je koloidní soustava dále zahřívána, lze připravit monodisperzní směs o velikosti částic zhruba 27 nm (Kvítek, Pucek, 2005).

Dalším příkladem kondenzační metody přípravy AgNPs je modifikovaný Tollensův proces. Jedná se o jedнокrokovou syntézu AgNPs založenou na redukcí  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]$  organickými činidly, tuto reakci lze popsat rovnicí (13).



Jako redukční činidla se používají 4 sacharidy, např. glukóza, galaktóza, maltóza a laktóza. Tímto postupem lze získat nanočástice o velikostech 25-450 nm. Přípravou nanočástic s využitím maltózy, jako redukčního činidla, lze získat částice o velikosti 25 nm vykazující vysokou antimikrobiální a baktericidní aktivitu vůči gram-pozitivním, gram-negativním i multirezistivním bakteriím jako je *Staphylococcus aureus* (Panáček et al., 2006; Sivera et al., 2014).

### 2.2.2.1 Fotochemická syntéza

Principem fotochemické syntézy nanočástic stříbra je příprava přímou fotoredukcí kovových iontů za použití fotochemicky generovaných meziproductů. Tento proces je obvykle označován jako fotosenzibilace. Proces přímé fotoredukce dusičnanu stříbrného ( $\text{AgNO}_3$ ) v přítomnosti citrátu sodného ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) byl uskutečněn s různými zdroji záření (UV, bílé, modré, tyrkysové, zelené a oranžové) při pokojové teplotě (Tran et al., 2013; Xu et al., 2008).

Hlavními výhodami fotochemické syntézy je, že poskytují výhodné vlastnosti jako levné experimentální vybavení a jednoduchost. Tato metoda vykazuje vysokou univerzálnost. Redukce iontů stříbra je vyvolána radikály vytvářenými působením UV záření. Roztok

kromě stříbrné soli a případných stabilizátorů obsahuje organickou látku, která interaguje s UV zářením, což vede ke vzniku přítomných radikálů. Zdroj UV záření je obvykle rtuťová výbojka. Fotochemická syntéza umožňuje vyrobit nanočástice v různých médiích včetně emulzí, povrchově aktivních micelách, polymerních filmech atd. Touto metodou je možné připravit nanočástice v rozsahu velikostí 6-100 nm v závislosti na zvoleném stabilizátoru (Henglein, 1998; Tran et al., 2013; Xu et al., 2008).

### 2.2.3 Biologická syntéza

Chemická syntéza vyžaduje tři hlavní komponenty, a to stříbrnou sůl (obvykle dusičnan stříbrný,  $\text{AgNO}_3$ ), redukční činidlo a stabilizátor pro kontrolu růstu nanočástic a prevenci agregace. V případě biologické syntézy, redukční činidlo a stabilizátor jsou nahrazeny molekulami, které jsou produkovány živými organismy. Tyto látky mohou být získány z bakterií, hub, kvasinek, řas nebo rostlin. Snadné biosyntézy využívají kov redukující bakterii *Shewanella oneidensis* naočkované v roztoku  $\text{AgNO}_3$ . Metody využívající bakterii jsou ekonomické, jednoduché, reprodukovatelné a vyžadují méně energie než chemické metody (Tran et al., 2013).

Dalším příkladem je extracelulární biosyntéza nanočástic stříbra z dusičnanu stříbrného s využitím houby *Trichoderma viride*. Tato metoda poskytuje nanočástice kulovitěho tvaru, občasně tyčovité nanočástice. Velikost částic od 5 do 40 nm. Používá se *Lactobillu spp.* jako redukčního činidla a stabilizátor (Tran et al., 2013).

Biologické metody poskytují široký rozsah zdrojů pro syntézu nanočástic stříbra a tyto metody jsou považovány za ekologicky přátelské a nízkonákladové. Redukce kovových iontů za použití biologických činidel se také ukázala jako mnohem rychlejší. V biologické syntéze hraje hlavní roli, při intracelulární tvorbě nanočástic stříbra, stěna buňky použitého mikroorganismu. Záporně nabitá stěna buňky interaguje elektrostaticky s pozitivně nabitými kovovými ionty a bioredukuje ionty na nanočástice (Tran et al., 2013).

## 2.3 Aplikace nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra nacházejí uplatnění v široké oblasti aplikací. Setkat se s nimi můžeme jak v čistě vědecké, tak i v komerční sféře např. v textilních výrobcích, medicínském vybavení, kosmetice, dětských hračkách atd.

### 2.3.1 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Nanočástice stříbra nachází uplatnění jako substrát v povrchově zesílené Ramanově spektroskopii (SERS). Jedná se o velice citlivou analytickou metodu, která pracuje při velmi nízkých koncentracích chemických složek, které se nacházejí ve zkoumaném vzorku. Tato metoda nachází využití jak v chemii, tak i v biologii, farmacii a medicíně. Detekční limit SERS leží od piko do femtomolární koncentrace. V nedávné době se podařilo za použití metody SERS detekovat pouhou jednu molekulu. Bylo zjištěno, že drahé kovy (Ag, Au, Cu) jsou vhodnými materiály v případě využití laserů, které pracují v oblasti viditelného záření. Nejčastěji používaným kovem je právě stříbro. Některé studie předpokládají, že nejvyššího zesílení dosahují pouze nanočástice o určité velikosti, které jsou označovány jako „hot particles“. Optimální velikost těchto částic závisí na vlnové délce laseru, který je použit. Nicméně, AgNPs o malých velikostech poskytují vysoké zesílení v Ramanově signálu po agregaci indukované přidáním nějakého anorganického iontu, zejména pak chloridů. Intenzita Ramanova signálu závisí jak na velikosti, tak na tvaru nanočástic stříbra (Prucek et al., 2004).

### 2.3.2 Nanosenzory

Optická odezva nanočástic ušlechtilých kovů je často charakterizovaná přítomností silné absorpční vazby analytu, jenž je přičítána rezonanci kolektivního pohybu (oscilaci) elektronů, jako odezvy na dopadající elektromagnetické pole. Tohoto jevu využívá zejména výše zmíněná metoda plasmónové rezonance. Aby bylo použití reprodukovatelné a spolehlivé, je důležité, aby soubor plasmónově rezonantních částic zůstal z částic totožného složení, stejné velikosti a tvaru. Každá plasmónově rezonantní částice by měla mít totožný pás pl. rezonance. Této závislosti lze využít pro vývoj nové třídy vysoce citlivých senzorů (Liz-Marzán, Kamat, 2004; Prucek et al., 2004). Nanosenzory pracující na tomto principu by mohly nalézt využití zejména v medicíně pro diagnostické účely, ale i jako pomocník pro léčbu rakoviny. Případně v potravinářském průmyslu pro identifikaci patogenů (Tashkhourian et al., 2015; Martins Costa et al., 2015). Pro multifrekvenční analyzátoary je zase nezbytné vytvářet soubory částic, které mají rozlišitelné, zřetelné pásy plasmonové rezonance.

### 2.3.3 Biologické, medicínské a environmentální aplikace

Nanočástice stříbra se dají využít v mnoha odvětvích. Lze je použít jako antimikrobiální činidla k prevenci infekcí, jako je tomu v případě popálenin a obvazů pro traumatická zranění, diabetických vředů, plášťů, katétrů, ústích implantátů a zdravotnických zařízení. Lze využít jejich vlastností i v oblasti hygieny a hygienických produktů, jako jsou systémy čištění vody (Li et al., 2011, Prabhu et al., 2012). Použití AgNPs, jako dezinfekčního prostředku může však nést jistá rizika, jelikož vystavení účinku stříbra může přispívat k agyróze a argyrii (Rai et al., 2009).

#### 2.3.3.1 Dezinfekce vzduchu

Podle světové zdravotnické organizace 50 % biologické kontaminace vzduchu vnitřních prostor pochází ze systémů vzduchotechniky. Dochází k formování škodlivých mikroorganismů, jako jsou bakteriální nebo houbovité patogeny, které byly nalezeny ve vzduchových filtrech. Z tohoto důvodu se pátrá po vhodných metodách výroby vzduchových filtrů, které by této kontaminaci zabránily nebo alespoň situaci zlepšily. Příkladem efektivního vzduchového filtru je filtr z aktivního uhlí. Principem přípravy takového filtru je aplikace nanočástic stříbra na filtr vyrobený z aktivního uhlí. Takový filtr se jeví jako efektivní například při odstraňování bioaerosolů (Tran et al., 2013).

#### 2.3.3.2 Dezinfekce vody

Chemicky vyprodukované nanočástice stříbra mohou být jednotně umístěny na porézní keramický materiál pro vytvoření AgNPs-porézního keramického kompozitu za použití 3-amonipropyltriethoxysilanu (APTES), jako spojující molekuly. Tento kompozit může být skladován po delší dobu a je odolný vůči vymývání bez ztráty AgNPs. Sterilizační vlastnost tohoto kompozitu jako vodního filtru byla úspěšně testována vůči bakterii *E. coli*.

Dalším příkladem je tvorba AgNPs na makroperézním kopolymeru metakrystalické kyseliny. Novou třídou materiálů pro purifikaci vody jsou polyethersulfonové (PES) hybridní ultrafiltrační membrány vázané na modifikované halloysit nanotrubičky (HNTs) naložené chemicky produkovánými AgNPs. Tyto hybridní membrány vykazují účinnosti vůči *E. coli* a *S. aureus* až 99,9 a 99,8 % (Tran et al., 2013).

### **2.3.3.3 Využití nanočástic stříbra jako impregnace**

Zdravotnické nástroje pokryté stříbrnými ionty nebo kovovým stříbrem vykazují nepříznivé klinické testy. Důvodem těchto negativních výsledků je fakt, že dochází k inaktivaci kového stříbra při kontaktu s krevním plazmatem a nedostatečná odolnost takto použitých povlaků. Nanočástice stříbra mohou být využity jako impregnace zdravotnických nástrojů a jejich aplikace vede ke slibné antimikrobiální aktivitě. AgNPs se využívají v praxi například k pokrývání chirurgických masek. Nespornou výhodou impregnace zdravotnických nástrojů je ochrana jak vnější, tak i vnitřní. Při impregnaci AgNPs na vnější povrch nástrojů dochází ke kontinuálnímu uvolňování stříbrných iontů, které poskytují vysokou antimikrobiální aktivitu (Tran et al., 2013).

### **2.3.3.4 Stříbrné obvazy**

Již od 18. století jsou záznamy o využití koloidního stříbra při léčbě popálenin a vředů. Obvazy hrají hlavní roli při léčbě povrchových ran. V nedávné době došlo k vývoji rezistentních kmenů patogenů, což se stalo hlavním důvodem pro inovaci dosud používaných obvazů. Jedná se o zásadní průlom na poli léčby ran a komplikací spojených s propuknutím infekcí. Antibakteriální vlastnosti a toxicita stříbra vůči mikroorganismům je předmět mnoha studií. Stříbrné obvazy využívají postupného uvolňování stříbrných nanočástic z obvazů. Na účinnost obvazů má také vliv jejich chemická a fyzikální forma, afinita apod. (Tran et al., 2013; Rai et al, 2009; Panáček et al, 2006; Pannerselvam et al., 2016).

### 3 FLUORESCENCE

Termín luminiscence pochází z latinského *lumen* neboli světlo. Různé druhy luminiscence jsou klasifikovány podle módu excitace. Kromě fotoluminiscence existuje například chemiluminiscenci, bioluminiscence, elektroluminiscence, katodoluminiscence, radioluminiscence atd. Poprvé byl výraz luminiscence použit v roce 1888 německým fyzikem Eilhardem Wiedemannem (Valeur, Barbera-Santoz, 2011).

Luminiscenci je možné definovat jako přebytek záření nad tepelným vyzařováním tělesa. Lze ji rozdělit na fluorescenci, fosfoescenci a zpožděnou fluorescenci (Fišar, 2003).

Termín fluorescence poprvé použil Sir George Gabriel Stokes v roce 1843. Stokes poprvé popsal luminiscenci ve fluoridu vápenatém (CaF) jako fluorescenci. Jako zdroj excitačního světla používal světlo ze Slunce. Sluneční paprsky procházely skrz filtr složený z hydroxidu měďnatého (Cu(OH)<sub>2</sub>) ve vodném roztoku obsahující amoniak (NH<sub>3</sub>). Následně bylo přefiltrované světlo fokusováno na vzorek a emitované světlo společně s filtrovaným excitačním slunečním světlem prošlo přes žlutý filtr složený z vodného roztoku dichromanu draselného (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Stokes pozoroval fluorescenci pouhým zrakem (Valeur, Barbera-Santoz, 2011).

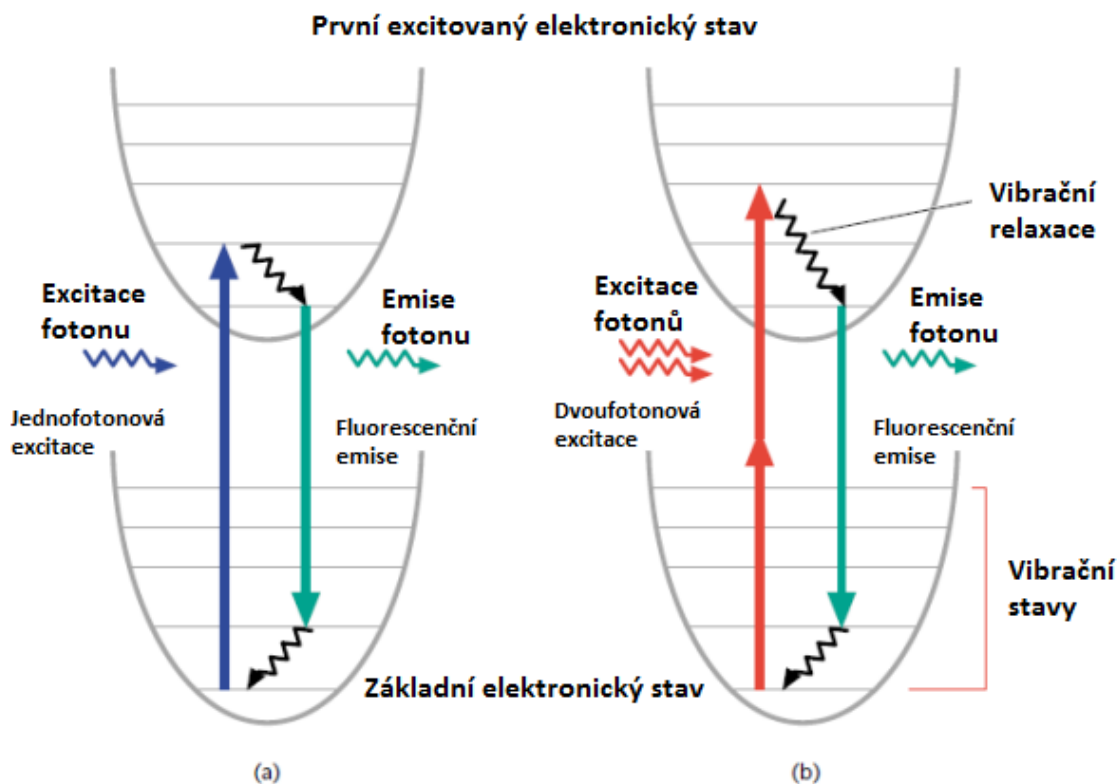
Fluorescenci lze definovat jako stav, při kterém dochází k emisi záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody. Fluorescenci můžeme pozorovat během buzení. Po jeho vypnutí prakticky ihned zmizí. Doba dohasínání dosahuje řádu 10<sup>-8</sup> s (Fišar, 2003; Kumar, 2006).

Fosfoescence nastává, pokud se při emisi záření z excitovaného elektronového stavu uplatní metastabilní hladina. Fosfoescence má delší dobu života než fluorescence (>>10<sup>-8</sup> s) a obvykle ji nelze pozorovat v roztocích při pokojové teplotě (Fišar, 2003).

Zpožděná fluorescence je pojem, který popisuje zářivý přechod ze stejného singletního stavu S<sub>1</sub> jako v případě fluorescence, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který daná molekula setrvává v metastabilním tripletovém stavu. Doba dohasínání je přibližně rovna době dohasínání fosfoescence měřené za stejných podmínek. Emisní spektrum je identické s emisním spektrem okamžité fluorescence (Fišar, 2003).

V roce 1835 Alexander Jablonski použil grafický diagram znázorněný na obrázku 2, aby popsal proces absorpčního světla a následnou fluorescenční emisi světla z excitovaného stavu (Barry R Masters, 2010).

Jednofotonová excitace se vyskytuje při absorpci jednoho fotonu. Dvoufotonová excitace se vyskytuje při absorpci dvou nízkoenergetických fotonů přes krátko trvající přechodné stavy. Po obou excitačních procesech fluorofory relaxují do nejnižší energetické hladiny prvního excitovaného stavu skrz vibrační procesy. Následná fluorescenční emise probíhá pro oba relaxační módy stejným způsobem (Fišar, 2003; So, 2002).



**Obrázek 3** Jablonského diagram jednofotonové (a) a dvoufotonové (b) excitace

Stokesův zákon lze popsat jako děj, kdy fluorescence je často charakterizována vlnovou délkou emitovaného záření, která nabývá delších vlnových délek než vlnová délka excitačního záření (Fišar, 2003; Barry R Masters, 2010).

Vavilovy postuláty říkají, že při Stokesovském buzení fotoluminiscence, kdy je frekvence excitačního záření větší nebo rovna frekvenci průsečíku emisního a excitačního pásu, nemůže být energetický výtěžek větší než 1. Naopak při anti-Stokesovském buzení, kdy je frekvence excitačního záření menší než frekvence průsečíku emisního a excitačního pásu, energetický výtěžek klesá s růstem tohoto rozdílu s klesající teplotou (Fišar, 2003; Sauer et al, 2011).



Intenzita, spektrální složení, polarizace, doba dohasínání, koherentní vlastnosti se řadí mezi hlavní charakteristiky fluorescence. Emisní spektrum lze popsat jako závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce budícího záření. Excitační spektrum lze popsat jako závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření (Fišar, 2003).

Kashovo pravidlo popisuje skutečnost, že před emisí fluorescenčního kvanta dochází obvykle k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, z čehož vyplývá, že k fluorescenčnímu přechodu dochází z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu (Fišar, 2003; Sauer, 2011).

Vavilovův zákon definuje, že kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. Tedy emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace. Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem platí pro velké množství organických molekul. Její příčinou je to, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Velká část absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu. Vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají tutéž strukturu. Po absorpci světla přejde elektron z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_0$  na vyšší vibrační hladinu  $S_1$ . Následuje rychlá vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu excitovaného stavu  $S_1$  (řádově  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  s) a až poté dochází k zářivému přechodu na vyšší vibrační hladinu stavu  $S_0$ . Navíc dojde k další vibrační relaxaci na rovnovážnou vibrační hladinu stavu  $S_0$  (Barry R Masters, 2010; Fišar, 2003).

Stokesův posun je označení pro rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu. Vlivem elektrostatických sil dochází v roztocích k interakcím dipól-dipól, případně dipól-indukovaný dipól k solvataci fluoreskujících molekul mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla. Při měření fluorescence dochází ke změnám v optických spektrech. To je důsledek různé solvatace molekul. Molekuly totiž mají v základním a excitovaném stavu obecně různé dipólové momenty i polarizovatelnou. Vzhledem k tomu, že se část absorbované energie spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i základním stavu, je energie emitovaného fluorescenčního záření menší než u čistě elektronového přechodu (Barry R Masters, 2010; Fišar, 2003).

Kvantový výtěžek fluorescence lze definovat podle rovnice (14), kde  $\nu_e$  je počet emitovaných světelných kvant a  $\nu_a$  počet absorbovaných světelných kvant. Nebo nepřímo jako

poměr pozorovaného střední doby dohasínání fluorescence a vnitřní doby života excitovaného stavu bez zhášecích mechanismů (Fišar, 2003; Sauer et al., 2011; So, 2002).

$$\Phi = \frac{\nu_e}{\nu_a} \quad (14)$$

Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě absorpce násobené kvantovým výtěžkem fluorescence. Použitím citlivých fotonásobičů pro detekci fluorescenčního záření a při buzení intenzivním světlem lze pozorovat koncentrace rozpuštěných látek až  $10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Čehož lze dosáhnout o 4 řády vyšší citlivosti než u absorpčního měření (Fišar, 2003; So, 2002).

Efekt vnitřního filtru označuje chybu, která vzniká při měření intenzity fluorescence. Jedná se o důsledek faktu, že vrstvy vzorku vzdálenější od roviny dopadu budícího záření na vzorek, jsou excitovány nižší intenzitou světla. Část budícího záření je totiž absorbována povrchovými vrstvami. Tento jev se projevuje pouze u silněji absorbujících roztoků. Je nutné s tímto jevem vždy počítat a korigovat jej v případě přesného měření kvantových výtěžků (Fišar, 2003).

Doba života excitovaného stavu  $\tau$  se určuje průměrným časem, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do základního stavu. Doba života fluorescence se pohybuje kolem  $10^{-8}$  s. Pokud nejsou přítomny netradiční zhášecí procesy, nazývá se doba života fluorescence vnitřní doba života. Lze ji spočítat podle rovnice (15), kdy  $\Gamma$  a  $k$  vyjadřují zářivý a nezářivý poměr. Za jistých podmínek ji lze vypočítat také jako poměr změřené doby života a kvantového výtěžku fluorescence (Fišar, 2003; So, Dong, 2001).

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k} \quad (15)$$

Zhášení fluorescence je definována jako bimolekulární proces, jenž snižuje kvantový výtěžek beze změny fluorescenčního emisního spektra. Jeho příčinou mohou být různé procesy. K srážkovému nebo také dynamickému zhášení dochází, když je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován, tedy se nezářivě vrací do základního stavu, při srážce s molekulou zhášedla. Nepochází k chemickým změnám molekul. Dynamické zhášení popisuje Stern-Volemerova rovnice (16), kde  $\Phi_0$  je kvantový výtěžek fluorescence bez přítomnosti zhášedla,  $\Phi$  kvantový výtěžek fluorescence v přítomnosti zhášedla o koncentraci  $C_q$ ,  $\tau_0$  doba zhášení fluorescence bez přítomnosti zhášedla,  $\tau$  doba zhášení fluorescence v přítomnosti zhá-

šedla,  $k_q$  je bimolekulární zhášecí konstanta. Nejčastějšími dynamickými zhášedly jsou molekulární kyslík ( $O_2$ ), bróm (Br), jód (I) a akrylamid ( $C_3H_5NO$ ) (Fišar, 2003; So, Dong, 2002).

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 C_q \quad (16)$$

Statické zhášení je proces, kdy se po kontaktu fluoroforu a zhášedla vytvoří nefluorescenční komplex. Dochází tedy k chemické změně molekul. Statické zhášení popisuje rovnice (17), kde  $K_a$  je asociační konstanta fluoroforu a zhášedla. Mezi statická zhášedla patří báze nukleových kyselin a těžké kovy (Fišar, 2003; Hofr, 2013).

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_a \tau_0 C_q \quad (17)$$

Samozhášení je děj, při němž dochází k zhášení fluoroforem samotným, k čemuž dochází při jeho vysokých koncentracích nebo při vysoké hustotě značení (Fišar, 2003; So, Dong, 2002).

Jedná se o jen nevratné rozklad excitovaného fluoroforu, kdy fakticky dochází ke ztrátě způsobilosti emitovat záření, jejíž příčinou je vysoká intenzita záření v přítomnosti molekulárního kyslíku. Existují však možnosti, jak tomuto jevu zabránit. Lze toho dosáhnout například omezením vystavení fluoroforů luminační energii, což ovšem vede ke snižování intenzity signálu (Davidson, Abramowitz, 2002; Fišar, 2003; So, 2002).

Polarizované fluorescence je jev, ke kterému dochází, pokud je roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným světlem. Důsledkem čehož je, že budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace. Pokud je průměrná rotační relaxační doba výrazně delší než doba dohasínání fluorescence, pak i výsledná fluorescence bude polarizovaná. Pokud by však průměrná rotační relaxační doba zřetelně kratší než doba dohasínání, potom klesne anizotropie systému ještě před emisí na limitní hodnotu. V případě, že jsou doba dohasínání a rychlost molekulární reorientace shodné, bude polarizace modulována molekulárním pohybem. Detekce polarizace fluorescence udává informace například o molekulární orientaci a pohyblivosti (Fišar, 2003; Sauer et al., 2011)

## 3.1 Spektrofluorimetrie

### 3.1.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je výborným nástrojem pro studium materiálů, které vykazují fluorescenci buď v přirozené formě (primární nebo autofluorescence) nebo sekundární fluorescenci. Tato forma optické mikroskopie se velmi rychle rozvíjí a patří mezi jedny z nejvíce rostoucích oblastí výzkumu využívajících mikroskopii.

Základním úkolem fluorescenční mikroskopie je propustnost excitačního záření k ozáření vzorku a následně separace mnohem slabšího fluorescenčního ze silnějšího excitačního světla záření. Tedy pouze emisní světlo dopadá na detektor. Výsledné fluorescenční oblasti září proti temnému pozadí s dostatečným kontrastem. Ultrafialové záření (UV) o specifické vlnové délce nebo sada vlnových délek jsou produkovány průchodem záření ze zdroje emitujícího UV záření přes excitační filtr. Filtrované UV záření vzorku ozařuje vzorek, který emituje fluorescenční záření delších vlnových délek, zatímco zatím co je ozářeno UV zářením. Viditelné záření emitováno ze vzorku je následně filtrováno přes bariérový filtr, který nedovolí odráženému UV záření, aby prošlo. Je třeba zmínit, že toto je pouze jeden mód mikroskopie, kdy vzorek následně po excitaci vydává vlastní záření. Emitované světlo vyzařuje sféricky ve všech směrech (Barry R Masters, 2010; Davidson, Abramowitz, 2002).

Výhody fluorescenční mikroskopie jsou založeny na attributech, které nejsou tak dostupné v případě jiné optické mikroskopie. Využití fluorochromů umožňuje identifikovat buňky, submikroskopické buněčné složky a entity, které mají vysoký stupeň specifity vně materiálu, který nefluoreskuje. Navíc fluorescenční mikroskop umožňuje zobrazit přítomnost fluoreskujícího materiálu s vynikající citlivostí. Extrémně malý počet fluoreskujících molekul (zhruba méně než 50 molekul na krychlový mikrometr) mohou být touto metodou analyzovány. Dvoufotonová fluorescenční mikroskopie umožňuje třírozměrné snímkování biologických vzorků *in vivo* (Davidson, Abramowitz, 2002).

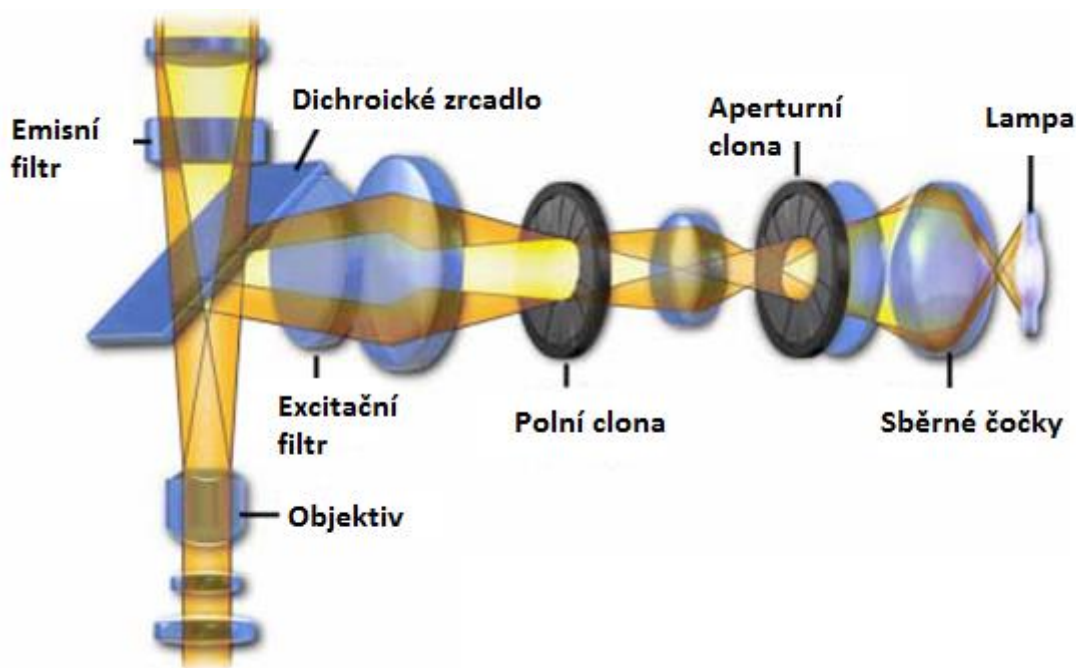
Ačkoliv fluorescenční neposkytuje prostorové rozlišení pod difrakčním limitem příslušných cílů, přítomnost fluorescenčních molekul se pod tímto difrakčním limitem je viditelná. Technika fluorescenční mikroskopie může být aplikovaná na organické materiály, živé materiály (s použitím *in vitro* nebo *in vivo* fluorochromů). Tuto techniku lze aplikovat i na anorganické materiály (například při zkoumání nečistot na polovodičových destičkách).

Existují studie, které mapují použití fluorescenčních sond, které umožňuje rychle sledovat měnící se koncentraci fyziologické iontové koncentrace (vápník, hořčík atd.) a hodnot pH v živých buňkách. Existují vzorky, které fluoreskují při ozáření o kratších vlnových délkách (primární nebo autofluorescence). Autofluorescence se jeví užitečná při studiu rostlin, uhelné petrografii, sedimentární horninové petrologie a v polovodičovém průmyslu. Fluorochromy schopné absorbovat a následně emitovat záření jsou velmi specifické k cíli, ke kterému se přichycují a mají značný výtěžek v poměru absorpce-emise, což je činí velmi hodnotné při biologických aplikacích. Rozvoj využití fluorescenční mikroskopie souvisí blízce s rozvojem stovky fluorochromů se známými excitačními, emisními křivkami a dobře známé biologické struktury cílů. Při rozhodování, kterou fluorescenční značku použít pro mikroskopii, nesmíme zapomínat, že zvolený fluorochrom by měl mít vysokou pravděpodobnost absorpce excitovaného světla a měl by zůstat připojen k cílovým molekulám. Fluorochrom by měl být schopný poskytnout dostačující výnos emitované fluorescence. (Aleman et al., 2014; Davidson, Abramowitz, 2002).

### 3.1.2 Fluorescenční mikroskop

Vynález laseru v roce 1960 a jeho další vývoj, který proběhl v posledních pěti dekadách, poskytl pro fluorescenční mikroskopii nespočet zdrojů. V 1982 firma Carl Zeiss představila první laserový skenovací mikroskop. Moderní fluorescenční mikroskop může být složen z široké škály fotonových detektorů, například z fotonásobičů, lavinových fotodiod a CCD (charge-couple device). Každé zařízení má své výhody a limity, vezmeme-li v úvahu cenu zařízení, poměr signál-šum, citlivost, rychlost snímání obrazu (Barry R Masters, 2010).

Dva faktory limitují využití fluorescenčního mikroskopu, když pomineme šum a optickou aberaci, kterou způsobují všechny typy mikroskopů. První, proces fluorescence závisí na ukládání energie do biologického vzorku. Druhý, použití exogenních fluorescenčních sond může ovlivnit jak buněčnou strukturu, tak buněčné funkce. Naštěstí však existují alternativní techniky, jak těmto limitacím zabránit, či kterými je lze alespoň zmírnit (Davidson, Abramowitz, 2002).



**Obrázek 4** Schématické uspořádání fluorescenčního mikroskopu (Davidson, Abramowitz, 2002).

V případě transmisního fluorescenčního mikroskopu prochází světlo excitačním filtrem. Na vzorek následně světlo dopadá zespodu jak tomu bývá u klasického světleného mikroskopu. Vzorek však není osvětlován klasickým kondenzorem, nýbrž kondenzorem zástinovým. Kondenzor tohoto typu odráží světlo, tak aby na vzorek dopadalo z boku. Prošlé excitační záření letí mimo objektiv a do objektivu se dostává pouze emitovaná fluorescence (Reichman, 1998).

Pokud se jedná o epifluorescenční mikroskop, excitační záření prochází objektivem, záření dopadá na studovaný vzorek svrchu. Následně se emisní záření vrací zpět do objektivu. U tohoto typu mikroskopu je nezbytné využít zvláštního typu zrcadla, které odráží excitační záření do objektivu a emisní záření propouští do okuláru. Zvláštním typem zrcadla, které se v epifluorescenční mikroskopii využívá je dichroické zrcadlo. Takové zrcadlo odráží a propouští záření podle vlnové délky záření (Reichman, 1998; Kumar, 2006).

### 3.2 Fluorofory

Fluorofory lze obecně rozdělit na dva druhy, fluorofory vnitřní a vnější. Vnitřní neboli vlastní fluorofory se vyskytují přirozeně, zatímco vnější nebo také jinak nevlastní se přidávají ke vzorkům, které nedisponují vhodnými fluorescenčními vlastnostmi (Davidson, Abramowitz, 2002).

Fluorescence v organických molekulách, pocházející z delokalizovaných  $\pi$  orbitalů konjugovaných dvojných vazeb, se nazývá vlastní fluorescence a vykazují ji proteiny (fluorescence v UV oblasti); redukované formy nikotinamidadenindinukleotidu (NADH), nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADHP), oxidované formy flavoprotein, vitamin A (fluorescence ve VIS oblasti – modrá až žlutá); cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin, chlorofyl (VIS oblast – červená). Například v proteinech jsou hlavními fluorofory aminokyseliny tryptofan, tyrozin a fenylalanin. Jejich absorpční pás leží mezi 240-300 nm. Bohužel tento typ fluorescence nevykazuje vlastnosti, které by byly užitečné pro biologické značkování (Fišar, 2003; Kumar, 2006). Fluorescenci poskytují také nanočástice. Lze zmínit například kvantové tečky. Dále se používají pro značení biomolekul například nanočástice zlata (Huang et al., 2014).

Nevlastní fluorofory jsou využívány mnohem četněji, než je tomu v případě vlastní fluorescence. Tyto fluorofory jsou přidávány ke vzorku a mohou se k němu vázat buď kovalentně (fluorescenční značky) nebo nekovalentně (fluorescenční sondy). Nejvíce využívanými fluorofory jsou fluorescein, rhodamin, alexa (Fišar, 2003; Kumar, 2006).

### 3.2.1 Fluorescenční značky

Fluorescenční značky jsou velmi často používány ke značení proteinů. Váží se na jejich aminové, sulfhydrylové či histidinové boční řetězce, případně thiolové skupiny atd. Mezi nejznámější fluorescenční značky patří fluoresceinizothiokynát (FITC) a tetrametylrhodamini-zothiokyanát (TRITC), které nacházejí své uplatnění v imunofluorescenčních metodách (Fišar, 2003).

### 3.2.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy mimo to, že se vážou ke zkoumanému vzorku nekovalentně, také často mění své fluorescenční vlastnosti. Pro studium změn konformace bílkovin, tloušťky membrán, membránového potenciálu, viskozity prostředí a tak podobně lze využít iontových fluoroforů, u nichž dochází ke změně kvantového výtěžku někdy i ke změně spektrálních vlastností. Rozeznáváme velké množství různých specifických sond, mezi které patří například sondy pro polaritu prostředí, membránové fluorescenční sondy, lipidové sondy, sondy pro membránový potenciál, sondy pro nukleové kyseliny (akridinová oranž, ethidium bromid, propidium jodid) a sondy pro přenos energie (Fišar, 2003).

### 3.2.2.1 Vazby fluorescenčních sond na bílkoviny

Ačkoli bílkoviny vykazují vlastní fluorescenci díky reziduum jako je tryptofan, pro zkoumání biologických procesů je výhodné využití příměsových fluoroforů. Mezi výhody použití fluoroforů se řadí větší flexibilita ve výběru umístění fluoroforu a zvýšení fluorescenčních vlastností vhodných pro větší množství technik. Fluorofor se uchytlí k bílkovině a jejímu prostředí. V nejjednodušším případě tento proces umožňuje vizualizaci bílkoviny. Pokročilejší testy mohou měřit bílkovina-bílkovina interakce nebo konformační změny pomocí měření intenzity změn nebo pomocí Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Těmito metodami lze provádět měření jak celkového objemu vzorku, tak jedné jediné molekuly. Měření jedné molekuly poskytuje vysokou citlivost (Toseland, 2013).

Před tím, než je zvolen vhodný fluorofor, je podstatné definovat o jaký experiment se jedná. Zda půjde o spektroskopické měření jedné molekuly, monitoring bílkoviny či použití fluorescenčního biosenzoru apod. Dá se obecně říci, že by vhodný fluorofor měl být dostatečně malý, zářivý a stabilní. Měl by také být dostatečně specifický bez tendence oligomerizovat s možností značit více bílkovin v tom samém čase. Bohužel splnit všechna tato pravidla je velmi náročné a je třeba dělat jisté kompromisy. Neexistují dokonalé fluorofory a nové metody se neustále vyvíjejí (Toseland, 2013).

Organické fluorofory mají vynikající vlastnosti. Patří mezi ně širší spektrální rozsah, výborná fotostabilita, malé velikosti a v mnoha případech vyšší jas. Poskytují výhody pro *in vivo* snímkování a jsou velmi užitečné díky jejich vysoké specifčnosti ke zkoumanému cíli (Toseland, 2013).

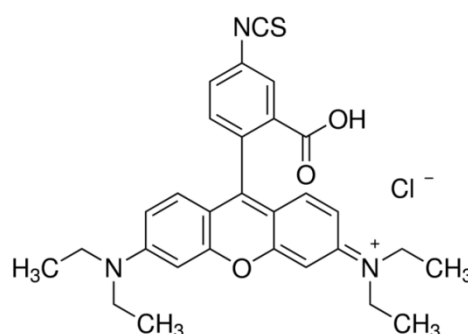
Spojení fluoroforu s cílenou bílkovinou lze dosáhnout buď přímými, nebo nepřímými značkovacími metodami. Největším problémem těchto metod je kontrola specifčnosti značkování a určení jeho stechiometrie. Bohužel nelze dosáhnout toho, aby značkování bylo 100 %. Z tohoto důvodu přítomnost volného barviva způsobuje vysoké pozadí a nespecifický signál. Proto je důležité pokusit se oddělit označenou bílkovinu od neoznačené (Toseland, 2013).

Přímé chemické značení purifikovaných bílkovin se zaměřuje na cystein a aminové skupiny. Cysteiny poskytují výbornou flexibilitu pro výběr místa značkování díky jejich nízké frekvenci (Toseland, 2013). Amino-reaktivní barviva se nejčastěji využívají k přípravě bio-konjugátů pro imunochemii, *in situ* fluorescenční hybridizace, trasování buněk, značkování receptorů. V těchto aplikacích je velice důležitá stabilita chemických vazeb mezi amino-



reaktivní barvou a biomolekulou, jelikož fluorescenční konjugáty jsou často předmětem důsledné inkubace, hybridizace a promývání (Biomol, 2013).

Existuje velký počet fluoroforů, které jsou používány pro značkování proteinů. Mezi nejvíce používané se řadí FITC (fluorescein 5(6)-isothiokyanát,  $C_{21}H_{11}NO_5S$ ), který se vážně na amino skupiny v bílkovině, TRITC (tetramethylrhodamin,  $C_{25}H_{21}N_3O_3S$ ), který se vážně na amino a thiolové skupiny v bílkovině a RBITC (rhodamin B isothiokyanát,  $C_{29}H_{30}ClN_3O_3S$ ), který se váže na amino skupiny. Je třeba zmínit i kvantové tečky, které taktéž našly uplatnění při značkování bílkovin, jelikož vykazují vysokou stabilitu a jas (Toseland, 2013).



**Obrázek 5** Rhodamin B isothiokyanát - RBITC,  $C_{29}H_{30}ClN_3O_3S$  (Sigma-Aldrich, 2017)

### 3.2.2.2 Vazby fluoroforů na nanočástice

Pro účely fluorescenční detekce je možné připravit fluorescenčně značené nanočástice. Cmiel et al., 2016 se ve své práci zabývají fluorescenčně značeným magnetitem pro účely neinvazivní, citlivé a bezpečné vizualizace transplantovaných buněk v lidském nebo zvířecím těle. Nanočástice magnetitu fluorescenčně značené pomocí Rhodaminu B isothiokyanátu lze využít k lokalizaci a kvantifikaci transplantovaných buněk. Nejpoužívanějším kontrastním činidlem v MRI sice zůstávají nanočástice ferumoxidu, avšak v tomto případě dochází v průběhu značkování ke kumulaci těchto nanočástic, což vede k nedostatečné biokompatibilitě ve značkových buňkách. Z tohoto důvodu je jejich praktické uplatnění v medicíně komplikované či přímo nemožné. Nová metoda detekce spočívá v přípravě nanočástic, které obsahují superparamagnetické jádro a fluorescenční molekuly Rhodaminu, které jsou navázány na povrchu jádra. Příprava takových nanočástic byla provedena funkcionalizací nanočástic magnetitu jednoduchou inkubací v tetramethylamonium perchlorátu za neutrálního pH v přítomnosti Rhodamimu. Zásadní výhodou této metody je, že nedochází k markantní kumulaci těchto nanočástic v buňce.

Dále lze zmínit práci Jang et al., 2014, která se zaměřila na fluorescenční značení železných nanočástic stříbra složených z kovového jádra a slupkou z oxidu křemičitého ( $\text{SiO}_2$ ) o různé tloušťce, které byly fluorescenčně značeny Cy barvivy. Li et al., 2013 se ve své práci zaměřili na přípravu fluorescenčních imunosenzorů pro detekci viru chřipky založené na autokatalýze stříbra.

Duke et al., 2014 ve své práci připravily povrchově modifikované nanočástice stříbra zapouzdřené do tenké křemíkové vrstvy, které byly funkcionalizovány neutravidinem. K takto připraveným nanočásticím byl přidán bovinní sérový albumin s biotinem a fluoresceinem isothiokyanátem. Došlo k navázání biotinu na neutravidin a tím k fluorescenčnímu označení nanočástic.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

### 4.1 Chemikálie

Během experimentu byly použity chemikálie uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4** Použité chemikálie pro přípravu experimentu

Název	Chemický vzorec	Molární hmotnost [g·mol <sup>-1</sup> ]	Čistota	Výrobce
Dusičnan stříbrný	AgNO <sub>3</sub>	169,87	p. a.	Penta
Hydroxid amonný	NH <sub>4</sub> OH	35,05	p. a.	Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný	NaOH	40,00	p. a.	Lach-Ner
D (+)-maltóza monohydrát	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O	360,31	p.a.	Sigma-Aldrich
Bovinní sérový albumin	-	66 000	≥98 %	Sigma-Aldrich
Rhodamin B isothiokyanát	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	536.08	99 %	Sigma-Aldrich

### 4.2 Pomůcky a přístroje

Při práci v laboratoři bylo použito běžné laboratorní sklo. Vzorky byly odebírány pomocí automatických pipet značky Hirschmann.

K míchání vzorků byly použity magnetické míchačky značky Heidolph typu Hei-Mix S. K inkubaci vzorků s vybranými barvami byla použita rolovací třepačka značky BioCote. Měření absorpčních spekter bylo prováděno na spektrofotometru značky Specord S600 výrobce AnalytikJena, který pracuje v rozsahu vlnových délek 190–1050 nm. Pro měření velikosti částic byl použit přístroj pra-cující na principu dynamického rozptylu světla Zeta Potential Analyzer 90 Plus značky Brookhaven. Dále byl při přípravě vzorků použit ultrazvuk Ficher Brand FB11201 a od-středivka značky Hettich Zentrifugen typu EBA 20. Nanočástice stříbra byly charakterizo-vány pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEM 2011 (Jeol, Japan).

Pro zobrazení buněk vystavených fluorescenčně značeným částicím Ag byl použit fluorescenční mikroskop AF5013i T od firmy Arsenal s.r.o. Pro dialýzu byly použity celulózové dialyzační membrány značky Fisherbrand o tloušťce stěny 23 μm

(MWCO 15000). Pro sledování interakce značených AgNPs s buňkami bylo použito světelného mikroskopu s fluorescenčním módem Olympus IX 70. Pro inkubaci buněk se vzorky byl použit CO<sub>2</sub> inkubátor (N – Biotek).



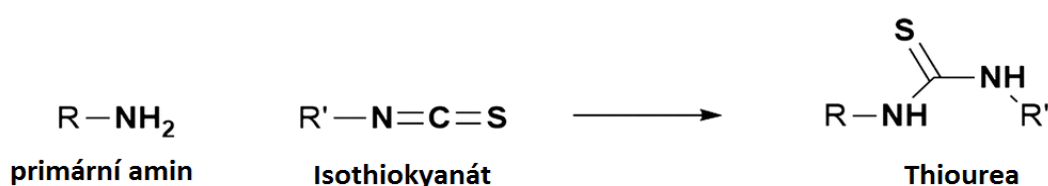
Obrázek 6 Fluorescenční mikroskop

#### 4.2.1 Příprava nanočástic stříbra fluorescenčně značených pomocí Rhodaminu B isothiokyanátu

Ke značení nanočástic stříbra pomocí Rhodaminu B isothiokyanátu (RBITC) byly použity nanočástice povrchově modifikované bovinním sérovým albuminem, na který lze navázat RBITC reakcí aminoskupiny v molekule proteinu s isothiokyanátovou skupinou v molekule RBITC (obrázek 7) (Thermo Fisher Scientific, 2010; Life Technologies, 2013). Značení částic stříbra pomocí RBITC bylo realizováno dvěma způsoby. V prvním způsobu byly nejprve připraveny nanočástice stříbra modifikované BSA a na takto modifikované částice stříbra byl ve druhém kroku navázán RBITC. Ve druhém způsobu byl nejprve vytvořen komplex BSA-RBITC, který byl následně přidán do reakční směsi při přípravě nanočástic stříbra.

V rámci prvního způsobu přípravy značených částic byly pomocí modifikované Tollensovy metody připraveny nanočástice stříbra povrchově modifikované BSA následujícím postupem: do 50 ml kádinky bylo odpipetováno 5 ml  $5 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> dusičnanu stříbrného, 1,25 ml 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> amoniaku, 12,55 ml destilované vody, 1 ml 0,24 mol·dm<sup>-3</sup> hydroxidu

sodného, 5 ml  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  maltózy jako redukčního činidla. Po 30 s od přidání maltózy bylo do reakční směsi přidáno 0,25 ml 0,1% roztoku bovinního sérového albuminu. Celkový objem reakční směsi činil 25 ml. Příprava probíhala za míchání na elektromagnetické míchačce při laboratorní teplotě. Takto připravené nanočástice stříbra jsou pro účely této práce označeny jako Ag@BSA. V následujícím kroku bylo do zkumavky odpipetováno 9,9 ml disperze Ag@BSA a k tomu 0,1 ml  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  roztoku RBITC. Směs se nechala inkubovat po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě, aby došlo k proběhnutí reakce a navázání barviva na protein. Takto připravené značené nanočástice stříbra byly pro účely této práce označeny jako Ag@BSA@Rh\_I.



**Obrázek 7** Reakční schéma primárního aminu s isothiokyanátem (Tabujew, Peneva, 2014)

V rámci druhého způsobu přípravy byl nejprve připraven komplex BSA-RBITC smícháním 9.9 ml 0,1 % roztoku BSA s 0,1 ml  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  RBITC. Tato směs byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě pro vytvoření vazby mezi proteinem a RBITC. Po uplynutí inkubační doby byla směs BSA-RBITC použita pro značení nanočástic stříbra obdobným způsobem jako v předchozím případě pouze s tím rozdílem, že do reakční směsi nebyl přidán pouze roztok BSA, ale komplex BSA-RBITC. Komplex BSA-RBITC byl v množství 0,25 ml přidán do reakční směsi po 30 s od nástřiku redukční látky. Konečné koncentrace všech reakčních látek byly v obou metodách přípravy totožné. Takto značené nanočástice Ag nesou pro účely této práce název Ag@BSA@Rh\_II.

Po přípravě byly vzorky Ag@BSA@Rh\_I a Ag@BSA@Rh\_II přečištěny a zbaveny přebytečného a nenavázaného proteinu a barviva pomocí dialýzy a centrifugace. Vzorek značených částic Ag o objemu 10 ml byl umístěn do dialyzační membrány a 2x dialyzován po dobu 2 hodin a jednou po dobu 24 hodin vždy v 1 l roztoku destilované vody zalkalizované pomocí NaOH na pH=11. Následně byl vzorek 2x po 20 minutách separován pomocí centrifugy při 6000 ot./min. a po každé separaci promyt a doplněn na objem 10 ml destilo-

vanou vodou zalkalizovanou na  $\text{pH}=11$ . Takto přečištěné vzorky byly charakterizovány pomocí UV/Vis absorpční spektroskopie, dynamického rozptylu světla, transmisní elektronové mikroskopie a byla u nich stanovena celková koncentrace stříbra pomocí atomové absorpční spektroskopie (vzorky byly mineralizovány v 2%  $\text{HNO}_3$ ). Následně byly značené nanočástice aplikovány pro zobrazení v testovaných buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie

#### **4.2.2 Fluorescenční mikroskopie fibroblastů vystavených značeným nanočásticím stříbra**

Z již známých experimentů byla pro interakci s fibroblasty zvolena netoxická koncentrace nanočástic stříbra 20 mg/l (Panáček et al., 2009). Pro sledování a následné získání snímků z fluorescenčního mikroskopu byly použity buňky NIH/3T3 myších fibroblastů (ATCC, USA). Tyto buňky byly rozesazeny do 96-jamkové destičky. Po 24 hodinové inkubaci byly buňky vystaveny značeným nanočásticím stříbra. Vstup značených AgNPs do vnitrobuněčného prostředí byl pozorována v časech 30 min, 1,5 hod., 3 hod. a 24 hodin od aplikace nanočástic pomocí fluorescenčního mikroskopu. Před samotným měřením byly buňky šetrně promyty fosfátovým pufrém (PBS,  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{pH} 7,4$ ). Pro měření byly ponechány v 50  $\mu\text{l}$  PBS.

#### **4.2.3 Fluorescenční mikroskopie kvasinek vystavených značeným nanočásticím stříbra**

V prvním fázi byla nejprve vyhodnocována toxicita nanočástic stříbra modifikovaných pouze BSA (připravené v rámci prvního způsobu přípravy nanočástic Ag) vůči testovaným kvasinkám *Saccharomyces cerevisce* k určení maximální netoxické koncentrace stříbra, která byla následně aplikována v případě fluorescenčně značených částic Ag.

Vzorek sledovaných kvasinek *Saccharomyces cerevisce* byl připraven rozmícháním 100 mg pekařských kvasnic v 10 ml destilované vody obsahující glukosu (1 g/l). Následně bylo do jednotlivých zkumavek rozpipetováno vždy 1 ml suspenze kvasinek, následně bylo přidáno odpovídající množství destilované vody a poté disperze nanočástic stříbra v takovém množství, aby byly dosaženy koncentrace stříbra 80, 60, 40 a 20  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  v celkovém objemu 10 ml. Toxicita nanočástic Ag byla vyhodnocována na základě úbytku počtu kvasinek pomocí počítačů Bürkerovy komůrky po 1 hodině od aplikace nanočástic stříbra ke kvasinkám.

V dalším kroku experimentu byla sledována interakce fluorescenčně značených AgNPs s kvasinkami. Do zkumavky byl odpipetován 1 ml suspenze kvasinek. K suspenzi bylo odpipetováno odpovídající množství destilované vody a disperze značených stříbrných částic, aby výsledná koncentrace v případě modifikovaných nanočástic stříbra odpovídala koncentraci  $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Objem vzorku byl opět 10 ml. Takto připravené vzorky byly ponechány po dobu 30 min. Po uplynutí této doby byly kvasinky separovány pomocí centrifugy, promyty a zpětně suspenzovány v 10 ml destilované vody s obsahem glukosy. Následně byly kvasinky sledovány pomocí fluorescenčního mikroskopu a byly pořízeny snímky.



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

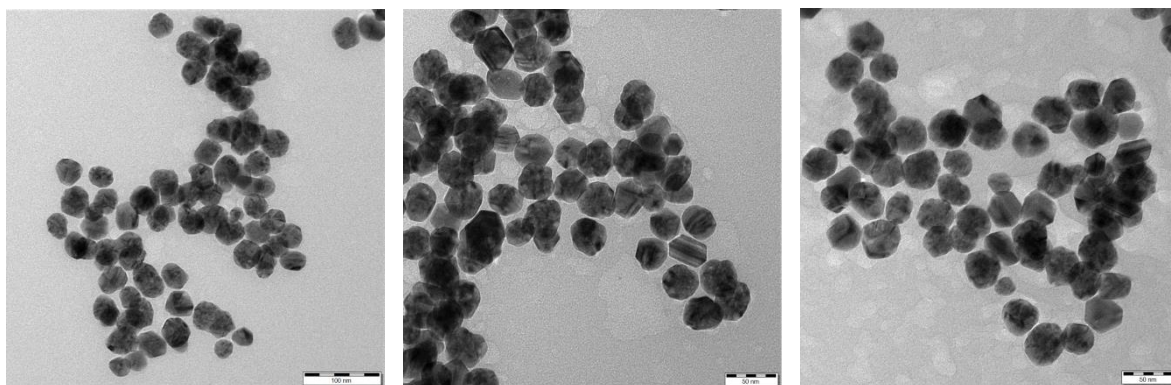
### 5.1 Fluorescenčně značené nanočástice stříbra

Fluorescenčně značené nanočástice byly připraveny dvěma způsoby. V průběhu redukce nanočástic stříbra nebyly pozorovány výrazné rozdíly související s volbou metody. Redukce nanočástic stříbra při přípravě Ag@BSA@Rh\_I proběhla ve stejném čase jako v případě Ag@BSA@Rh\_II. Vizuálně nevykazovaly tyto dvě disperze odlišnosti. Připravené částice nevykazovaly ani výrazný rozdíl v průměrné velikosti (tabulka 5).

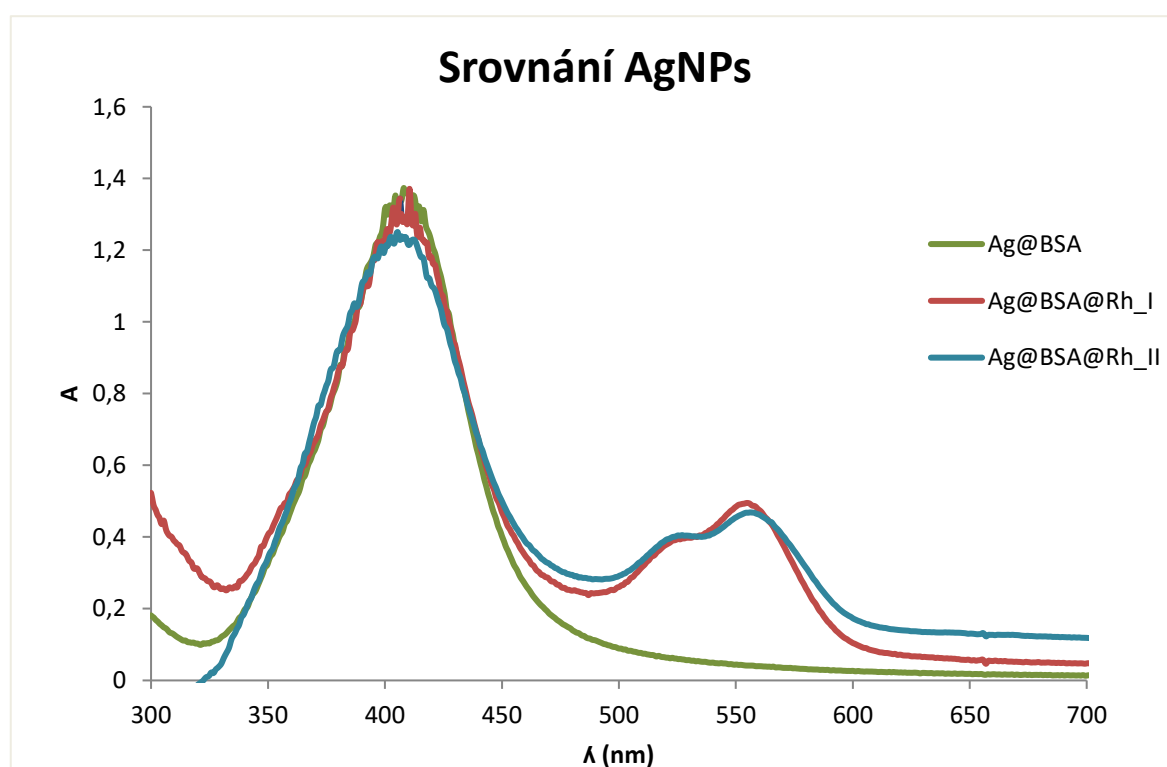
**Tabulka 5** Velikost částic disperze koloidního stříbra

Vzorek	Velikost částic [nm]
Ag@BSA	35,2
Ag@BSA@Rh_I	37,2
Ag@BSA@Rh_II	37,8

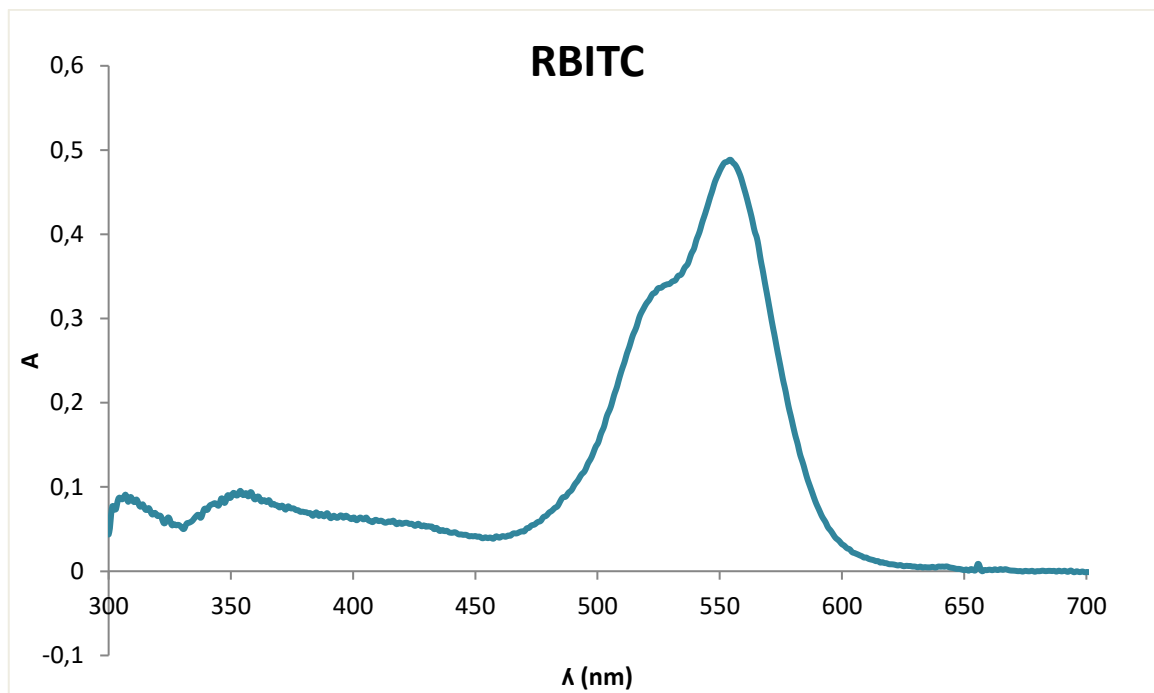
Při srovnání absorpčních spekter změřených ihned po přípravě jednotlivých AgNPs (graf 1) je zřejmé, že mezi jednotlivými absorpčními pásy příslušících nanočásticím stříbra nejsou pozorovány prakticky žádné rozdíly. Poloha maxima zůstává zachována a pohybuje se v blízkosti 400 nm. Průběh povrchového plasmónu ve vzorcích značených nanočástic Ag@BSA@Rh\_I a Ag@BSA@Rh\_II tedy potvrzuje přítomnost nanočástic stříbra stejných charakteristik jako v případě nanočástic Ag@BSA. Absorpce při vlnových délkách 500 – 600 nm vzorků Ag@BSA@Rh\_I a Ag@BSA@Rh\_II je daná přítomností RBITC, jehož absorpční maximum leží při 555 nm, jak je patrné na absorpčním spektru čistého RBITC zobrazeného na grafu 2. Tvar a velikost částic stříbra v jednotlivých vzorcích byla dokumentována také pomocí transmisní elektronové mikroskopie (Obr. X). Velikost nanočástic stříbra určená pomocí metody DLS je v shodě s velikostí nanočástic stříbra zobrazených na obr. X.



**Obrázek 7** TEM snímky nanočástic (a) Ag@BSA, (b) Ag@BSA@Rh\_I a (c) Ag@BSA@Rh\_II.

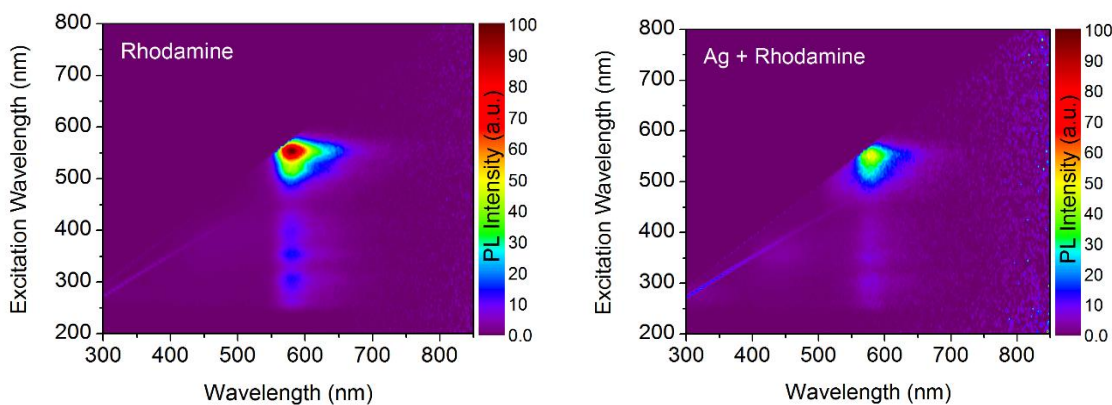


**Graf 1** Absorpční spektrum nanočástic stříbra Ag@BSA a značených nanočástic stříbra Ag@BSA@Rh\_I a Ag@BSA@Rh\_II



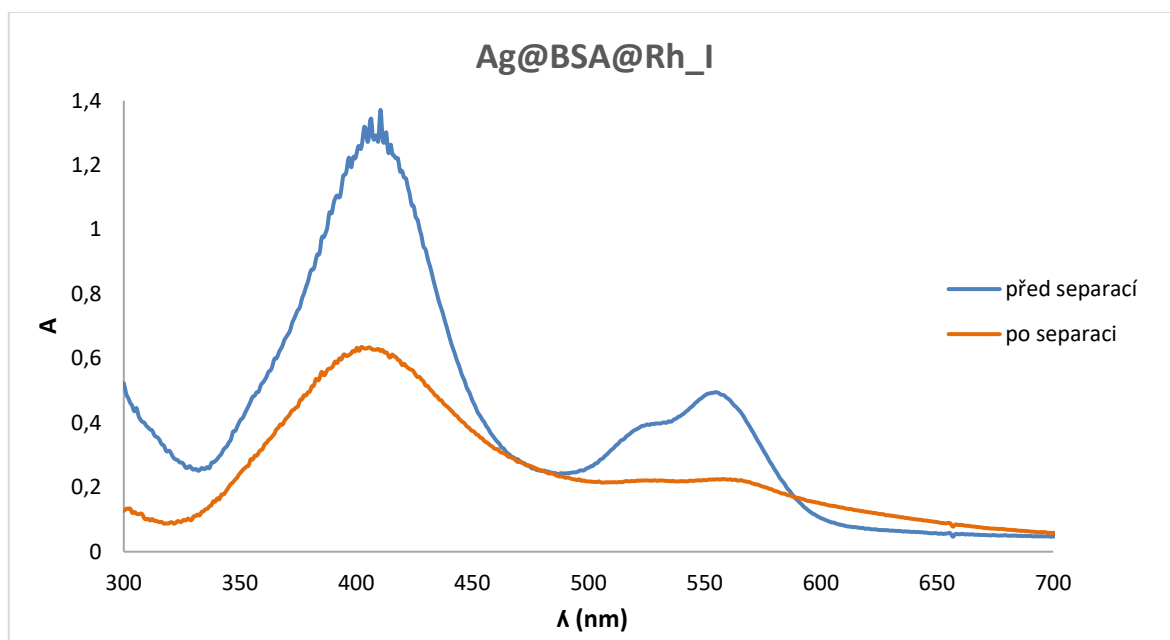
**Graf 2** Absorpční spektrum roztoku Rhodaminu B isothiokyanátu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Přítomnost fluorescenčního barviva navázaného na nanočástice stříbra byla rovněž prokázána měřením excitačního a emisního spektra. Na obr. zobrazujícím excitační a emisní mapu volného a navázaného Rhodaminu je patrné, že excitační pásmo je v rozsahu 490 nm až 570 nm jak pro samotný Rhodamin, tak i pro navázaný Rhodamin na nanočástice Ag (vzorek Ag@BSA@Rh\_II). Stejně tak emise záření je patrná v intervalu od 550 nm do 680 nm jak pro Rhodamin nevázaný, tak navázaný na nanočástice Ag. Rozdíl v intenzitě fluorescence je způsoben v koncentraci rhodaminu, která byla v případě navázaného na nanočástice Ag výrazně nižší.

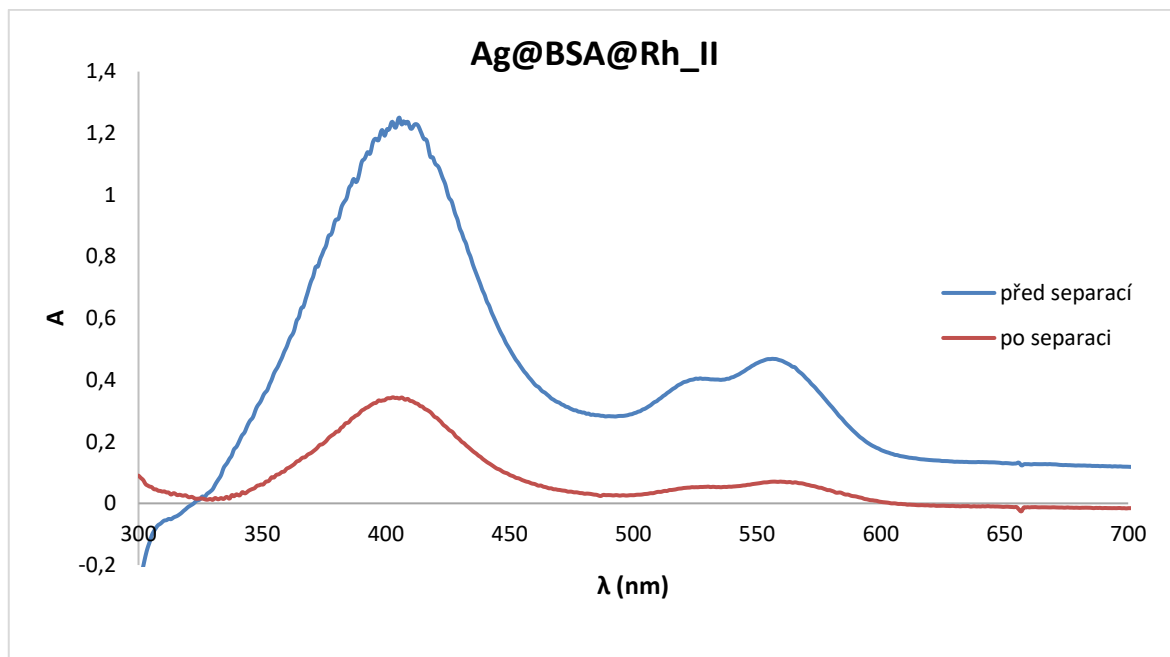


**Obrázek 7** Excitační a emisní mapa čistého Rhodaminu (vlevo) a Rhodaminu navázaného na nanočástice stříbra

Jak již bylo zmíněno výše, pro separaci nenavázaného RBITC byla provedena opa-kovaná dialýza a následně centrifugace. Po získání absorpčních spekter (grafy 3 a 4) bylo zřejmé, že došlo k poklesu nejen absorpčního píku RBITC, ale také k poklesu absorpce povrchového plasmonu nanočástic Ag. Tento pokles v absorbanci, a tedy v koncentraci nanočástic Ag byl způsoben jednak částečným zachycením nanočástic stříbra na stěnách dialyzační membrány v průběhu aplikované dialýzy a rovněž došlo i ke ztrátám nanočástic stříbra při separaci a promývání pomocí odstředění na centrifuze. S úbytkem nanočástic stříbra rovněž klesala i koncentrace na ně navázaného Rhodaminu, což je patrné z poklesu absorpce v oblasti absorpčního pásu charakteristického pro Rhodamin. U vzorku Ag@BSA@Rh\_II byly ztráty při separaci a promývání výraznější.



**Graf 3** Absorpční spektra Ag@BSA@Rh\_II před dialýzou a po provedení centrifugace



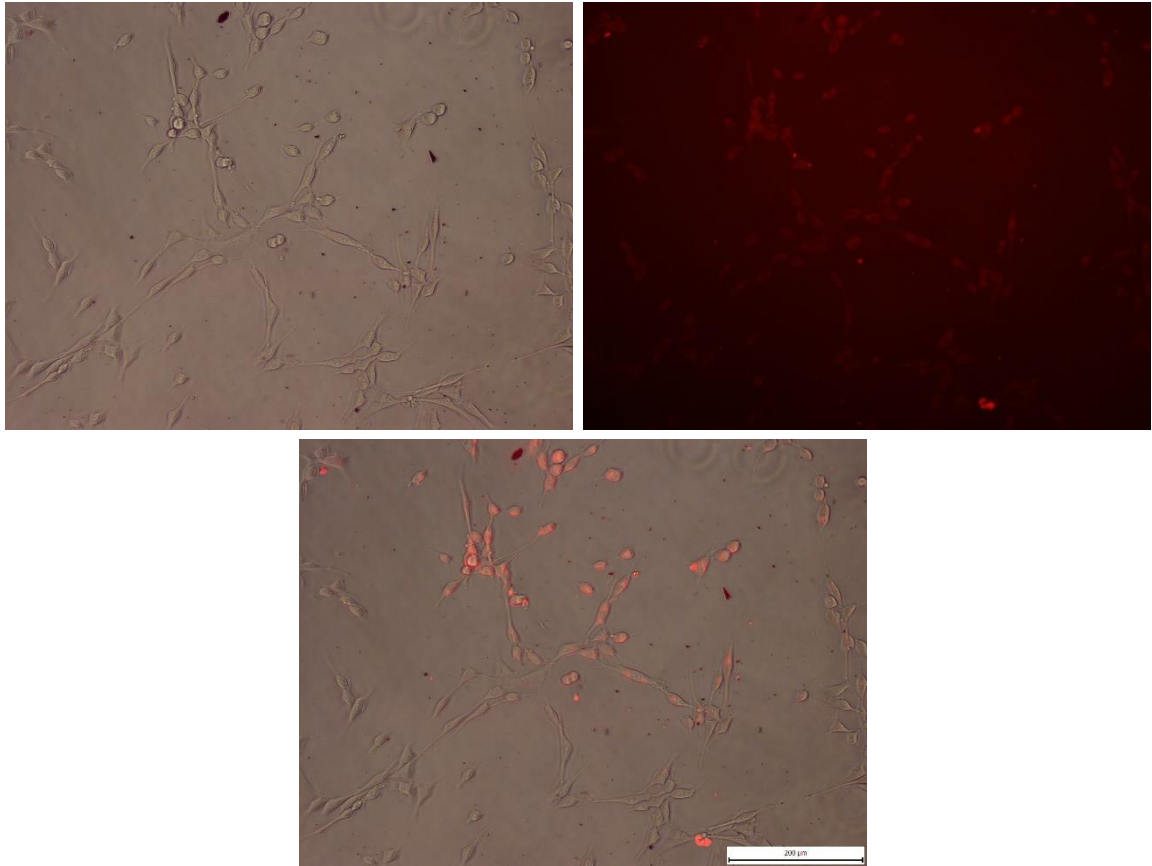
**Graf 4** Absorpční spektra Ag@BSA@Rh\_I před dialýzou a po provedení centrifugace

Koncentrace značených AgNPs po separaci byla stanovena pomocí atomové absorpční spektroskopie na 69,40 mg·l<sup>-1</sup> v případě Ag@BSA@Rh\_I a 44,8 mg·l<sup>-1</sup> u Ag@BSA@Rh\_II.

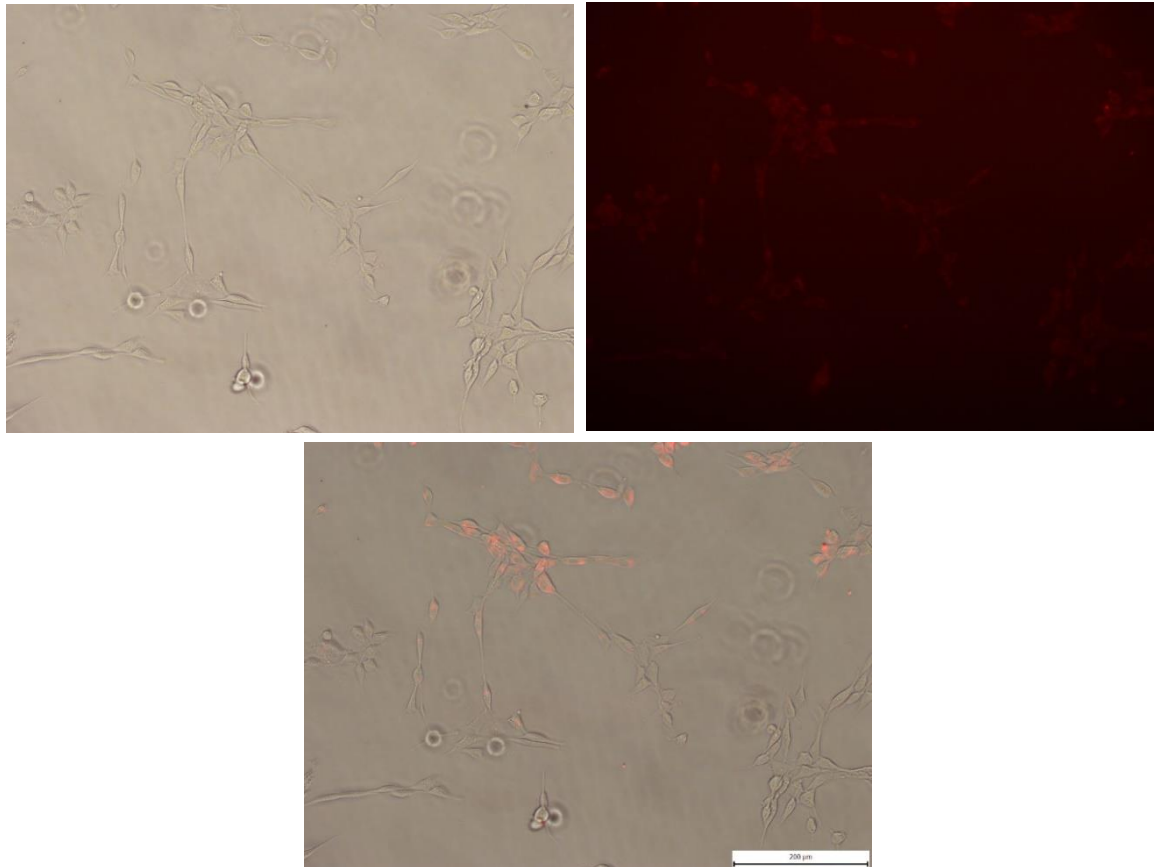
## 5.2 Interakce značených nanočástic stříbra s fibroblasty

Pro sledování interakce značených nanočástic s živočišnou buňkou byly použity NIH/3T3 myší fibroblasty. K pozorování interakce byly použity oba vzorky značených nanočástic stříbra. Jak již bylo zmíněno výše (kapitola 4.2.2), byla sledována internalizace AgNPs do vnitřka studovaných buněk a následně byly pořízeny snímky v časech 30 min, 1,5 hod., 3 hod., a 24 hodin.

U vzorku Ag@BSA@Rh\_I je patrná slabá fluorescence zobrazující tvar buněk již po 30 minutách (obrázek 8). Bylo také provedeno srovnávací měření neznačených buněk, aby byla vyloučena možná autofluorescence značených buněk. Při použitím expozičním čase 0,5 s kontrolní neznačené buňky neposkytovaly žádný signál autofluorescence.



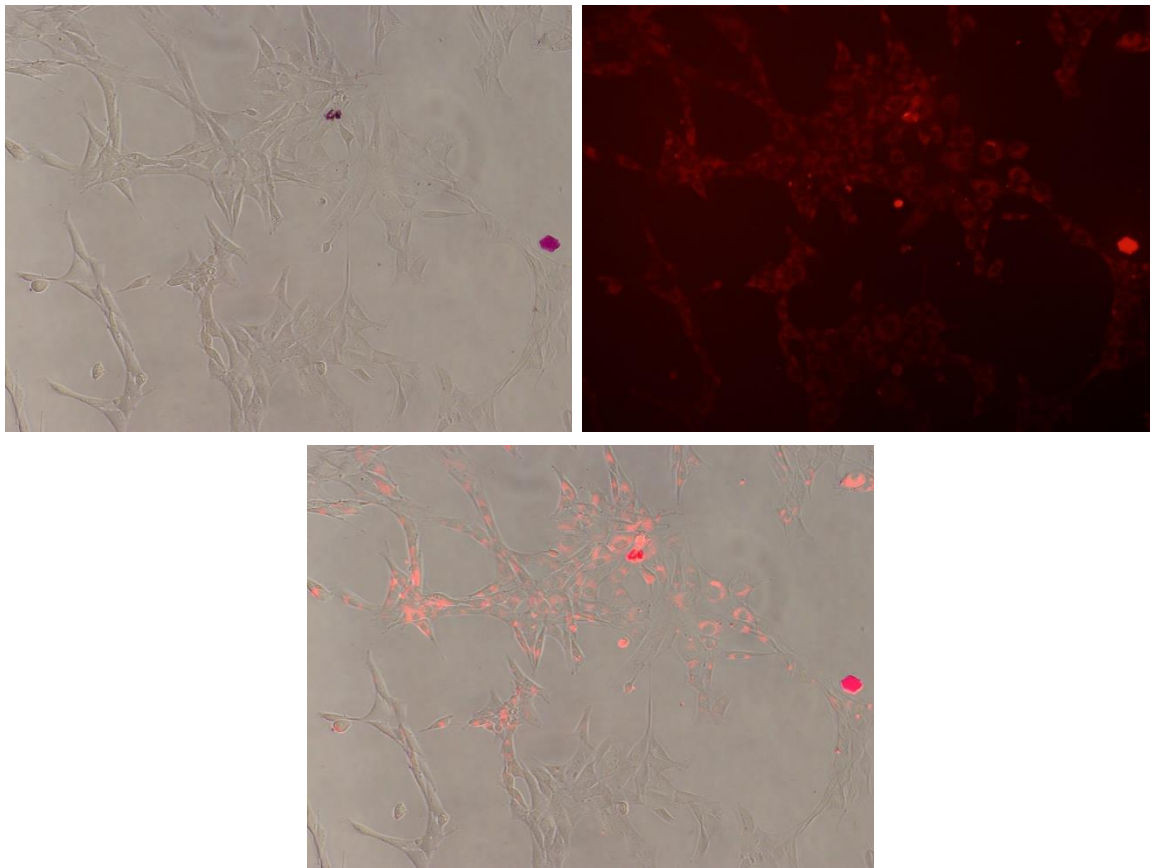
**Obrázek 8** Snímky fibroblastů v procházejícím bílém světle, ve fluorescenčním módu a snímek složený z obou módů po 30 minutách inkubace se vzorkem Ag@BSA@Rh\_I



**Obrázek 9** Snímky fibroblastů v procházejícím bílém světle, ve fluorescenčním módu a snímek složený z obou módů po 30 minutách inkubace se vzorkem Ag@BSA@Rh\_II

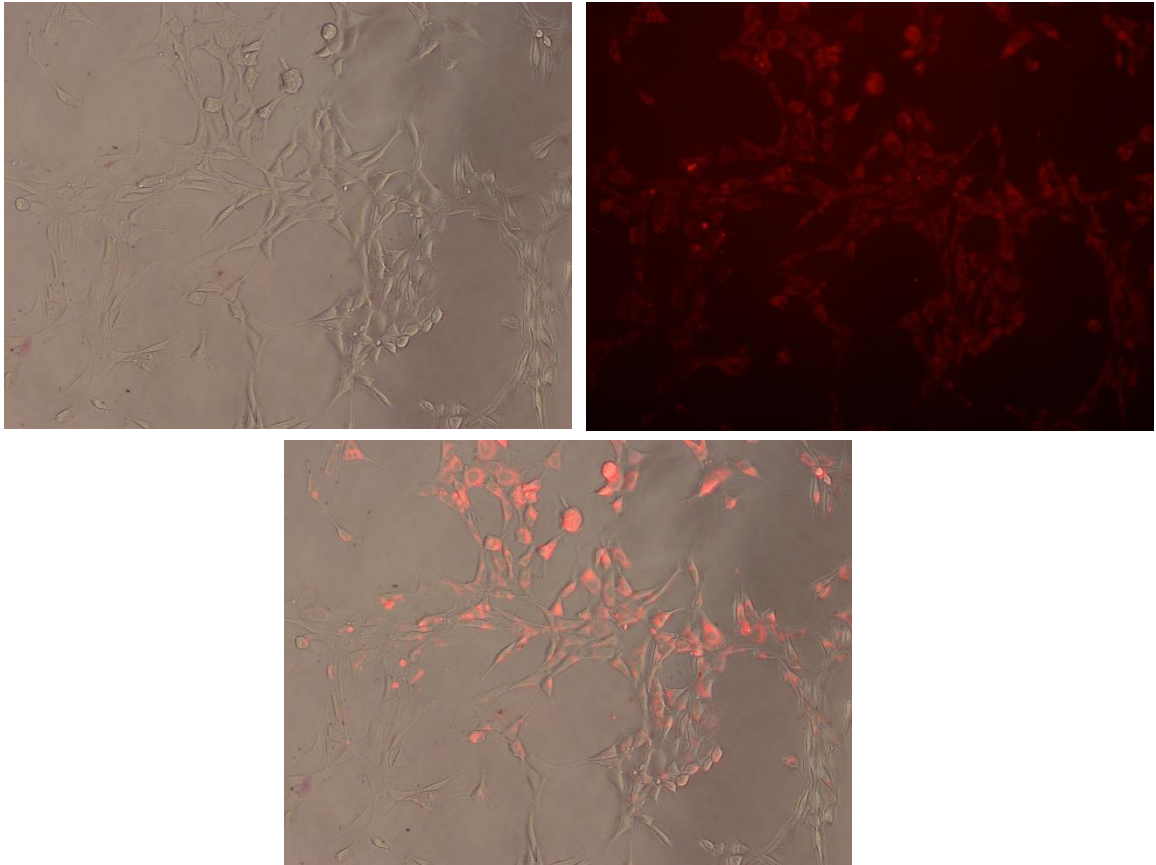
V inkubační čase 1,5 hodiny sledované nanočástice v oblasti buněk vykazují intenzivnější fluorescenci, což poukazuje nárůst koncentrace nanočástic stříbra uvnitř buňky. Intenzivní fluorescenci lze pozorovat zejména v cytosolu buňky. Naopak je zřetelné, že nanočástice stříbra se soustředí mimo oblast jádra. Na snímcích je jádro uprostřed buňky, tedy oblast, která zůstává tmavá bez fluorescence.

Pro lepší názornost byl pořízen snímek při větším zvětšení (obrázek 12). Na tomto snímku jsou jasně vidět tmavé oblasti jader.

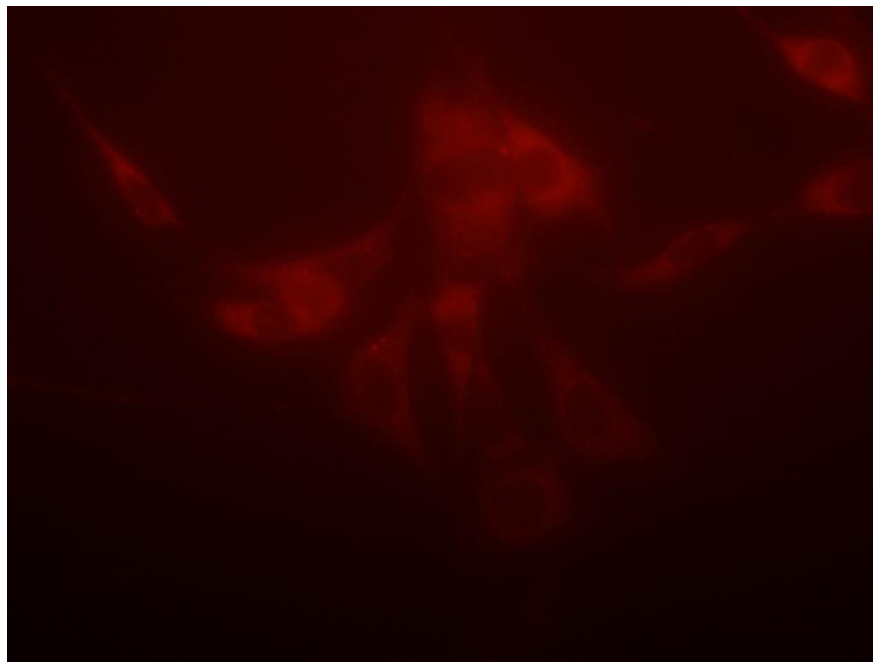


**Obrázek 10** Snímky fibroblastů v procházejícím bílém světle, ve fluorescenčním módu a snímek složený z obou módů po 1,5 hodině inkubace se vzorkem Ag@BSA@Rh\_I



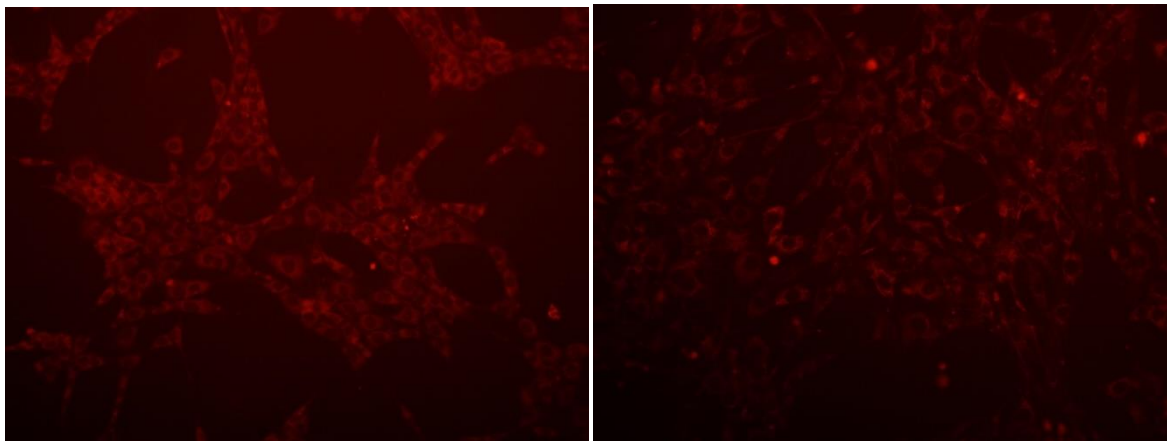


**Obrázek 11** Snímky fibroblastů v procházejícím bílém světle, ve fluorescenčním módu a snímek složený z obou módů po 1,5 hodině inkubace se vzorkem Ag@BSA@Rh\_II.

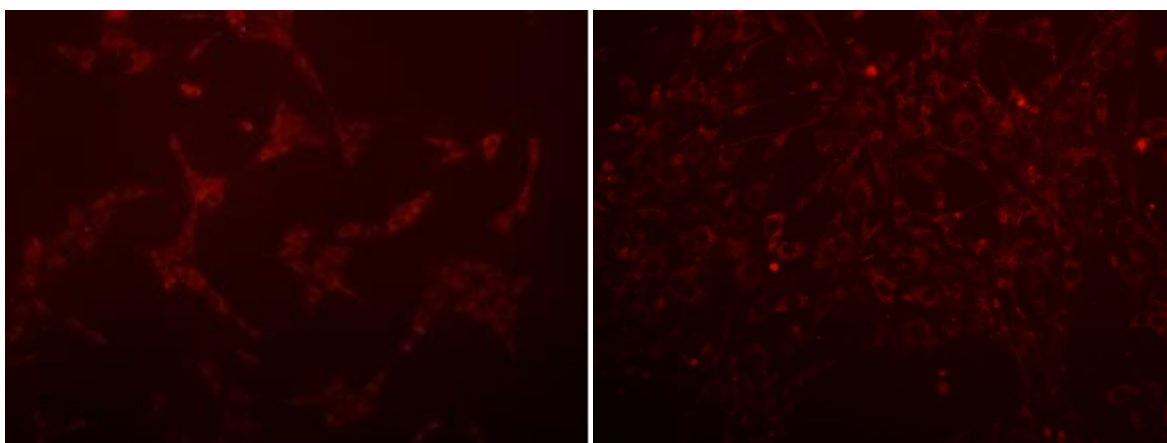


**Obrázek 12** Snímek fibroblastů ve fluorescenčním módu po 1,5 hodinové inkubaci se vzorkem Ag@BSA@Rh\_II.; zvětšení 60x

S rostoucí dobou inkubace intenzita fluorescence narůstá. Fluorescence je již patrná při nízkých expozičních časech. Z obrázků 13 a 14 je patrné, že jádra buněk stále neposkytují fluorescenci, a to ani v inkubačním čase 24 hodin.



**Obrázek 13** Snímky z optického mikroskopu ve fluorescenčním módu buněk NIH/3T3 3 hod. inkubace (vlevo) a 24 hod. inkubace (vpravo) se vzorkem Ag@BSA@\_I

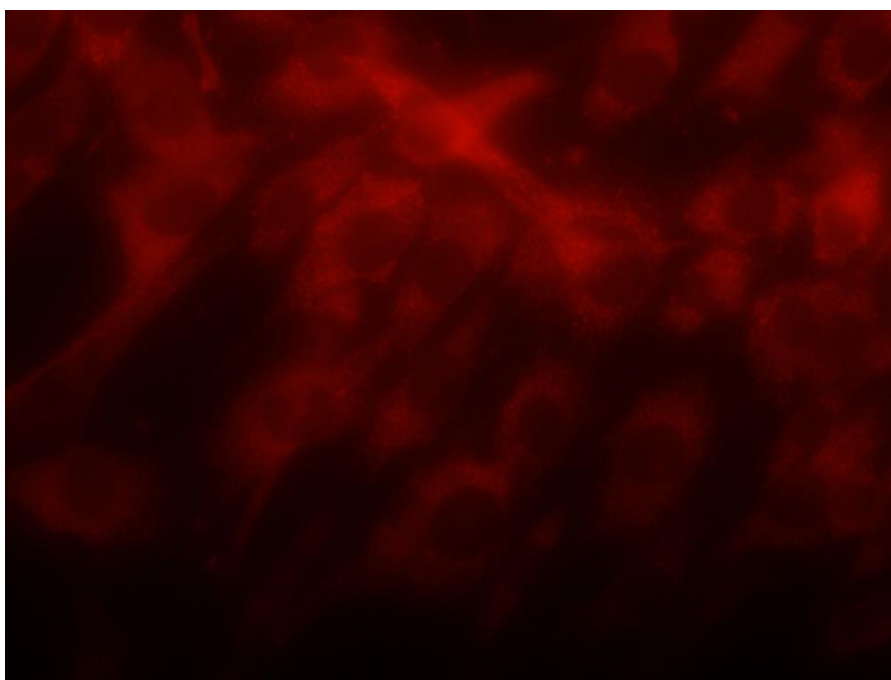


**Obrázek 14** Snímky z optického mikroskopu ve fluorescenčním módu buněk NIH/3T3 3 hod. inkubace (vlevo) a 24 hod. inkubace (vpravo) se vzorkem Ag@BSA@Rh\_II

Z přiložených snímků je zjevné, že značené nanočástice stříbra jsou absorbovány postupně zdravými buňkami již v prvních minutách inkubace. Intenzita sledované fluorescence roste s inkubačním časem.

Ani v inkubačním čase 24 hodin není možné pozorovat fluorescenci z jader studovaných buněk. Nanočástice stříbra tedy neprochází do oblasti jádra. Z tohoto poznatku lze usoudit, že studované nanočástice stříbra nejsou pro buňky toxické, respektive nezpříčiňují poškození jádra a s tím související poškození DNA či buněčné mutace. Dále je ze snímku patrné, že vystavení buněk AgNPs nevedlo ke změnám tvaru nebo morfologickým změnám.

Z tohoto pozorování lze tvrdit, že nanočástice stříbra vstupují do vnitrobuněčného prostředí postupně pomocí endocytózy, což je proces, kterým buňky absorbují materiál vyskytující se ve vnějším prostředí. Dojde k vytvoření vakuolu a následně se nanočástice obalí endsomem. Endosomy poté putují v cytosolu směrem k prostoru v okolí jádra a postupně splývají s lysozomem. Po 24 hodinové inkubaci jsou jasně viditelné kuličky, respektive endosomy naplněné fluorescenčně značenými nanočásticemi stříbra, jak je patrné z obrázku 15.



**Obrázek 15** Značené nanočástice stříbra uvnitř endosomů buněk po 24 hod. inkubaci; zvětšení 60x

### 5.3 Interakce značených nanočástic stříbra s kvasinkami

V prvním kroku tohoto experimentu byl proveden test toxicity nanočástic stříbra pro volbu vhodné pracovní koncentrace značených nanočástic stříbra. Pro sledování toxicity byly použity hmotnostní koncentrace koloidního stříbra 80, 60, 40, 20 mg·l<sup>-1</sup>. Disperze koloidního stříbra Ag@BSA byla opět připravena modifikovanou Tollensovou metodou.

Viabilita buněk byla určena na základě počtu živých buněk vystavených nanočásticím stříbra s různou koncentrací po dobu 1 hodiny podle následujícího vztahu (Kryštof et al., 2017):

$$\% \text{ viabilita} = \frac{\text{počet živých buněk}}{\text{celkový počet buněk}} \cdot 100 \quad (18)$$

Hodnoty viability buněk v závislosti na koncentraci nanočástic stříbra jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tabulka 6** Procentuální životaschopnost kvasinek vystavených AgNPs po 1 hodině

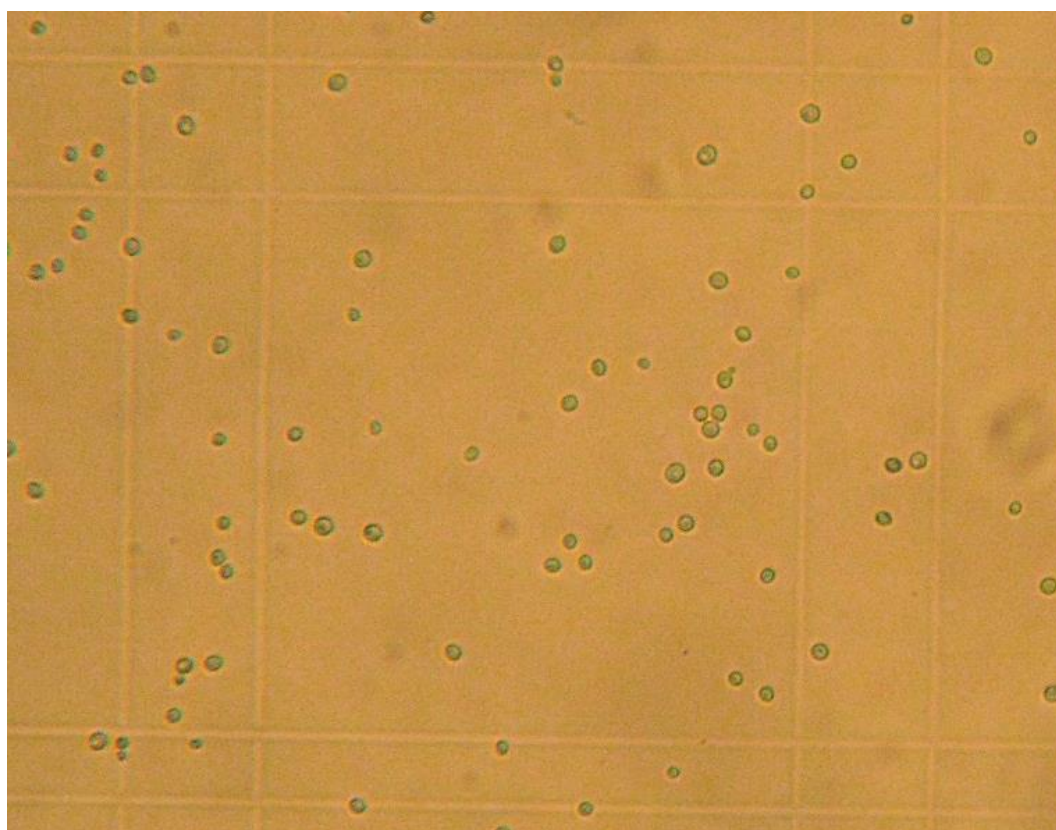
Koncentrace AgNPs ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Viabilita (%)
20	98,6
40	83,2
60	53,3
80	22,5

Z hodnot uvedených v tabulce 3 se potvrdilo, že největší životaschopnost vykazovaly kvasinky, které byly inkubovány s koncentrací AgNPs  $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . V případě vyšších koncentrací došlo k poklesu viability kvasinek, a to již pro koncentraci  $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , kdy došlo k poklesu viability kvasinek téměř na 80%. Pro koncentrace 60 a  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  byla pozorována výrazná toxicita nanočástic stříbra, což je zřetelné z poklesu viability na 53%, respektive 22.5%.

Z obrázků 17 je zřejmé, že při koncentraci  $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  nedošlo ke změnám tvaru nebo morfologie kvasinek při porovnání s kontrolním vzorkem bez obsahu nanočástic stříbra.



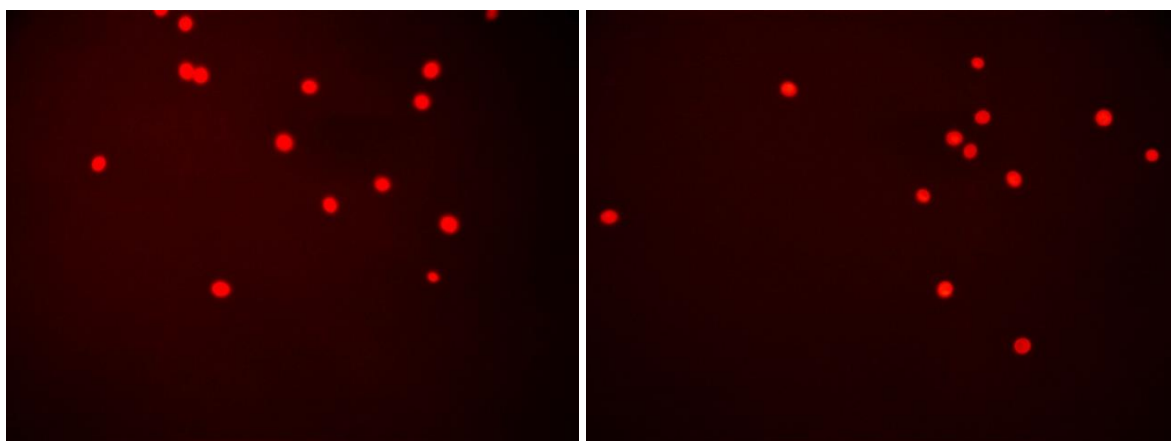
**Obrázek 16** Snímek *Saccharomyces cerevisiae* nevystavených AgNPs



**Obrázek 17** Snímek *Saccharomyces cerevisiae* 60 min po přidavku Ag@BSA ( $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )

Vzhledem k tomu, že koncentrace  $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  stříbrných nanočástic nevykazovala toxický účinek vůči kvasinkám, byla tato koncentrace použita pro fluorescenční mikroskopii buněk vystavených značeným nanočásticím stříbra Ag@BSA@Rh\_I a Ag@BSA@Rh\_II.

Již po 30 minutách od přidání značených AgNPs je možné pozorovat výraznou fluorescenci u obou připravených vzorků (obrázky 18 a 19). Nanočástice stříbra tedy během několika minut vstupují do vnitrobuněčného prostředí kvasinek, a to díky narušení buněčné stěny.



**Obrázek 18** Snímek kvasinek z fluorescenčního mikroskopu po 30 (vlevo) a 60 (vpravo) minutách inkubace s Ag@BSA@Rh\_I.



**Obrázek 19** Snímek kvasinek z fluorescenčního mikroskopu po 30 a 60 minutách inkubace s Ag@BSA@Rh\_II.

## ZÁVĚR

Cílem této práce byla příprava fluorescenčně značených nanočástic stříbra za použití Rhodaminu B isothiokyanátu a následně sledování interakce značených nanočástic s myšimi fibroblasty a kvasinkami.

Nanočástice stříbra byly připravovány modifikovanou Tollensovou metodou spočívající v jedнокrokové syntéze AgNPs založenou na redukci  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  organickými činidly, v rámci této práce případě maltózy. Pro navázání fluorescenční barvy na nanočástice stříbra bylo využito reakce mezi amino skupinami sérového albuminu a isothiokyanátu použitého Rhodaminu B. Následně bylo provedo čištění značených nanočástic s cílem oddělit nenavázaný protein a fluorescenční barvu. Separace byla provedena opakovanou dialýzou a následnou centrifugací. Připravené značené nanočástice byly charakterizovány pomocí UV/VIS absorpčních spekter, dynamického rozptylu světla a transmisní elektronové mikroskopie.

V rámci fluorescenční mikroskopie bylo zjištěno, že značené nanočástice v krátké inkubační době internalizují do myších fibroblastů i kvasinek. S rostoucím inkubačním časem roste i intenzita fluorescenčního záření. Značené nanočástice stříbra neprochází do oblasti jádra fibroblastů, nejsou tedy pro buňky toxické. Z těchto poznatků lze usuzovat, že značené nanočástice stříbra Rhodaminem B isothiokyanátem by mohly být vhodné jako nástroj pro sledování interakcí nanočástic stříbra se studovanými materiály biologického charakteru.

## SUMMARY

The aim of the work was to prepare fluorescently labeled silver nanoparticles using Rhodamin B isothiocyanate to monitor interaction of labeled nanoparticles with mouse fibroblasts and yeasts.

Silver nanoparticles were prepared by a modified Tollen method consisting of one-step AgNP synthesis based on reduction  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  by organic agents, in this case maltose. The reaction between the amino groups of the serum albumine and the isothiocyanate of Rhodamine B was used to connect fluorescent dyes on silver nanoparticles. Subsequently, labeled nanoparticles were purified to separate unbound protein and fluorescent dye. Separation was performed by repeated dialysis and subsequent centrifugation. The prepared labeled nanoparticles were characterized by UV / VIS absorption spectrum, dynamic light scattering and transmission electron microscopy.

Fluorescence microscopy revealed that labeled nanoparticles are internalized into mouse fibroblasts and yeast during a short incubation period. With increasing incubation rates, fluorescence intensity increases. Labeled silver nanoparticles do not pass into the cloud cores of fibroblasts, therefore they are not toxic to the cells. From these findings it can be concluded that labeled silver nanoparticles with Rhodamine B isothiocyanate may be useful as a tool for monitoring the interactions of silver nanoparticles with studied biological materials



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ALEMÁN, Elvin A., Chamaree DE SILVA, Eric M. PATRICK, et al. Single-Molecule Fluorescence Using Nucleotide Analogs: A Proof-of-Principle. *The Journal of Physical Chemistry Letters* [online]. 2014, 5(5), 777-781 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1021/jz4025832. ISSN 1948-7185. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jz4025832>

BIOMOL. Classic Reactive Fluorescent Labeling Dyes & Their Applications. In: *Product Technical Information Sheet* [online]. 2010, s. 37 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <https://www.biomol.com/classic-fluorescent-labeling-dyes.html?id=1067>

BRAUSE, R., H. MÖLTGEN a K. KLEINERMANN. Characterization of laser-ablated and chemically reduced silver colloids in aqueous solution by UV/VIS spectroscopy and STM/SEM microscopy. *Applied Physics B: Lasers and Optics* [online]. 2002-11-1, 75(6-7), 711-716 [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1007/s00340-002-1024-3. ISSN 0946-2171. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00340-002-1024-3>

CMIEL, Vratislav, Josef SKOPALIK, Katerina POLAKOVA, et al. *European Biophysics Journal* [online]. , - [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1007/s00249-016-1187-1. ISSN 0175-7571. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00249-016-1187-1>

DAVIDSON, Michael W. a Mortimer ABRAMOWITZ. *Optical Microscopy*. *Encyclopedia of Imaging Science and Technology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2002 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1002/0471443395.img074. ISBN 0471443395. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471443395.img074>

DUKES, Kyle D., Kenneth A. CHRISTENSEN a George CHUMANOV. Core-shell silver nanoparticles for optical labeling of cells. *Analytical Biochemistry* [online]. 2014, 458, 43-48 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.ab.2014.04.015. ISSN 00032697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326971400164X>

DURÁN, Nelson, Marcela DURÁN, Marcelo Bispo DE JESUS, Amedea B. SEABRA, Wagner J. FÁVARO a Gerson NAKAZATO. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2016, 12(3), 789-799 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.nano.2015.11.016. ISSN 15499634. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963415006000>

EVERETT, D. H. Basic principles of colloid science [online]. London: Royal Society of Chemistry, 1988 [cit. 2017-04-19]. Royal Society of Chemistry paperbacks. ISBN 978-0-85186-443-3. Dostupné z: <https://archive.org/details/EverettD.H.1988BasicPrinciplesOfColloidScience>

FÍŠAR, Zdeněk. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách [online]. [cit. 2017-04-15]. ISSN 1803-6619. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>

HENGLEIN, Arnim. Colloidal Silver Nanoparticles: Photochemical Preparation and Interaction with. Chemical Materials [online]. 1998, 1998(10), 444-450 [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <http://nathan.instras.com/documentDB/paper-105.pdf>

HOFER, Ctirad. Vlastní fluorescence proteinů [online]. In: . 2013, s. 29 [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C7230/um/6053971/6056654/09\\_Protein.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C7230/um/6053971/6056654/09_Protein.pdf)

HOMOLA, Jiří, Sinclair S. YEE a Günter GAUGLITZ. Surface plasmon resonance sensors: review. Sensors and Actuators B: Chemical [online]. 1999, 54(1-2), 3-15 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1016/S0925-4005(98)00321-9. ISSN 09254005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400598003219>

HUANG, Yi-Fong, Sheing-Chung LU, Yun-Chiao HUANG a Jeng-Shiung JAN. Cross-Linked, Self-Fluorescent Gold Nanoparticle/Polypeptide Nanocapsules Comprising Dityrosine for Protein Encapsulation and Label-Free Imaging. Small [online]. 2014, 10(10), 1939-1944 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1002/sml.201303462. ISSN 16136810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.201303462>

JANG, Eue Soon, Seung Yong LEE, Eui-Joon CHA, et al. Fluorescent Dye Labeled Iron Oxide/Silica Core/Shell Nanoparticle as a Multimodal Imaging Probe. Pharmaceutical Research [online]. 2014, 31(12), 3371-3378 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1007/s11095-014-1426-z. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-014-1426-z>

JUNG, W. K., H. C. KOO, K. W. KIM, S. SHIN, S. H. KIM a Y. H. PARK. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology [online]. 2008, 74(7), 2171-2178 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1128/AEM.02001-07. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02001-07>

KHAYDAROV, Rashid A., Renat R. KHAYDAROV, Olga GAPUROVA, Yuri ESTRIN, Thomas SCHEPER, Renata VECEROVA, Radek ZBORIL a Xiaohua LIU. Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2009, 11(5), 1193-1200 [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1007/s11051-008-9513-x. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-008-9513-x>

KHURANA, Chandni, Anjana K. VALA, Nidhi ANDHARIYA, O. P. a CHUDASAMA. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2014, 102(10) [cit. 2016-04-05]. DOI: 10.1002/jbm.a.35005. ISSN 15493296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.35005>

KRYŠTOF, V., E. ŘEZNÍČKOVÁ, L. VYMĚTALOVÁ a J. NAVRÁTILOVÁ. Testy životaschopnosti a Počítání buněk. In: *Cvičení z buněčné biologie* [online]. Olomouc, 2017, s. 1-6 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: [http://www.rustreg.upol.cz/\\_materials/bubcv/3\\_BUBCV\\_2011.pdf](http://www.rustreg.upol.cz/_materials/bubcv/3_BUBCV_2011.pdf)

KUMAR, C. S. S. R. *Nanosystem characterization tools in the life sciences* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, c2006 [cit. 2017-04-15]. ISBN 35-273-1383-4.

KVÍTEK L.; PANÁČEK A.: *Základy koloidní chemie*, Olomouc, 2007

KVITEK, L., A. PANACEK, J. SOUKUPOVA, M. KOLAR, R. VECEROVA, R. PRUCEK, M. HOLECOVA a R. ZBORIL. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *Journal of Physical Chemistry C*. 2008, 112(15), 5825-5834. DOI: 10.1021/jp711616v. ISSN 1932-7447. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/doilookup/?10.1021/jp711616v>

KVÍTEK, L.; PRUCEK, R. The preparation and application of silver nanoparticles. *Journal of material science*. 2005.

KVÍTEK, Libor, Robert PRUCEK, Aleš PANÁČEK a Jana SOUKUPOVÁ. Nanočástice stříbra - příprava, vlastnosti a aplikace. *Nanocon 2009*. Rožnov pod Radhoštěm:

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, 2009, , 1-9.

KVITEK, Libor, Marketa VANICKOVA, Ales PANACEK, et al. Initial Study on the Toxicity of Silver Nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2009, 113(11), 4296-4300. DOI: 10.1021/jp808645e. ISSN 1932-7447. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp808645e>

LARA, Humberto H., Nilda V. AYALA-NÚÑEZ, Liliana del Carmen IXTEPAN TURRENT a Cristina RODRÍGUEZ PADILLA. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, 26(4), 615-621 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1007/s11274-009-0211-3. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-009-0211-3>

LEE, P. C. a D. MEISEL. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1982, 86(17), 3391-3395 [cit. 2017-04-29]. DOI: 10.1021/j100214a025. ISSN 0022-3654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100214a025>

LESŇÁK, Michal, František STANĚK, Jaromír PIŠTORA a Marie STAŇKOVÁ. SLEDOVÁNÍ VLIVU KONCENTRACE ALKOHOLŮ NA ODEZVU MĚŘENOU METODOU PLASMONOVÉ REZONANCE. *Chemické Listy* [online]. 2013, (107), 491-495 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013\\_06\\_491-495.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_06_491-495.pdf)

LI, Yanxia, Mei HONG, Bin QIU, et al. Highly sensitive fluorescent immunosensor for detection of influenza virus based on Ag autocatalysis. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2014, 54, 358-364 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.bios.2013.10.045. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566313007471>

LI, Xuan, John J. LENHART, Harold W. WALKER, Yuri ESTRIN, Thomas SCHEPER, Renata VECEROVA, Radek ZBORIL a Xiaohua LIU. Dissolution-Accompanied Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles. *Langmuir* [online]. 2010, 26(22), 16690-16698 [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1021/la101768n. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la101768n>

LI, Wen-Ru, Xiao-Bao XIE, Qing-Shan SHI, Hai-Yan ZENG, You-Sheng OU-YANG a Yi-Ben CHEN. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* [online]. 2010,, - [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1007/s00253-009-2159-5. ISBN 10.1007/s00253-009-2159-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2159-5>

LI, Wen-Ru, Xiao-Bao XIE, Qing-Shan SHI, Shun-Shan DUAN, You-Sheng OUYANG a Yi-Ben CHEN. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Bio-Metals* [online]. 2011, 24(1), 135-141 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1007/s10534-010-9381-6. ISSN 0966-0844. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10534-010-9381-6>

LIFE TECHNOLOGIES. Amine-Reactive Probes. In: Molecular probes [online]. Life technologies, 2013, s. 11 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp00143.pdf>

LIZ-MARZÁN, LUIS M. a KAMAT PRASHANT V. Nanoscale Materials. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 2004. ISBN 978-030-6481-086.

LU, Zhong, Kaifeng RONG, Ju LI, Hao YANG a Rong CHEN. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. Journal of Materials Science: Materials in Medicine [online]. 2013, 24(6), 1465-1471 [cit. 2016-03-30]. DOI: 10.1007/s10856-013-4894-5. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-013-4894-5>

LUBICK, Naomi. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? Environmental Science [online]. 2008, 42(23), 8617-8617 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1021/es8026314. ISSN 0013-936x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es8026314>

MARAMBIO-JONES, Catalina a Eric M. V. HOEK. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research [online]. 2010, 12(5), 1531-1551 [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1007/s11051-010-9900-y. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-010-9900-y>

MASTERS, Barry R a Mário N. BERBERAN-SANTOS. The Development of Fluorescence Microscopy. Encyclopedia of Life Sciences [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2001, 88(6), 731-738 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1002/9780470015902.a0022093. ISBN 0470016175. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0022093>

MARTINS COSTA, Manuel Filipe P. C., Rogério Nunes NOGUEIRA, J. P. OLIVEIRA, et al. Ultrasensitive nanosensor based on silver nanoparticles to detect hydrogen peroxide. Journal of the Iranian Chemical Society [online]. 2015, 12(11), 928641- [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1117/12.2063849. ISSN 1735-207x. Dostupné z: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2063849>

NASIRI, Aliakbar, Roghayeh AFSAR GHAREBAGH, Seyed Ali NOJOURI, et al. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles on Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. International journal of basic science in medicine [online]. 2016, 1(1),

25-28 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.15171/ijbsm.2016.06. ISSN 2476-664x. Dostupné z: <http://ijbsm.zbmu.ac.ir/FullHtml/IJBSM-1-20160701040235>

PAL, S., Y. K. TAK, J. M. SONG, et al. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2007, 73(6), 1712-1720 [cit. 2017-04-29]. DOI: 10.1128/AEM.02218-06. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02218-06>

PANÁČEK, Aleš. PŘÍPRAVA A STUDIUM BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ NANOČÁSTIC STRĚBRA. Olomouc, 2013. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci.

PANÁČEK, Aleš, Milan KOLÁŘ, Renata VEČEŘOVÁ, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. 2009, 30(31), 6333-6340. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.065. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209008023>

PANÁČEK, Aleš, Libor KVÍTEK, Robert PRUCEK, et al. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, 110(33), 16248-16253. DOI: 10.1021/jp063826h. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp063826h>

PANNERSELVAM, Balashanmugam, Mukesh Kumar DHARMALINGAM JOTHINATHAN, Murugan RAJENDERAN, et al. An in vitro study on the burn wound healing activity of cotton fabrics incorporated with phytosynthesized silver nanoparticles in male Wistar albino rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2017, 100(1), 187-196 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.01.015. ISSN 09280987. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098717300271>

PATCHING, Simon G. a Xuân Nam. PHAM. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2014, 1838(1), 43-55 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.04.028. ISSN 00052736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273613001466>

POUCHLÝ, Julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav [online]. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008 [cit. 2017-04-29]. ISBN 978-80-7080-674-6.

PRABHU, Sukumaran, Eldho K POULOSE, Murugan RAJENDERAN, et al. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* [online]. 2012, 2(1), 32- [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1186/2228-5326-2-32. ISSN 2228-5326. Dostupné z: <http://www.inl-journal.com/content/2/1/32>

PRUCEK R., KVÍTEK L., HRBÁČ J.: *Acta Univ. Palacki. Olom. Chemica* 43, 59, 2004.

RAI, Mahendra, Alka YADAV a Aniket GADE. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* [online]. 2009, 27(1), 76-83 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975008000918>

Silver Nanoparticles: Physical Properties. *NanoComposix Europe* [online]. 2017 [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <https://nanocomposix.eu/pages/silver-nanoparticles-physical-properties>

REICHMAN, JAY. HANDBOOK OF OPTICAL FILTERS FOR FLUORESCENCE MICROSCOPY [online]. 1998 [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: <https://depts.washington.edu/keck/handbook3.pdf>

SAUER, Markus, Johan. HOFKENS a J. ENDERLEIN. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, c2011 [cit. 2017-04-18]. ISBN 978-3-527-31669-4.

SHAPIRO, Howard M. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss, c2003. ISBN 978-0-471-41125-3.

SIEGEL, Jakub, Ondřej KVÍTEK, Pavel ULBRICH, Zdeňka KOLSKÁ, Petr SLEPIČKA a Václav ŠVORČÍK. Progressive approach for metal nanoparticle synthesis. *Materials Letters*. 2012, 89, 47-50. DOI: 10.1016/j.matlet.2012.08.048. ISSN 0167577x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167577X12011585>

Sigma-Aldrich. In: Sigma-Aldrich Co. LLC. [online]. 2017 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r1755?lang=en@ion=CZ>

SIVERA, Martin, Libor KVÍTEK, Jana SOUKUPOVA, Ales PANACEK, Robert PRUCEK, Renata VECEROVA, Radek ZBORIL a Xiaohua LIU. Silver Nanoparticles Modified by Gelatin with Extraordinary pH Stability and Long-Term Antibacterial Activity.

PLoS ONE. 2014-8-6, 9(8), e103675-. DOI: 10.1371/journal.pone.0103675. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103675>

SO, Peter TC a Chen Y DONG. Fluorescence Spectrophotometry. Encyclopedia of Life Sciences [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2001 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1038/npg.els.0002978. ISBN 0470016175. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0002978>

SO, Peter TC, Chen Y DONG, Eric M. PATRICK, et al. Fluorescence Spectrophotometry: A Proof-of-Principle. Encyclopedia of Life Sciences [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2001, 5(5), 777-781 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1038/npg.els.0002978. ISBN 0470016175. ISSN 1948-7185. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0002978>

SO, Peter TC a Mário N. BERBERAN-SANTOS. Two-photon Fluorescence Light Microscopy. ELS [online]. Chichester: John Wiley, 2001, 88(6), 731-738 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1038/npg.els.0002991. ISBN 0470016175. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0002991>

TABUJEW, Ilja a Kalina PENEVA. CHAPTER 1. Functionalization of Cationic Polymers for Drug Delivery Applications [online]. 2014, , 1 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1039/9781782620105-00001. Dostupné z: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781782620105-00001>

TASHKHOURIAN, J., M. AKHOND, S. HOOSHMAND, M. AFSHARINEJAD, Thomas SCHEPER, Renata VECEROVA, Radek ZBORIL a Xiaohua LIU. A nanosensor for determination of glucose based on silver nanoparticles as fluorescence probes. Journal of the Iranian Chemical Society [online]. 2015, 12(11), 2023-2030 [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1007/s13738-015-0677-x. ISSN 1735-207x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13738-015-0677-x>

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Molecular Probes™ Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies 11th Edition [online]. In: . 2010, s. 88 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/technical-reference-library/Molecular%20Probes%20Handbook/chapter-pdfs/Ch-1-Fluorophores.pdf?icid=WE216841>



TOSELAND, Christopher P. Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of Chemical Biology* [online]. 2013, 6(3), 85-95 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1007/s12154-013-0094-5. ISSN 1864-6158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12154-013-0094-5>

TRAN, Quang Huy, Van Quy NGUYEN a Anh-Tuan LE. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2013,4(3), 033001- [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1088/2043-6262/4/3/033001. ISSN 2043-6262. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/20436262/4/i=3/a=033001?key=crossref.d8981ba42bf922920ec3657457f86140>

VALEUR, Bernard a Mário N. BERBERAN-SANTOS. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education* [online]. 2011, 88(6), 731-738 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1021/ed100182h. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed100182h>

VOJUCKIJ S.S.: Kurs koloidní chemie. SNTL , Praha 1984

XU, Guang-nian, Xue-liang QIAO, Xiao-lin QIU, Jian-guo CHEN, Thomas SCHEPER, Renata VECEROVA, Radek ZBORIL a Xiaohua LIU. Preparation and characterization of stable monodisperse silver nanoparticles via photoreduction. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2008, 320(1-3), 222-226 [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2008.01.056. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775708001015>

ZIELIŃSKA, Anna, Ewa SKWAREK, Adriana ZALESKA, Maria GAZDA a Jan HUPKA. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Procedia Chemistry* [online]. 2009, 1(2), 1560-1566 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1016/j.proche.2009.11.004. ISSN 18766196. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187661960900039>