

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Příprava plasmonických nanočástic ušlechtilých
kovů pro biologické aplikace

Autor práce:

Kryštof Klásek

Studijní program:

Chemie

Studijní obor:

Nanomateriálová chemie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Olomouc, 2024

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením pana doc. RNDr. Aleše Panáčka, Ph.D., s vyznačením všech použitých zdrojů a literatury.

V Olomouci dne

.....

Kryštof Klásek

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych chtěl velmi poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad, podnětů a materiálů a především za čas, který mi při vypracování bakalářské práce věnoval. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Lucii Válkové z Ústavu lékařské biofyziky LF UP, která testovala připravené vzorky pro PTT a celé Katedře fyzikální chemie za umožnění vypracování této bakalářské práce. V neposlední řadě chci poděkovat paním laborantkám Karle Slavičkové a Dagmar Musilové, bez kterých by práce v laboratoři nebyla možná.

Nakonec bych chtěl poděkovat celé své rodině a přátelům.

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Autor:	Kryštof Klásek
Název práce:	Příprava plasmonických nanočástic ušlechtilých kovů pro biologické aplikace
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby:	2024
Abstrakt:	<p>Cílem této bakalářské práce je příprava plasmonických nanočástic stříbra a testování jejich fototermálního efektu. Byly teoreticky studovány možná biologická využití nanočástic ušlechtilých kovů, především nanočástic stříbra a zlata. Plasmonické nanočástice stříbra byly připraveny dvoustupňovou redukcí amoniakálního komplexu stříbra. V prvním stupni byl jako redukční činidlo využit tetrahydridoboritan sodný a v druhém stupni pak peroxid vodíku. Citrát trisodný zde figuroval jako stabilizátor. Nanočástice byly charakterizovány pomocí UV/VIS spektroskopie a pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Na mikrotitračních destičkách byly adsorpčním procesem metodou samouspořádání vrstvy po vrstvě připraveny vrstvy nanočástic stříbra pomocí polyelektrolytů, konkrétně kyseliny polyakrylové (PAA) a poly(diallyldimethylammonium chloridu) (PDDA). Na takto připravených destičkách byla studována eliminace nádorových buněk děložního čípku HeLa za využití laseru s vlnovou délkou 660 nm.</p>
Klíčová slova:	Nanotechnologie, nanočástice stříbra, plasmonické nanočástice, fototermální terapie, vrstva po vrstvě, peroxid vodíku
Počet stran:	66
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Author: Kryštof Klásek

Title: Preparation of noble metal plasmonic nanoparticles for biological applications

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Physical Chemistry

Supervisor: Doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Year of presentation: 2024

Abstract: The aim of this bachelor's thesis is the preparation of silver plasmonic nanoparticles and testing their photothermal effect. Possible biological applications of noble metal nanoparticles, especially silver and gold nanoparticles, were theoretically studied. Silver plasmonic nanoparticles were prepared by two-step reduction of a silver ammonia complex. Sodium borohydride was used as the reducing agent in the first step, and hydrogen peroxide in the second step. Trisodium citrate acted as a stabilizer. The nanoparticles were characterized using UV/VIS spectroscopy and transmission electron microscopy. Silver nanoparticle layers were prepared on microtitration plates by the adsorption process using Layer-by-Layer self-assembly method using polyelectrolytes, specifically polyacrylic acid (PAA) and poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA). The elimination of HeLa cancer cells was studied on these prepared microtitration plates using a laser with a waveleghth of 660 nm.

Key words: Silver nanoparticles, plasmonic nanoparticles, photothermal therapy, cancer, Layer-by-Layer, hydrogen peroxide

Number of pages: 66

Number of appendices: 0

Language: Czech

OBSAH

I.	ÚVOD.....	7
II.	TEORETICKÁ ČÁST	8
1.	Nanomateriály.....	8
1.1.	Historie nanomateriálů.....	8
1.2.	Klasifikace nanomateriálů	9
1.3.	Optické vlastnosti nanomateriálů.....	10
1.4.	Elektrické vlastnosti.....	15
1.5.	Přípravy nanomateriálů.....	17
1.6.	Nanočástice ušlechtilých kovů.....	18
1.7.	Nanočástice stříbra.....	19
1.8.	Nanočástice zlata	21
1.9.	Příprava vrstev	23
2.	Biologické aplikace.....	25
2.1.	Fototermální terapie	26
2.2.	Fotodynamická terapie.....	30
III.	PRAKTICKÁ ČÁST	31
3.	Materiál a experimentální vybavení	31
3.1.	Chemikálie	31
3.2.	Přístrojové vybavení	31
4.	Příprava plasmonických nanočástic stříbra.....	32
4.1.	Příprava plasmonických nanočástic na základě variace přídavku NaBH_4 .	32
4.2.	Příprava plasmonických nanočástic na základě variace přídavku NH_3	33
5.	Příprava stříbrných vrstev na mikrotitračních destičkách pro PTT testování.....	35
6.	Fototermální terapie	36
7.	Výsledky a diskuse	38
7.1.	Plasmonické nanočástice stříbra	38
7.2.	Modifikace mikrotitračních destiček	48
7.3.	Fototermální terapie	52
IV.	ZÁVĚR	58
V.	SUMMARY	60
VI.	ZDROJE.....	62

I. ÚVOD

V současnosti jsou nanotechnologie jedním z nejvíce se rozvíjejících vědních oborů. Nanomateriály vykazují ojedinělé fyzikálně-chemické vlastnosti oproti svým makroskopickým protějškům, ať už jde o optické, elektrické, magnetické či biologické. Díky nim jsou nanomateriály velmi atraktivní pro aplikace v prakticky všech lidských odvětvích. Již dnes nalézají širokou škálu uplatnění – v průmyslu, elektronice, energetice, kosmetice, potravinářství či v medicíně. Mezi nanomateriály řadíme i nanočástice ušlechtilých kovů jako jsou stříbrné či zlaté nanočástice, které oplývají vysokou stabilitou a biokompatibilitou a zároveň snadnou přípravou, kdy můžeme získat nanočástice o konkrétních velikostech a morfologiích.^{1,2} U těchto nanočástic se vyskytuje lokalizovaný povrchový plasmon. Díky tomuto jevu dokážou nanočástice silně absorbovat světlo. Tuto interakci pak lze využít pro převedení světelné energie na tepelnou. Jelikož je poloha absorpčního maxima shodná s plasmonovou rezonanční frekvencí, můžeme ji ladit pro specifické aplikace, např. změnou tvarů a velikostí kovových částic.^{3,4} Tyto zmíněné vlastnosti nanočástic otevírají dveře pro vývoj nových léčebných postupů, které si slibují větší efektivitu a šetrnost. Lze je využít například v diagnostice, drug-delivery či protinádorových terapiích, jako je fotodynamická terapie či fototermální terapie.⁵

Fototermální terapie (PTT – PhotoThermal Therapy) využívá cílenou akumulaci plasmonických nanočástic v nádorech. Ty zde pak absorbují světelné záření, které přemění na tepelné, což má za následek selektivní hypertermii a nevratné poškození nádorové tkáně, přičemž zdravá tkáň zůstane nepoškozená. Oproti jiným klasickým metodám je PTT vysoce efektivní a selektivní metoda, která je zároveň neinvazivní a s minimálními vedlejšími účinky. PTT využívá nejčastěji nízkoenergetických laserů v oblasti blízkého infračerveného spektra, kterou mají vysokou pronikavost biologickými tkáněmi a tekutinami.⁵

Tato práce je zaměřená na studium a přípravu plasmonických nanočástic stříbra a jejich depozici na mikrotitrační destičky pomocí metody samoorganizace vrstvy po vrstvě. Na nich byla posléze testována fototermální aktivita *in vitro* na buněčné linii karcinomu děložního čípku HeLa. K tomuto byl využit laser s vlnovou délkou záření 660 nm. Proto se kromě samotných příprav nanočástic tato práce zaměřuje i na jejich potenciaální využití a aktuální pokrok v oblasti biologických aplikací, především pak na využití ve fototermální terapii.

II. TEORETICKÁ ČÁST

1. Nanomateriály

Nanomateriály jsou materiály, které mají alespoň jeden ze svých rozměrů v rozmezí 1 nm (10^{-9} m) až 100 nm (10^{-7} m). Z pohledu fyzikální chemie jsou nanomateriály prakticky podmnožinou koloidní chemie, zde se velikost částic pohybuje v rozmezí od 10^{-9} m (jednoho nanometru) do 10^{-6} m (jednoho mikrometru).^{6,7} Je tedy nutno si definovat základní terminologii, která je spjatá s nanočásticemi a koloidními soustavami, které jsou jednou ze 3 základních druhů disperzních systému vedle analytických a hrubých disperzí. Ty jsou tvořeny ze dvou základních částí – *disperzního prostředí* (také dispergens) a *disperzní fáze* (neboli podílu či dispersum). Jinými slovy by se také dalo říct, že to jsou soustavy, které se skládají nejméně ze dvou fázi či ze dvou složek, kdy jedna část je rozptýlená (dispergovaná) v druhé, která tvoří spojitou část soustavy.^{6,8}

Nanomateriály vykazují ojedinělé fyzikálně-chemické vlastnosti ať už jde o optické, katalytické, elektrochemické, magnetické či biologická specifika. Je to dáno především *kvantově-velikostním efektem (quantum/finite-size effect)*, kdy se kvůli prostorového omezení u nanočástic, omezí pohyb elektronu na diskrétní (konkrétní) energetické hladiny. Dalším důvodem je vysoký podíl povrchových atomů (oproti svým objemovým protějškům – makročástečím), který roste s klesajícími rozměry částic. Z tohoto plyne vysoká povrchová reaktivita.^{4,6} Proto jednotlivé žádoucí vlastnosti a efekty můžeme modifikovat pomocí úpravy velikosti, morfologie či rozdílné funkcionalizaci pro dané aplikace. Z těchto důvodů jsou v posledních desetiletích předmětem rozsáhlého výzkumu a samotné nanotechnologie a nanomateriálová chemie se staly jednou z nejvíce rostoucích odvětví, díky svému využití v civilním a armádním průmyslu, elektronice, sensorice či v biologických a medicínských aplikacích. Konkrétně například pak v SERS – Povrchem zesílené Ramanove spektroskopii, heterogenní katalýze, fotokatalýze či výpočetní technice. K biologickým a lékařským aplikacím bude věnována větší pozornost v následujících kapitolách.^{7,9–11}

1.1. Historie nanomateriálů

Lidstvo využívalo, i když nevědomě, nanomateriály už dlouho dobu. Je známo, že již ve 4. století n. l. vytvářeli římskí skláři sklo obsahující nanočástice kovů. Z této doby se zachovalo pár artefaktů jako například *Lykurgův pohár* (pohár thráckého krále

Lykurgose), který obsahuje stříbrné a zlaté nanočástice. Ten mění barvu ze zelené na červenou, když je umístěn na zdroj světla. Také velké množství středověkých katedrál má skleněné vitráže, které obsahují nanočástice kovů. V 19. století se pak koloidními systémy a jejími vlastnostmi zabýval *Michael Faraday*, který studoval přípravu a vlastnosti koloidního zlata či *Thomas Graham*, který je považován za otce koloidů. Ten na základě difuze látek přes pergamenovou membránu rozdělil disperze na krystaloidy (difuze probíhala snadno) a koloidy (obtížná difuze).^{7,12} V roce 1959 pak *Richard Feynman* (držitel Nobelovy ceny za fyziku) přednesl svou vizi na přednášce „*There is plenty room at the bottom*“ tedy v češtině „Tam dole je spousta místa“, která se stala prognózou pro nastupující věk nanotechnologií. Mnoho Feynmanových spekulací z této přednášky se v dnešní době stalo skutečností (manipulace s jednotlivými atomy, litografii pomocí paprsku elektronů, stavbu obvodů v nanoměřítku a mnoho dalšího). Ovšem trvalo dvě desítky let, než začal skutečný rozmach ve výzkumu nanotechnologií. Ten přišel až v osmdesátých letech s příchodem vylepšených spektroskopických a skenovacích metod. V roce 1985 byla vyvinuta metoda, která syntetizovala *fulleren*, v devadesátých letech pak začal metody příprav *uhlíkových trubiček* a v roce 2004 byl poprvé připraven *grafen*. V dnešní době se s nanomateriály a nanotechnologiemi setkáváme prakticky na denní bázi.^{7,12,13}

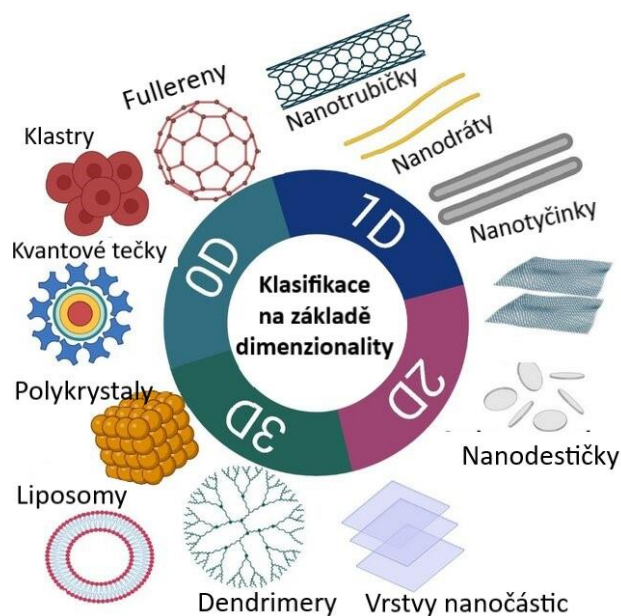
1.2. Klasifikace nanomateriálů

Nanomateriály můžeme různě klasifikovat na základě jejich charakteristik. Lze je rozdělit na základě jejich původu, tedy na přírodní materiály, které můžeme nalézt v různých formách v přírodě a umělé nanomateriály, které jsou vytvářeny vědomě pomocí přípravných procesů či jako vedlejší produkty. Mezi přírodní nanomateriály patří kupříkladu molekuly proteinů, mlhy (aerosoly), želatiny (gelové typy), částice sopečného popelu nebo dokonce viry. Do umělých pak řadíme například umělé vytvořené nanostruktury uhlíku, nanočástice kovů, kvantové tečky, dendrimery či nanokompozity.¹⁴

Také lze rozdělit nanomateriály z hlediska jejich složení a to do 4 základních typů. Jsou to organické nanomateriály, anorganické nanomateriály, na uhlíku založené nanomateriály a jejich různé kombinace – kompozity. Do organických můžeme zařadit kupříkladu liposomy, dendrimery či micely. Do anorganických pak lze zahrnout nanočástice kovů a jejich oxidů, nanočástice polovodičů, ale dokonce i keramiky. Patří zde také nanočástice ušlechtilých kovů, ke kterým se dostaneme v následujících kapitolách. Mezi na bázi uhlíků založené nanomateriály patří především uhlíkové

nanotrubičky, nanovlákná, grafeny a fullereny. Do kategorie kompozitů pak řadíme kombinace nanomateriály různých kategorií.^{7,14}

Dále můžeme všechny nanomateriály klasifikovat dle dimenzionality (kolik rozměrů je mimo škálu nano). Prvním typem jsou $0D$, kde jsou všechny rozměry v nanoměřítku. Do tohoto typu patří nanočástice, nanoklastry či nanotečky. Dalším jsou $1D$. Zde jsou 2 rozměry v nanoměřítku. Můžeme tady zařadit anisotropické nanočástice jako jsou nanotrubičky, nanovlákná a nanotyčinky. $2D$ typ pak má už jen jeden rozměr v nanoškále. Zde řadíme dobře známé grafeny, nanofilmy nebo opět anisotropické nanočástice (nanodestičky, nanotrojúhelníky apod.). Poslední typ je $3D$. Mezi ně patří již zmíněné liposomy nebo polykrystaly.^{7,14}



Obrázek 1: Dimenzionalita nanomateriálů (převzato a upraveno z¹⁵).

1.3. Optické vlastnosti nanomateriálů

Koloidní systémy a nanočástice se vyznačují charakteristickými optickými vlastnostmi. Při prostupu světla (elektromagnetického záření) soustavou se intenzita světelných paprsků zmenšuje v důsledku dvou základních jevů – *pravé absorpci* a *rozptylu* záření, ke kterým dochází současně. Velikost obou těchto jevů závisí na charakteru systému, jako je chemické složení disperzní fáze či velikost a tvar částic a na vlnové délce dopadajícího elektromagnetického záření. Tyto samotné jevy můžeme, jak využít pro různé aplikace, ale také pro analytické určení velikosti, morfologie, molekulové hmotnosti, koncentrace a mnoho dalších charakteristik, které nejsou určitelné pomocí běžných optických mikroskopů.^{6,16,17}

1.3.1. Absorpce záření

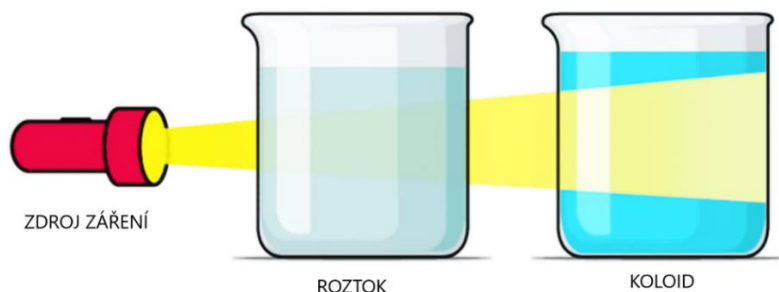
Při absorpci záření hmotou dochází k pohlcení energetického kvanta elektromagnetického záření. Tento proces má za následek změnu energetických stavů valenčních a vazebných elektronů v molekulách absorbující látky. Absorpcí záření dojde ke zvýšení vnitřní energie molekul systému, která se poté přemění v energii tepelnou.^{6,18} Tento jev popisuje Lambert-Beerův zákon (1):

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon * c * d \quad (1)$$

Kde A je absorbance, která reprezentuje absorpci záření, I je intenzita prošlého záření, I_0 je intenzita dopadajícího záření na látku, ε molární absorpční koeficient, který je specifický pro každou látku, c je molární koncentrace látky a d je tloušťka vrstvy, kterou prochází paprsek. Většinou se pro měření používají kyvety o tloušťce 1 cm.^{6,18}

1.3.2. Rozptyl záření

Další optická vlastnost, která je pozorovatelná u koloidů je rozptyl záření. Zde nedochází při pohlcení světelné energie ke změně energetických stavů valenčních nebo vazebných elektronů. Namísto toho je kvantum energie vyzařeno náhodně do všech směrů beze změny vlnové délky. Tento efekt můžeme nazvat jako elastický odraz fotonu od částice. Rozptyl světla může nastat jen tehdy, jestliže je vlnová délka záření větší než velikost částic disperze. Když je tato vlnová délka mnohem menší než velikost částic, dochází pak k odrazu částic, což se projevuje jako jemný zákal – opalescence. Tento jev poprvé kvalitativně popsal John Tyndall – podle něj *Tyndallův rozptyl*. Můžeme ho nejlépe vyobrazit jako procházející paprsek světla při průchodu koloidem, přičemž je paprsek zviditelněn jako světelný kužel (obr. 2).^{6,19,20}



Obrázek 2: Tyndallův jev (převzato a upraveno z²¹).

Samotný mechanismus rozptylu záření funguje na principu indukce elektrického dipólu v částici elektromagnetickým polem záření. Takto vzniklé dipóly poté vyzařují

světlo o stejné vlnové délce jako světlo dopadající. Kvantitativně lze podíl rozptylu světla na zeslabení intenzity dopadajícího záření ve směru pozorování popsat zákonem (2), který je obdobou Lambert-Beerovu:

$$-\log \frac{I}{I_0} = \tau * d \quad (2)$$

kde τ je turbidita soustavy, která je mírou úhrnné energie, která se při průchodu paprsku světla vrstvou suspenze o tloušťce d rozptýlí na všechny strany od tohoto paprsku. Je také závislá na stupni disperzity, vlnové délce dopadajícího záření a na samotných optických vlastnostech soustavy.⁶

Teoreticky poprvé popsal rozptyl světla na koloidních částicích Rayleigh v roce 1871. Pro sférické částice, které jsou v porovnání s vlnovou délkou dostatečně malé ($1/20$ vlnové délky), dostatečně daleko od sebe a jsou elektricky nevodivé ho popsal vztahem (3)^{6,8,19}:

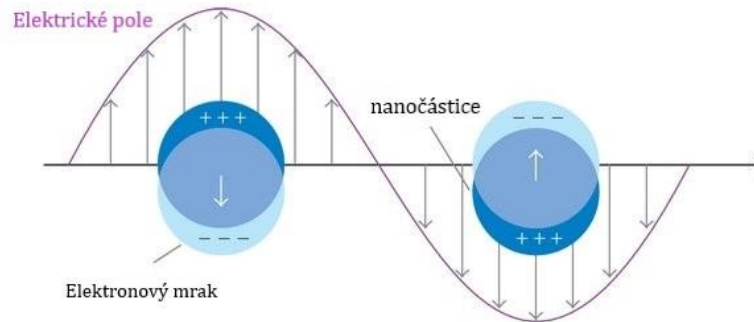
$$\left(\frac{I}{I_0}\right)_v = \frac{16\pi^4}{r^2\lambda^4} * \left(-\frac{\alpha}{4\pi\epsilon_0}\right)^2 \quad (3)$$

kde λ je vlnová délka, r vzdálenost od detektoru, α polarizabilita částic a ϵ_0 permitivita vakua. Na základě rozptylu lze částice koloidních soustav sledovat ultramikroskop či elektronovým mikroskopem. Pro další charakterizace jako je velikostní distribuce částic se v dnešní době velmi využívá metoda dynamického rozptylu světla *DLS* (*Dynamic Light Scattering*).^{6,16,19}

1.3.3. Lokalizovaný povrchový plasmon

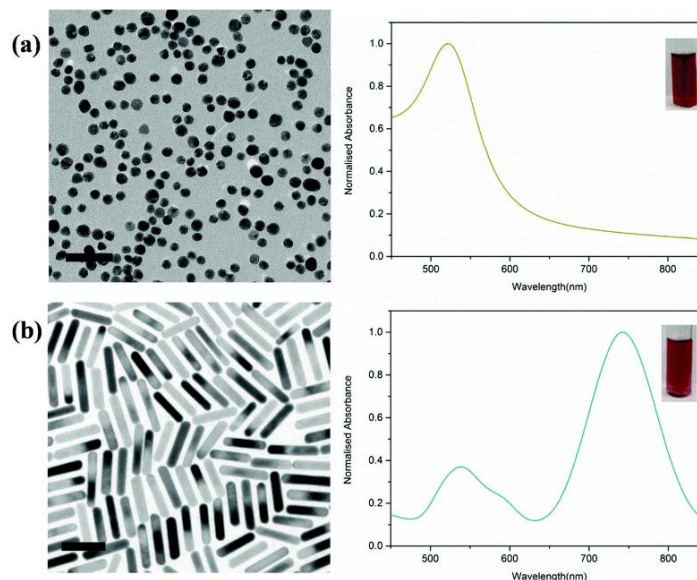
U nanočástic je ovšem samotný Lambert-Beerův zákon komplikován změnou absorpce záření v závislosti na velikosti a tvaru částic. Nanočástice ušlechtilých kovů vykazují speciální optické vlastnosti. Je to dáno především již zmíněným *kvantově-velikostním efektem* (*quantum/finite-size effect*), tedy že vlastnosti nanočástic jsou odlišné od svých makroskopických protějšků. Jednou z těchto specifíků při interakci se světlem je také tzv. *Lokalizovaný povrchový plasmon* (*LPS – Localized Surface Plasmon*).^{3,4} Při tomto jevu dochází k excitaci vodivostních elektronů a k asymetrickému vychýlení elektronového mraku vůči jádrům působením elektrické složky dopadajícího elektromagnetického záření. To má za následek vznik coulombických přitažlivých sil mezi elektrony a jádry, což vede k oscilaci elektronového mraku vůči jádrům (obr. 3) –

vznikne oscilující dipól. Podmínkou, aby tento jev nastal, je, že nanočástice musí mít menší průměr, než je vlnová délka působícího záření.^{3,4,22}



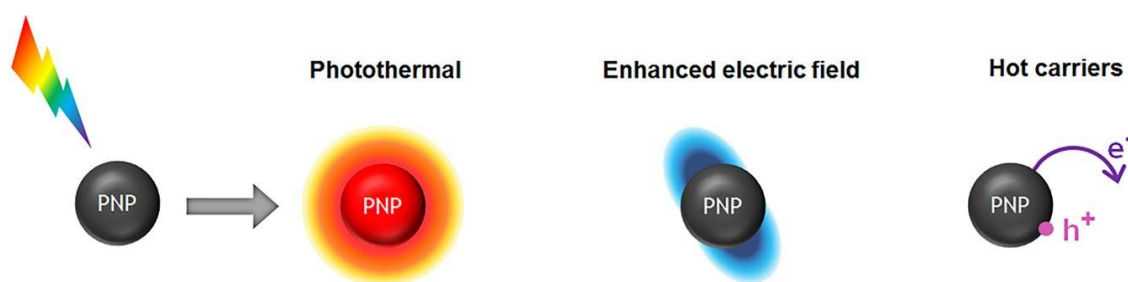
Obrázek 3: Lokalizovaný povrchový plasmon (převzato a upraveno z²³).

Když dojde ke shodě frekvencí dopadajícího záření s oscilujícím dipólem, nastává jev, který se nazývá *Lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance* (LPSR – Localized Surface Plasmon Resonance). Díky tomuto dokážou nanočástice silně absorbovat či rozptylovat světlo. Absorpční maximum částice má shodu s plasmonovou rezonanční frekvencí, což odpovídá vlnovým délkám od UV až po blízké IR záření. Tato poloha absorpčního maxima je velmi závislá na typu materiálu, velikosti a morfologii nanočástic (obr. 4). Díky tomu dokážeme LPSR ladit pro specifické aplikace.^{3,24,25}



Obrázek 4: závislost absorpčního pásu LPSR na tvaru nanočástic zlata; a) kulovité nanočástice; b) nanotyčinky (převzato a upraveno z²⁶).

Při absorpci světla plasmonickou nanočásticí dochází k disipaci energie pomocí tří současných mechanismů (obr. 5). První mechanismus je lokální generace tepla, která se používá v termální protinádorové fototerapii.^{5,27} Druhý je zvýšení elektrického pole v blízkosti plasmonických nanočástic. Toto se využívá pro sensoriku, spektroskopie nebo v pro zvýšení aktivity molekulárních fotokatalyzátorů. Třetím a posledním typem je vznik vysoce energetických vodivých elektronů tzv. horkých přenašečů (*hot carriers*) uvnitř částice. Po jejich excitaci se mohou přenést například na substrát a vyvolat zde změny. Tohoto se dá využít v plasmonem zprostředkované katalýze.^{27,28}

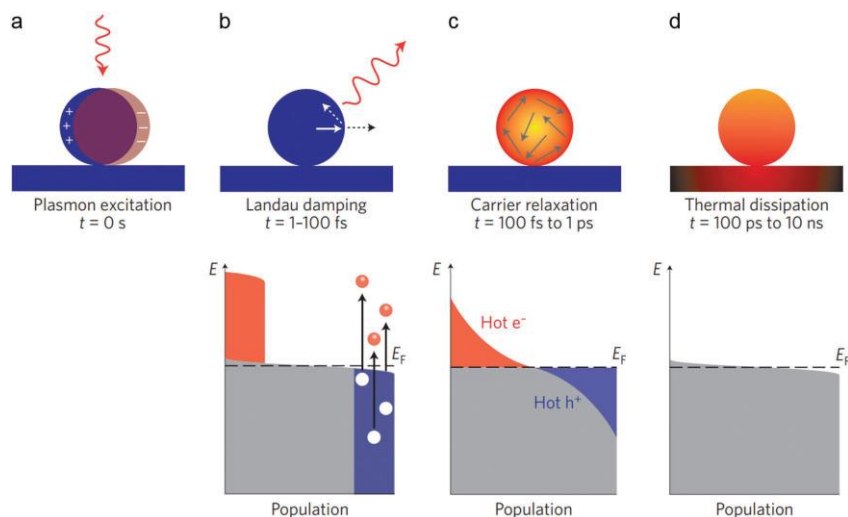


Obrázek 5: Hlavní mechanismy vzniklé lokalizovaným povrchovým plasmonem (převzato z²⁷).

1.3.4. Fototermální efekt

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, tak během působením vnějším záření na kovovou nanočástici při vhodné vlnové délce dochází k fotoexcitaci vodivostních elektronů, což má za následek již předem popsanou lokalizovanou povrchovou plasmonovou rezonanci. Ta se následně uvolňuje (obr. 6) dle následujícího pořadí: Nejprve dochází k Landauovému tlumení, poté k relaxaci nosičů, a nakonec k tepelné disipaci (rozptylu).⁵ Když je LSP fotoexcitován (obr. 6–a) vznikají páry horkých elektronů a děr (obr. 6–b), přičemž maximální energie excitovaných elektronů odpovídá excitační energii, která se nachází nad Fermiho energetickou hladinou (E_f). V tomto stavu je elektronová energie rozdělena netermálně s ohledem na Fermiho-Diracovu statiku. Tyto netermálně rozdělené horké nosiče jsou relaxovány procesem elektron-elektronového rozptylu bez ztráty absorbované fotonové energie, což má za následek interní termalizaci elektronů (obr. 6-c). Během finální relaxační fáze, která odpovídá časovému rozsahu 100 ps až 1 ns po excitační fázi LSP, se fotoexcitovaná energie nad E_f přenáší na kovovou mřížku prostřednictvím přenosu elektron-fonon, což vede k termální disipaci (obr. 6-d) a uvolnění tepelné energie do okolního prostředí. Během tohoto se

teplota elektronového mraku a mřížky postupně snižuje a distribuce elektronů vodivostního pásma kovové nanočástice kovu se vrací do svých základních hladin.⁵



Obrázek 6: Znáznornění fotoexcitace a následného relaxačního procesu LSP.

a) Plasmonová fotoexcitace (přijetí záření).

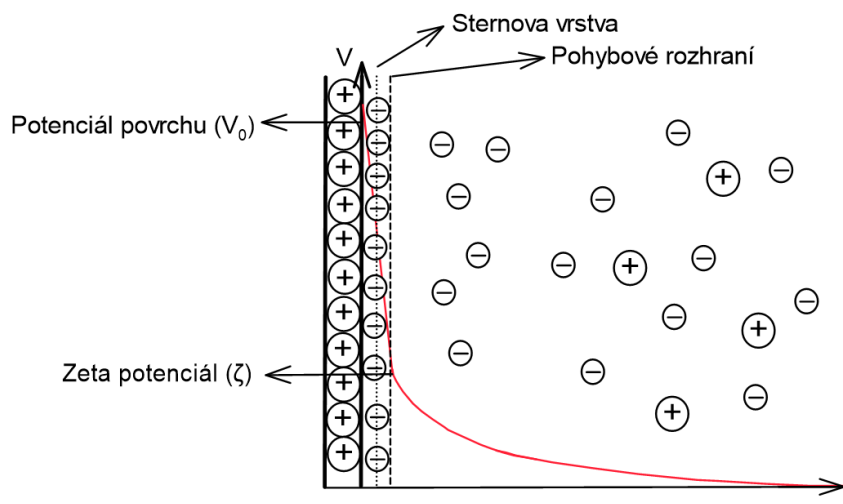
b-d) Znáznornění populace elektronových stavů během relaxace fotoexcitovaného LSP (převzato z⁵).

1.4. Elektrické vlastnosti

Na elektrické vlastnosti koloidních systémů a nanočástic má velký vliv *elektrická dvojvrstva*, která se objevuje na rozhraní mezi disperzní fází a disperzním podílem. Tato dvojvrstva vzniká v důsledku interakce mezi povrchem částice a rozpuštěnými ionty v kapalině a následným uspořádáním do opačně nabitých vrstev. Kromě tohoto se na náboji částic taktéž projevuje pH soustavy.^{6,20,29} Díky existence tohoto jevu můžeme v těchto soustavách pozorovat *elektrokinetické jevy*, mezi které patří například *elektroforéza*, *sedimentační potenciál*, *elektroosmóza* či *potenciál proudění*.⁶

Elektrickou dvojvrstvu můžeme dobře strukturně vyobrazit pomocí *Sternova modelu* (obr. 7). Podle Sterna jsou k vnitřní vrstvě iontů přitahovány elektrostatickými a adsorpčními silami opačně nabitě ionty. U povrchu je vrstva, ke které těsně přilehají opačně nabitě ionty. Tato vrstva se nazývá *Sternova vrstva* a tvoří ji ionty, které se k ní vážou především adsorpčními silami. Spolu s ionty vázané na povrch částic vytváří spojitou vnitřní vrstvu. Další ionty, které jsou dále od částice jsou přitahovány elektrostatickými silami a představují takzvanou difúzní vrstvu. Vnitřní vrstva se s částici

pohybuje, difúzní však nikoliv. Rozhraní, které je odděluje se nazývá *pohybové rozhraní*. A právě potenciál na fázovém rozhraní – *zeta-potenciál* ζ (elektrokinetický potenciál) způsobuje interakci s vnějším elektrickým polem (je zodpovědný za elektrokinetické jevy) a zároveň je velmi důležitý z hlediska stability koloidních částic.^{6,17}



Obrázek 7: Sternova vrstva (obrázek autor).

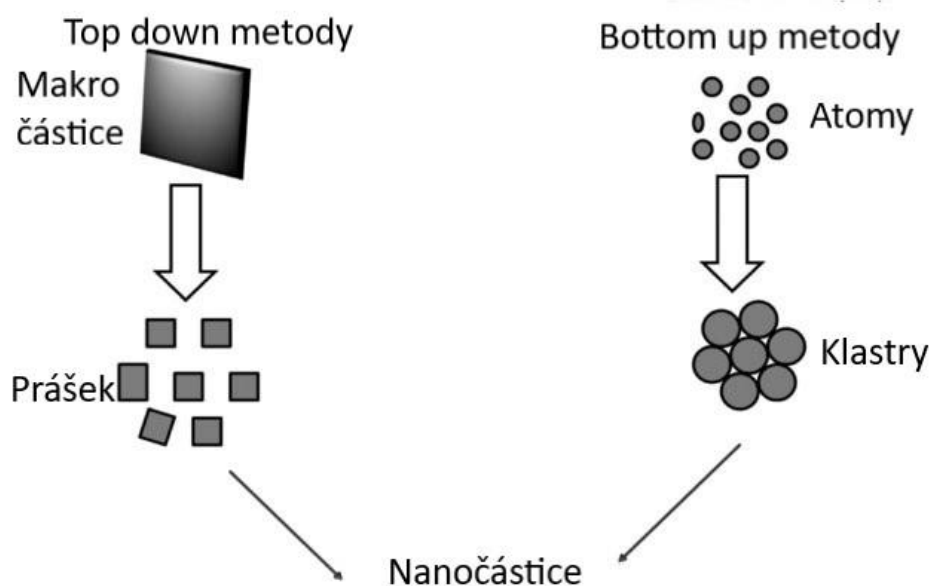
Zeta potenciál je tedy fyzikální vlastnost, která naznačuje potenciální stabilitu částic systému, a to i dlouhodobě. Zároveň predikuje interakce s povrchem nanočástic, což může posloužit k optimalizaci při tvorbě nanovrstev či úprav povrchu samotných nanočástic. Pokud mají nanočástice v systému vysoký záporný či kladný zeta potenciál, budou se navzájem odpuzovat a nebudou mít tendenci se spojovat a následně agregovat. Zeta potenciál závisí jednak na povaze povrchu nanočástice, ale i na povaze disperzního prostředí. Mezi ně patří faktory jako je pH a vodivost prostředí iontová síla a koncentrace a typy použitých komponentů. Ve vodných prostředích má pH zásadní vliv na velikosti zeta potenciálu. Pokud je prostředí více alkalické, tak pak částice získávají více záporný náboj. Naopak pokud je prostředí kyselé, získávají částice spíše kladný náboj. Pokud je soustava v izoelektrickém bodu, tak je velmi pravděpodobné, že zeta potenciál bude nulový a bude docházet pravděpodobně k agregaci.^{30,31}

Samotné stanovení zeta potenciálu se nejčastěji provádí elektroforeticky. K měření se využívá cela s elektrodami na obou koncích, do kterých je přiváděno napětí. Částice se pak pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem. Během toho je měřena jejich rychlost, která je vyjádřena v jednotkách intenzity pole jako jejich pohyblivost. Technika, která je používána pro měření rychlosti se nazývá *Laserová Dopplerova Velocimetrie*

(*Laser Doppler Velocimetry*). Ta funguje na interakci světla s částicemi, které jej rozptylují a toto rozptýlené záření je pak porovnáváno s referenčním paprskem. Z těchto údajů se pak výpočetní technikou dopočítává elektroforetická mobilita a tím i zeta potenciál.^{30,31}

1.5. Přípravy nanomateriálů

Existují 2 základní typy příprav nanočástic (obr. 8). Jsou jimi metody Top-down (shora-dolů) neboli metody dispergační a metody bottom-up (zdola-nahoru) neboli kondenzační.¹¹



Obrázek 8: Znáznornění Top-down a Bottom-up metod (převzato a upraveno z³²).

Metody top-down jsou založeny na zmenšování velikostí, kdy začínáme s objemným makromateriálem, který je postupně, většinou fyzikálními (mechanickými) a chemickými metodami zmenšován až do nanorozměrů. Do této kategorie spadají metody jako mechanické mletí, tepelná a laserová ablace, litografie či naleptávání. Výhodou těchto metod je, že jsou nenákladné a snadno proveditelné, ovšem jsou velmi hrubé, tedy nedokážeme kontrolovat výslednou velikost či morfologii. Bývají často využívány v průmyslu.^{11,33}

Metody bottom-up fungují prakticky obráceně než metody top-down. Z elementárních částic jako jsou atomy, molekuly či ionty jsou následně seskupovány do nanočástic pomocí chemických, fyzikálních či biologických metod (zelená cesta).³³ Konkrétně zde řadíme metody přípravy pomocí chemické redukce, pomocí srážecí

redukce či hydrolýzy, ale také sol-gel metody, sonochemické metody nebo hydrotermální. U tohoto typu syntéz dokážeme velmi přesně kontrolovat jednotlivé požadované parametry pro dané aplikace. Zároveň jsou často velmi snadno proveditelné a často nenákladné. Proto tyto metody, zejména chemickou redukcí jsou využívány pro syntézu nanočástic ušlechtilých kovů. Metoda chemickou redukcí je založená na redukcí soli s iontem daného prvku nanočástice ve vhodně upraveném prostředí pomocí redukčního činidla (například NaBH_4). Redukce může probíhat jednostupňově (příprava kulovitých nanočástic), ale také dvoustupňově, kdy v prvním stupni nejprve vytvoří zárodky nanočástic pomocí silného redukčního činidla a následně ve druhém kroku slabším redukčním činidlem se vytvoří požadovaný tvar.^{9,33,34}

V neposlední řadě stojí za zmínku vývoj biologických „zelených“ syntéz nanočástic, který zažívá velký růst v posledních dvou desetiletích. Je to z toho důvodu, že běžné metody využívají často pro přírodu nebezpečné reaktanty. Tento biologický přístup využívá mikroorganismů, řas či rostlin. Pomocí toho lze dosáhnout přípravy nanočástic o konkrétních tvarech či velikostech. Nevýhoda těchto metod je především, že využití organismy vyžadují více času a často obtížných postupů, aby se jednotlivé kultury udržely při životě. V současnosti lze nanočástice syntetizovat i pomocí různých částí rostlin, jako jsou listy, stonky, květy či kořeny. Ty jsou bohatým zdrojem fotochemikálií, jako jsou proteiny, vitamíny, polysacharidy či flavonoidy, které působí jako redukční a stabilizační činidla při biosyntézách nanočástic.³⁵

1.6. Nanočástice ušlechtilých kovů

K nanočásticím ušlechtilých kovů (NMNPs – Noble Metal NanoParticles) řadíme již hojně studované nanočástice zlata (AuNPs), stříbra (AgNPs) a platiny (PtNPs) nebo iridia (IrNPs), rhodia (RhNPs) či osmia (OsNPs). Ty se vyznačují oproti jiným typům nanočástic vysokou stabilitou, zvýšenou biokompatibilitou, specifickými optickými vlastnostmi (lokalizovaný povrchový plasmon) a snadnou syntézou, kdy na základě změny velikostí můžeme jednoduše ladit jejich vlastnosti pro specifické aplikace, stejně tak jejich snadnou funkcionalizaci. Proto mají vysoký potenciál ve využití v medicíně a farmacii konkrétně například jako léčba a diagnóza různých onemocnění (nádorová onemocnění, HIV, Parkinsonova choroba), transport léčiv nebo dokonce ve stomatologii.^{1,2}

1.7. Nanočástice stříbra

Stříbro je známo pro své medicinské využití již od starověkého Řecka, především pro svou antibakteriální aktivitu. Stříbrné sloučeniny byly až do příchodu antibiotik hlavní zbraní proti bakteriálním infekcím. Nanočástice stříbra (AgNPs) mají v porovnání se svými objemnými protějšky větší inhibiční účinek. Jsou velmi fungicidní, algicidní a baktericidní, a to již od relativně malých dávek. Proto se stalo nano stříbro jedním z nanomateriálů, které je již dnes hojně využíváno. Přidává se pro již předem zmíněné důvody například do textilů, komponentů, které jsou součástí praček, ledniček, vysavačů či filtrů. Taktéž se přidávají v podobě prášku do barev, nátěrů a materiálu ve stavebnictví, díky čemuž lépe brání korozi a prodlužují životnost.^{34,36,37} V budoucnu by se nanostříbro mohlo přidávat k antibiotikům pro posílení účinků z důvodu, že na klasická antibiotika si již dnes mnoho bakterií vybudovalo rezistenci. Také výhodou je, že nanostříbro má vysokou baktericidní aktivitu v koncentracích, které nejsou cytotoxické pro lidské buňky.³⁸ Kromě aplikace v podobě antibiotik má nanostříbro, díky svým optickým vlastnostem (lokalizovaný povrchový plasmon), které se dají dobře ladit pomocí úpravy velikosti a tvaru, potenciál ve využití v katalytických aplikacích či v biologických aplikacích jako je fototermální terapie, fotodynamická terapie, biosenzorika či různé teranostické aplikace.^{5,37,39}

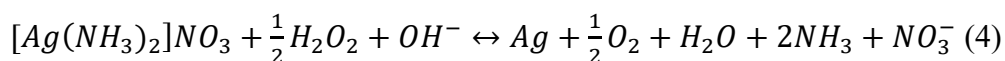
Kromě na bakterii a houby mohou nanočástice stříbra působit ve větších koncentracích cytotoxicky i na lidské buňky či buňky jiných živočichů. Dosud nebylo dosaženo všeobecné shody ohledně jejich toxicity a mechanismu kvůli nedostatku studií za laboratorních podmínek, avšak byly navrženy tři hlavní mechanismy, které vysvětlují toxicitu AgNPs. Prvním mechanismem je přímé poškození buněčných membrán. Druhým mechanismem je, že nanostříbro a ionty stříbra generují reaktivní kyslíkové formy. Poslední mechanismus spočívá v tom, že nanočástice stříbra by mohly sloužit jako tzv. „trojský kůň“, tímto obejít běžné bariery a následně uvolňovat stříbrné ionty a tímto poškozovat buňky. Kromě toho bylo prokázáno toxické působení nanostříbra na mořské organismy či řasy. Protože se již dnes nanočástice stříbra hojně využívají, je třeba dbát na šetrné zacházení s AgNPs vzhledem k životnímu prostředí, popřípadě najít cestu k stabilizaci, aby nedocházelo k rozkladu AgNPs na toxické stříbrné ionty.^{2,36,40}

1.7.1. Příprava nanočástic stříbra

Pro nanočástice stříbra jsou nejběžnějšími metodami příprav kondenzační metody, především metody chemickou redukcí. Při nich je nejtypičtější využití třech základních

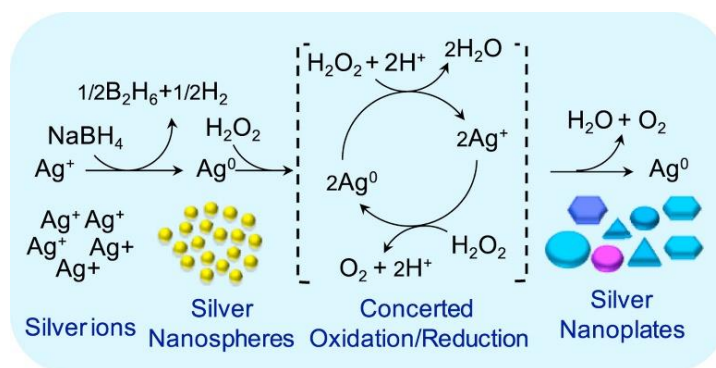
reaktantů – prekurzoru obsahující ionty daného kovu, v případě stříbra nejčastěji dusičnan stříbrný, stabilizátoru, nejčastěji TSC (citrát trisodný), SDS (Dodecylsírán sodný), PVP (polyvinylpyrrolidin), PAA (polyakrylová kyselina) nebo Tween 80 (Polysorbát 80) a redukčního činidla, ať už anorganických jako je NaBH₄ (tetrahydridoboritan sodný), H₂O₂ (peroxid vodíku) či N₂H₄ (hydrazin) nebo organických jako jsou aldehydy nebo redukující sacharidy (xylóza, glukóza, fruktóza nebo maltóza). Na finální velikosti a morfologii má tedy velký význam poměr daných reaktantů či podmínky prostředí (pH, teplota).^{34,41} Díky těmto širokým možnostem kombinací bylo vyvinuto mnoho metod. Jednou z velmi často využívaných a jednoduchých metod je tzv. modifikovaný Tollensův proces. Zde se převede stříbrný kation Ag⁺ na kation diamin stříbrný [Ag(NH₃)₂]⁺ pomocí amoniaku, který je následně redukován v zásaditém prostředí. Touto metodou se dá v závislosti na použití redukčního činidla připravit nanočástice stříbra o konkrétních velikostech. Při použití silných redukčních činidel jako je NaBH₄ vznikají nanočástice o velmi malých velikostech (v řádech jednotek až nízkých desítek nanometrů).^{10,41} Tohoto lze využít ve dvoustupňové přípravě anizotropních nanočástic, kdy na těchto „zárodcích“ můžeme pomocí slabších redukčních činidel je transformovat do požadovaných tvarů, například změnou použití množství či druhu stabilizátorů, díky kterým můžeme kontrolovat směr růstu nanočástic.^{34,42}

Jednou z velmi zajímavých typů příprav je syntéza anisotropických nanočástic za využití *peroxidu vodíku* jako redukčního činidla či jako modifikátoru tvarů. Výhoda spočívá v tom, že samotný peroxid vodíku se při jeho oxidaci rozkládá na vodu a vodík a zbytkový peroxid vodíku lze taktéž snadno rozložit. V disperzi tedy nezůstávají pozůstatky či produkty redukčního činidla, které by v případě biologických aplikací mohly mít nežádoucí dopad na účinnost či bezpečnost aplikace jako je tomu u jiných běžně používaných redukčních činidel.^{43,44} Peroxid vodíku se chová jako redukční reaktant v zásaditém prostředí (4):



kdy díky přítomnosti hydroxidových iontů se snižuje redoxní potenciál H₂O₂. V kyselém prostředí je poměrně vysoký redoxní potenciál peroxidu vodíku, a tedy chová se jako oxidační činidlo. V případě využití peroxidu jako redukčního činidla bylo v práci Nishimoto *et. al* (2018) takto pomocí jednostupňové syntézy úspěšně připraveny nanočástice stříbra o různých velikostech. Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací přidaného

peroxidu vodíku se snižuje velikost připravených nanočástic a s rostoucím pH se velikost nanočástic zvětšuje.⁴³ V práci Velgosova *et al.* (2022) byl peroxid vodíku využit v jednostupňové přípravě nanočástic stříbra při neutrálních podmínkách jako úspěšný modifikátor tvarů, kdy na základě změn pořadí a jeho přídavku a přídavku dalších reaktantů (TSC, PVP, NaBH₄) byly připraveny anizotropní nanočástice různých tvarů. Tímto bylo dosaženo širokého pokrytí UV-vis spekter, díky rozdílným plasmonickým pásům, způsobenou odlišnou morfologií nanočástic.⁴⁴ V článku Parnklang *et. al* (2015) se podařilo připravit pomocí oxidačně-redukční syntézy nanočástice stříbra (obr. 9) o mnoha morfologiích, tedy opět s širokou škálou UV-vis spekter. Ty byly připraveny nejdříve vyredukováním stříbrných kationtů do nanokuliček (při pH 7–8). Následně byl přidán peroxid vodíku (u každé disperze se variovalo množství přídavku), který kvůli snížení pH zoxidoval atomy stříbra a zároveň zvýšením pH způsobené rozkladem H₂O₂ se tyto kationty opět začaly vyredukovávat – transformovat – do nanočástic stříbra o specifických tvarech.⁴⁵



Obrázek 9: Schéma přípravy nanočástic stříbra redoxní metodou (převzato z⁴⁵).

1.8. Nanočástice zlata

Nanočástice zlata (AuNPs) mají, stejně jako ty stříbrné, diametrálně odlišné vlastnosti oproti svým objemovým protějškům. Proto jsou vedle nanočástic stříbra jednou z nejvíce zkoumaných skupin, a to nejen z důvodu snadných úprav fyzikálně-chemických vlastností pro dané aplikace, ale také pro jejich vyšší biokompatibilitu a inertnost, než je tomu u stříbra. Kromě biologických aplikací mají tyto nanočástice vysoký potenciál i v oblasti katalýzy, fotovoltaik, elektronice či analytických metodách.^{46,47} Podobně jako nanočástice stříbra i u nanočástic zlata byla zaznamenána dobrá antibakteriální aktivita, která může být zesílená vnějším ozářením.^{48,49}

Toxicita nanočástic zlata je především závislá na jejich velikosti a tvaru. Například ve studii Pan *et al.* byla zkoumána toxicita u nanočástic od velikostí 0,8 nm až 15 nm na různých buněčných liniích jako fibroblasty, epitelové buňky, makrofágy či melanomové buňky, přičemž nejvíce toxické byly částice o velikosti 1,4 nm. Naopak nanočástice o velikosti 15 nm nevykazovaly žádnou toxicitu. Toto prokázaly další studie.^{2,50} Bylo také prokázáno, že AuNPs mohou být toxické pro vodní organismus. Proto je stejně jak u nanočástic stříbra důležité být šetrní vůči životnímu prostředí. I přesto jsou nanočástice zlata méně toxické, a to díky své inertnosti a větší biokompatibilitě než nanočástice stříbra. Mají tedy vysoký potenciál ve využití v biologických aplikacích, jako léčba a diagnostika onemocnění či dodávání léčiv do konkrétních tkání.^{2,51–53}

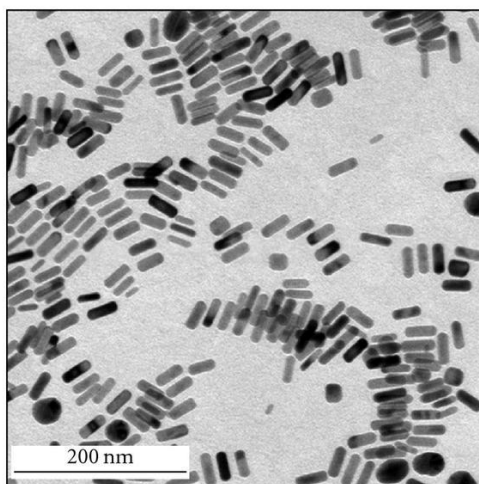
1.8.1. Přípravy nanočástic zlata

Podobně jako u nanočástic stříbra, tak i nanočástice zlata se nejběžněji připravují kondenzačními metodami, konkrétně přípravou chemickou redukcí. Obdobně jsou také výsledné velikosti a morfologie velmi závislé na reakčních podmínkách – poměr reaktantů (výchozího prekursoru, redukčního činidla a stabilizátoru), pH či teplotě. Jako prekursor se nejčastěji používá trojmocné zlato v podobě kyseliny tetrachlorzlatité $H[AuCl_4]$ či chloridu zlatitém $AuCl_3$. Jako redukční činidlo může být opět využito celá řada anorganických činidel, jako $NaBH_4$, N_2H_4 , či $Na_2S_2O_3$. Z organických činidel lze využít redukující cukry, kyselinu askorbovou či citrát trisodný. Stejně jako nanostříbro je třeba tyto nanočástice taktéž stabilizovat vhodným surfaktantem. K tomu může opět skvěle posloužit citrát trisodný či draselný, thioly, xanthanany či různé polymery.^{46,54}

Jednou z prvních metod a zároveň dlouhou dobu nejpobulárnějších je Turkevičova metoda, která byla vyvinuta již v roce 1951. Jedná se o metodu redukce $H[AuCl_4]$ pomocí citrátu trisodného ve vodném prostředí, která vedla k nanočásticím o velikosti 20 nm. Tento proces byl následně upraven Frensem v roce 1973, kdy se mu pomocí variace poměru redukční látky látky/stabilizátoru podařilo připravit nanočástice o velikosti od 16 nm do 147 nm. Kromě té existuje také například Brust-Schiffrinova metoda (1994), která využívá thioly pro vysokou stabilizaci a zároveň může být použita i pro přípravu AuNPs v organických rozpouštědlech či Martinovou metoda, která využívá $NaBH_4$ jako redukční činidlo a dá se ní dosáhnout nanočástic o velikosti 3 nm až 5 nm.^{46,47} Jak již bylo zmíněno, tak jako redukční činidlo pro přípravu nanočástic zlata se může využít i redukující sacharidy jako je maltóza či glukóza. Například ve článku Suchomel *et. al* (2018) se podařilo připravit pomocí maltózy jako redukčního činidla a surfaktantu

(stabilizátoru) Tween 80 (v různých koncentracích) kontrolovaně nanočástice o velikosti 6 nm až 22 nm.⁵⁴

Pro přípravu anisotropických nanočástic zlata (trojúhelníky, tyčinky, obr. 10) můžeme využít dvoustupňovou redukci (obdoba dvoustupňové redukce u nanočástic stříbra) či lze využít metodu růstu z počátečních zárodků (seeding growth), kdy se nejprve předpřipraví počáteční zárodky, které se následně nechají růst v roztoku obsahující prekurzor, redukční činidlo, stabilizátor či další různé modifikátory či aditiva. Nejdůležitější u této přípravy je volba surfaktantu a iontového aditiva.^{46,55} Například v případě nanotyčinek se jako surfaktant používá CTAB (cetrimoniumbromid) a BDAC (benzyl dimethylhexadecylammonium chlorid), jak tomu bylo uvedeno ve studii Huang *et. al* (2016). Taktéž zde bylo demonstrováno, že samotné nanotyčinky zlata mají silný potenciál v použití ve fototermální protinádorové terapii.⁵⁶

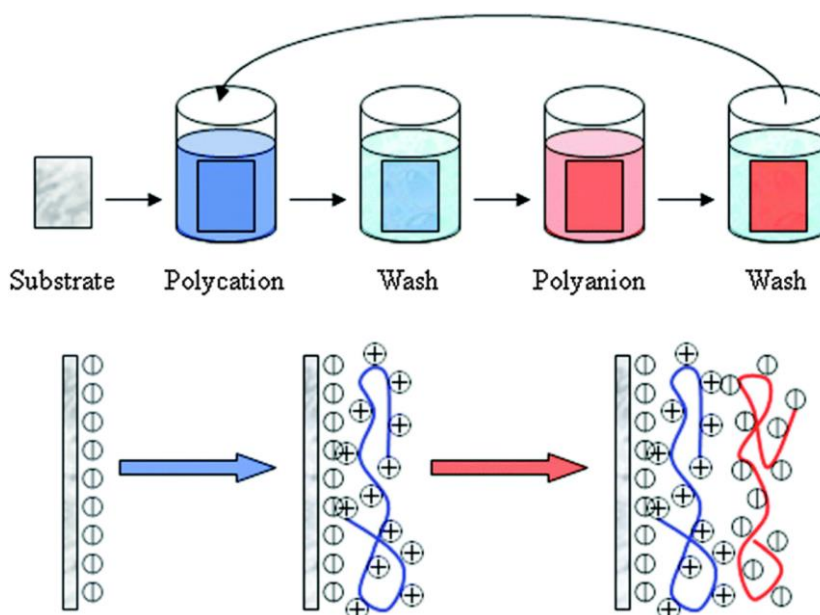


Obrázek 10: zlaté nanotyčinky; měřítko 200 nm (převzato z⁵⁷).

1.9. Příprava vrstev

Pro funkcionalizaci a aplikaci nanočástic na površích se velmi často používá metoda „Vrstva po vrstvě“ (Layer-by-Layer, zkráceně LbL). Je to jednoduchý a všestranný depoziční proces vrstvení, který se dá použít pro širokou škálu aplikací, například pro vytváření ochranných vrstev, superhydrofobních povrchů, povlaků, polovodičů či různých povrchů v biologických aplikacích (biosenzory, povlacích implantátů či vrstev na mikrotitračních destičkách pro *in vitro* testování) či cílené dopravě léčiv, kdy je daná účinná látka nejprve na povrch navázaná a následně na základě změny prostředí (pH, teploty), enzymaticky či hydrolyticky uvolněná.⁵⁸

Mechanismus metody funguje na základě vytváření jednotlivých vrstev – filmů, které obsahují funkční skupiny, které vedou k samouspořádání (self-assembly). Většina těchto technik je založená na elektrostatických interakcích mezi opačně nabitými polyelektrolyty, v případě aplikace nanočástic i na základě náboje povrchu nanočástice, na vytváření vodíkových vazeb, koordinačních vazeb, na tzv. „click chemistry“ či sol-gel reakcích. Tedy je velmi nutné, aby byl pro daný povrch (sklo, polystyren, kovové desky) vybrán vhodný polyelektrolyt. Samotné vrstvy mohou být nanášeny třemi způsoby: ponoření substrátu do roztoku obsahující danou povrchově aktivní látku (nejčastější metoda), spinové povlakování (roztok s polyelektrolytem je nanášen a rozprostřen po povrchu substrátu, který se rychle otáčí) a nástřikovým povlakováním. Při ponořovací metodě je také mezi jednotlivými kroky vytváření daných vrstev zapotřebí promýt daný povrch, aby se odstranil nenačíslený materiál a předešlo se kontaminaci (obr. 11).^{58,59}

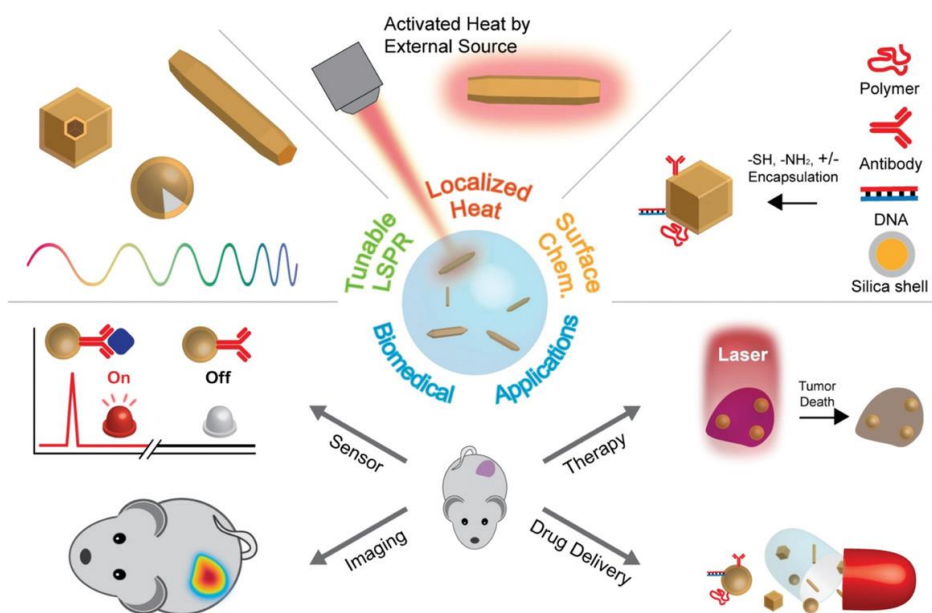


Obrázek 11: Schéma metody Layer by layer (převzato z⁵⁸).

Mezi velmi často používané polyelektrolyty řadíme umělé polymery, jako je například PDDA (polydimethyldiallylammonium chlorid), PEI (polyethylenamin), PAA (polyakrylová kyselina), PSS (polystyrénsulfonát) nebo PMAA (polymethylakrylová kyselina). Lze využít i přírodní povrchově aktivní látky jako jsou různé proteiny, polysacharidy (chondroitin, heparin, chitosan nebo dextran). Kromě výběru aktivní látky je třeba také vhodně upravit pH prostředí, které velmi ovlivňuje elektrostatické náboje a následnou možnost vzniku elektrostatických interakcí.⁶⁰

2. Biologické aplikace

Rozmach nanotechnologií a studia nanomateriálu sebou přinesl obrovské možnosti v aplikaci v medicíně či biochemii a ve zlepšení dosavadních lékařských postupů. Ty mohou spočívat v zefektivnění, zjednodušení, zlevnění, zrychlení či ve větší šetrnosti vůči organismu, a to jak v prevenci, diagnostice tak léčbě. To vše díky již předem zmíněným unikátním vlastnostem. Plasmonické nanočástice ušlechtilých kovů jsou, jak využívány pro svůj rozptyl světla (nanoantény, kontrastní látky pro SERS – povrchově zesílenou Ramanovou spektroskopií nebo zesílené fluorescence), tak pro své absorpční vlastnosti, především pro fototermální efekt. Ten lze převést do mnoha biologických aplikací (Obr. 12) jako je biosensing, bioimaging, transport léčiv či terapeutických metod, ať už protinádorových či protiinfekčních.^{5,61}



Obrázek 12: Využití nanočástic pro biologické aplikace (převzato z⁵).

SERS – Povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopií lze aplikovat pro *biosenzoriku* a *zobrazování (bioimaging)*. Jako substrát zde můžeme využít plasmonické nanočástice ušlechtilých kovů (AgNPs, AuNPs). V oblasti biosenzoriky nalézají využití například k detenci hladiny glukózy v krvi, enzymů, molekulárních markerů různých onemocnění (nádorových), patogenů a podobně.⁶² Jako příklad lze uvést studii Jiang *et al.* (2018), kde se jim podařilo připravit nanokompozit, obsahující nanočástice stříbra jako acetylcholinesterázový elektrochemický biosenzor pro detekci organofosfátových pesticidů, kde nanočástice stříbra zlepšily elektrickou vodivost a biokompatibilitu kompozitu.⁶³ V článku Anderson *et al.* (2017) zase připravili velmi citlivý

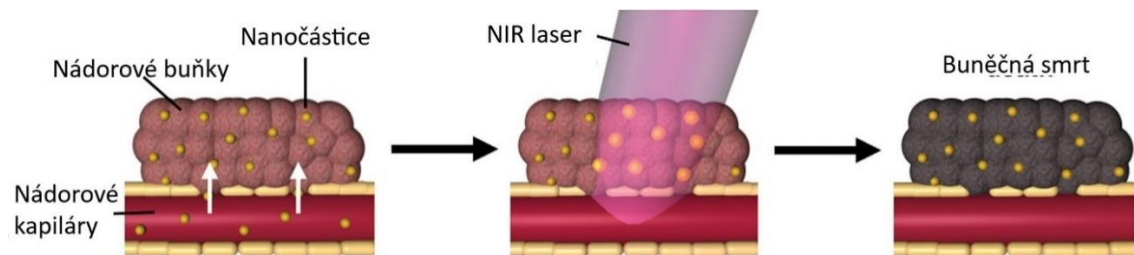
nanoenzamatický biosenzor pro detekci glukózy, kde nanočástice stříbra byly opět využity jako aditivum pro zvýšení vodivosti. Tento biosenzor by mohl mít v budoucnosti velký potenciál být aplikovaný jako neinvazivní detekce glukózy v lidském těle.⁶² V oblasti zobrazování (imagingu) mohou nanočástice taktéž zlepšit a zjednodušit samotný proces. V klasickém procesu se nejčastěji zavádějí organická barviva do vzorku (fluorescein, nebo isothiokyanáty), které ovšem mají nedostatky v intenzitě fluorescence a také dochází k jeho postupnému snižování z důvodu nevratných změn v molekulární struktuře samotného barviva, působením záření či okolí, které ho může nakonec činit nefluorescenčním. Nanočástice mohou oba tyto nedostatky eliminovat. Taktéž mohou nanočástice být využity jako kontrastní látky v zobrazování magnetickou resonancí.⁶⁴

V medicíně je farmakokinetika (cesta a osud léčiva od podání po vyloučení) a farmakodynamika (mechanismus působení) léčiv – *transport léčiv* – stejně tak důležitá jako jejich terapeutické působení. Použití nanočástic v transportu léčiv může vylepšit samotné specifické a selektivní účinky daného systému pro maximální terapeutickou účinnost. Pro dosažení konkrétních účinku v lidském organismu je nezbytné zvážit proces aplikování vybraného farmaceutického přípravku. Nanočástice zlata i stříbra (a jejich kompozity) mají slibnou budoucnost v tomto použití, kdy lze získat nové a vylepšené systémy pro dodávání léčiv, které mohou specificky reagovat na tepelné, optické nebo pH změny za účelem uvolnění a působení léku v konkrétním místě, například proti infekčnímu, nádorovému nebo zánětlivému onemocnění.⁶⁵

2.1. Fototermální terapie

Jako jedno z nejdůležitějších využití plasmonického fototermálního efektu je *Fototermální terapie (PTT – PhotoThermal Therapy)*, která je velice slibnou alternativou v léčbě nádorových onemocnění oproti jiným běžným a zaběhnutým metodám. Tato metoda funguje na principu absorpce vnějšího záření nanočásticemi v nádoru, které je následně transformováno na energii tepelnou. To má za následek vyvolání hypertermie – lokální zvýšení teploty v nádoru na 41 až 50 °C, což způsobí nevratné poškození nádorových buněk, zatímco okolní zdravá tkáň zůstane nepoškozená, jelikož zdravé buňky jsou méně náchylné na teplotu než nádorové. Jako zdroj záření jsou ve většině případů preferovány nízkoenergetické lasery v oblasti blízkého infračerveného spektra (o vlnové délce 600-1100 nm) a to díky velké pronikavosti skrz tkáň a tělní tekutiny (až několika centimetrů).^{5,66} Samotná PTT má mnoho výhod oproti jiným zaběhnutým

metodám. Je vysoce selektivní, neinvazivní, má málo případných vedlejších účinků, ale zároveň je účinná a nenákladná na provedení.⁵



Obrázek 13: Fototermální terapie (převzato z⁶⁷).

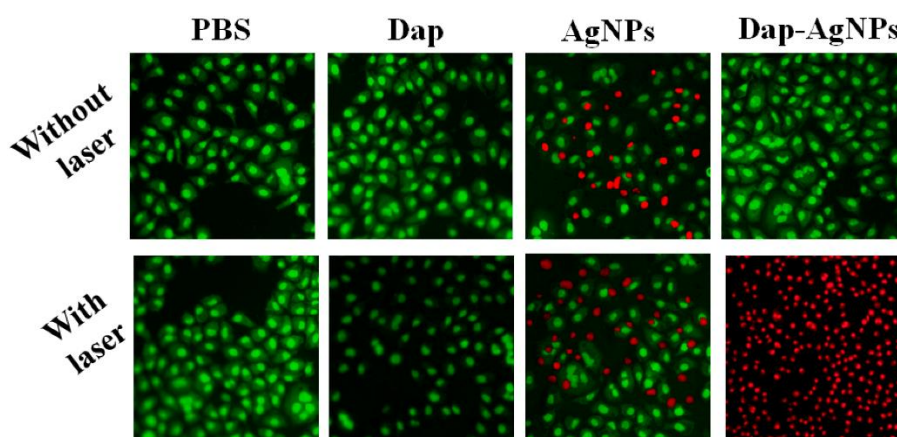
V použití *in vivo* je stejně tak, jako fototermální účinnost, důležité zvolit efektivní funkcionalizaci k dodání léčiva do konkrétní nádorové tkáně, aby léčba byla co nejvíce selektivní a snížilo se riziko nespecifického poškození zdravé tkáně. Proto jsou v posledních letech nanočástice ušlechtilých kovů pro toto použití zkoumány nejvíce, protože je lze snadno biofunkcionalizovat. Bylo vyvinuto již několik způsobů, jak selektivně dodat nanočástice zlata do konkrétní nádorové tkáně pomocí jejich biokonjugace se specifickými molekulami cílené na nádory. Pro tento účel se obvykle používají 2 základní strategie. První je úprava povrchu nanočástic pomocí PEG (polyethylenglykolem) – *Pasivně cílená* a druhá je biokonjugovat nanočástice s protilátkami specifickými pro biomarkery v dané tkáni – *Aktivně cílená*.⁶⁶ PEG je využíváno pro zvýšení biokompatibility a biostability nanočástic, takže mohou být zadrženy v krvi delší dobu. Zároveň zabraňuje agregaci. V *in vivo* aplikacích pak jsou nanočástice s PEG selektivně akumulovány v nádorových tkáních díky efektu zvýšené permeability a retence. Ve srovnání s normální tkání jsou kapiláry v nádorové tkáni více propustné, a proto nanočástice preferenčně se soustřeďují v této tkáni. Kvůli snížené funkčnosti lymfatického drenážního systému pak jsou zde nanočástice zadržovány delší čas než kdekoli jinde ve zdravé tkáni.⁶⁶

Funkcionalizace pomocí protilátek pro konkrétní biomarkery je více aktivní, specifičtější a efektivnější než u pasivně cílených nanočástic, protože protilátky jsou přímo určeny pro dané nádorové markery. Pro příklad lze uvést proti-receptorovou protilátku k epidermálnímu růstovému faktoru (EGFR), kterou lze využít k cílení nadexprimovaného EGFR na buňkách rakoviny ústní dutiny či rakoviny děložního čípku

nebo lidský epidermální růstový faktor typu 2 (HER2) na nádorové buňky rakoviny prsu.⁶⁶

V posledních letech jsou studovány více zlaté nanočástice než stříbrné, protože jsou v biologickém prostředí více stabilní a jsou více biokompatibilní. Ovšem v poslední době se ukazuje, že i nanočástice stříbra mají vysoký potenciál v tomto využití a byly neprávem opomíjeny.³⁹ V případě zlata se jako velmi perspektivní ukázaly být nanotyčinky zlata či zlaté noslupky u kterých dochází k výraznému zvýšení absorpce, a tedy efektivity fototermálního efektu.^{56,66}

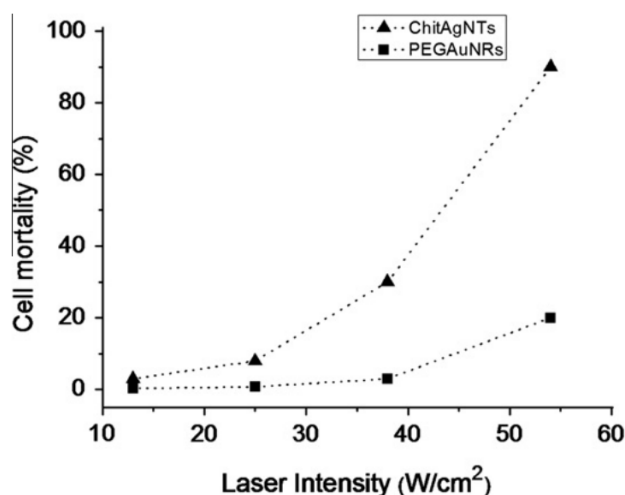
V případě nanočástic stříbra je snaha zlepšit stabilitu a zvýšit fototermální konverzi. Například ve studii Zhang *et al.* (2022) funkcionalizovali nanočástice stříbra pomocí daptomycinu, což obě tyto vlastnosti dokázalo vylepšit. Zároveň daptomycin dokázal snížit cytotoxicitu samotných nanočástic stříbra, kdy byly vystaveny HeLa buňky a HT-29 buňky Dap-AgNPs a jejich buněčná aktivita zůstala nad 85%. Následně otestovali fototermální léčbu pomocí NIR laseru o vlnové délce 808 nm a intenzitě záření $1,75 \text{ W/cm}^2$ *in vitro* na HeLa buňkách po dobu 10 minut. Test viability buněk potvrdil, že tyto nanočástice dokázaly inhibovat dané nádorové buňky, jak je to znázorněno na obrázku číslo 14. Zde jsou vidět HeLa buňky vystaveny jednotlivým složkám a laseru, kdy zelené značí živé buňky a červené značí mrtvé buňky.⁶⁸



Obrázek 14: Test odolnosti buněčné linie HeLa vůči jednotlivým komponentům a vystavení laseru. (převzato z⁶⁸)

V článku Boca *et al.* (2011) připravili stříbrné nanotrjúhelníky, u kterých následně testovali fototermální aktivitu *in vitro* na nádorových buňkách plic (NCI-H460) za působení laseru o vlnové délce 800 nm. Zároveň jej porovnávali se zlatými

nanotyčinkami, funkcionalizované pomocí PEG. Zde cytotoxické testy prokázaly, že Chit-AgNTs vykazují dobrou biokompatibilitu k zdravým buňkám linie HEK (embryonální ledvinové buňky), ale zároveň požadovanou dávkově závislou toxicitu vůči nádorovým buňkám NCI-H460. Chit-AgNTs se prokázaly být více účinné v destrukci nádorových buňek ve srovnání s PEG-AuNRs při podobném výkonu laseru (porovnání na obrázku 15).⁶⁹



Obrázek 15: Srovnání úmrtnosti buněk NCI-460, které byly inkubovány s Chit-AgNTs nebo PEG-AuNRs a následně ozářeny laserem o 800 nm při různých hodnotách intenzity záření. (převzato z⁶⁹)

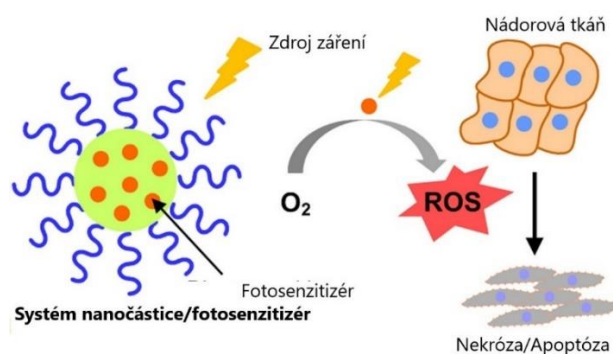
Studie Mackey *et al.* (2014) porovnávala fototermální aktivitu zlatých nanotyčinek o různých velikostech, konkrétně o délkách 17, 28 a 38 nm. Všechny byly konjugovány s PEG a testovány *in vitro* na nádorových buňkách karcinomu dutiny ústní (HSC-3). Společně s nanočásticemi byly vystaveny NIR laseru o vlnové délce 808 nm a intenzitě záření 5,8 W/cm². Jako nejlepší konverzi tepla pomocí ozařování vykazovaly nanočástice o rozměrech 28 x 8 nm. Ty dokázala po 2 minutách ozařování snížit viabilitu buněk až na 20 %.⁷⁰

Thompson *et al.* (2014) pak připravili nanočástice stříbra, které taktéž stabilizovali pomocí chitosanu a následně testovali jejich fototermální aktivitu na jednotlivých nádorových buňkách – MCF7 (karcinom prsu) a MDA-MB-231 (karcinom prsu) a zdravých epitelových buněk prsu MCF 10A vyvolanou laserem o vlnové délce 800 nm. Zde také potvrdili, že nádorové buňky projevují sníženou viabilitu po expozici nanočástic stříbra ve srovnání se zdravými buněčnými liniemi, tedy nádorové buňky reagují

na samotné nanočástice jinak než ty zdravé. Při použití koncentrace AgNPs 100 nebo 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a intenzity záření NIR laseru 0,79 a 2,94 W/cm^2 docházelo 90% poklesu viability buněk u všech linií.⁷¹

2.2. Fotodynamická terapie

Další možnou terapeutickou metodou proti nádorovým onemocněním je *Fotodynamická terapie (PDT – PhotoDynamic Therapy)*. Ta využívá vnějšího záření, které působí na fotosenzitizéry (PS), což vede přenos energie na molekuly kyslíku v tkáni či jiné substráty v okolí a ty mění na cytotoxické reaktivní formy kyslíku (ROS), jako jsou volné kyslíkové radikály či singletový kyslík. Ty mohou vyvolat jak apoptózu, tak nekrózu nádorových buněk. Když není přítomno vnější záření, tak samotné fotosenzitizátory jsou minimálně toxické. Nanočástice se zde používají pro větší rozpustnost ve vodě, jelikož samotné fotosenzitizéry jsou často velmi hydrofobní. Zároveň pod fyziologickými podmínkami snadno agregují. Taktéž mohou zlepšit pomocí následné funkcionalizaci, stejně jak u PTT selektivnost dodání do konkrétních tkání a zároveň zvýšit účinnost samotných fotosenzitizérů. Oproti jiným konvenčním metodám, jako je chemoterapie či radioterapie bez výrazných vedlejších účinků, nenákladná a vysoce selektivní.^{5,72}



Obrázek 16: Znárodnění fotodynamické terapie (převzato a upraveno z⁷²).

III. PRAKTICKÁ ČÁST

3. Materiál a experimentální vybavení

3.1. Chemikálie

K přípravě plasmonických nanočástic stříbra byly použity následující chemikálie: dusičnan stříbrný AgNO_3 (p.a., Fagron), amoniak NH_3 (p. a., 28,0-30,0% vodný roztok, Sigma-Aldrich), citronan trisodný dihydrát $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (p.a., Lachner), tetrahydridoboritan sodný NaBH_4 ($\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich) a peroxid vodíku H_2O_2 (p.a. nestabilizovaný, 30% vodný roztok, Lach-Ner).

Pro přípravu vrstev nanočástic stříbra na mikrotitrační destičky byly použity: kyselina polyakrylová $(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n$ (průměrná mol. hmotnost 100 000, 35% vodný roztok, Sigma-Aldrich), polydiallyldimethylammonium chlorid $(\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NCl})_n$ (průměrná mol. hmotnost 100 000-200 000, 20% vodný roztok, Sigma-Aldrich) a předem připravené nanočástice stříbra.

Pro testování fototermální terapie *in vitro* byly použity HeLa buňky kultivovány v živném médiu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), které obsahuje: 10% fetální bovinní sérum FBS (Sigma Aldrich), 2% 200 mM L-glutaminu a 0,4% penicilin/streptomycin (Sigma). K testování viability buňek byly použity thiazolyl blue tetrazolium bromid MTT (Sigma-Aldrich), fosfátový pufr PBS (pH = 7,4) a dimethylsulfoxid DMSO (Sigma Aldrich).

3.2. Přístrojové vybavení

Všechny chemikálie pevného skupenství byly váženy na digitální analytické vaze KERN 770 (KERN), objemy kapalných chemikálií byly odměřovány pomocí automatických pipet (Eppendorf). UV-VIS spektra připravených nanočástic byly měřeny pomocí spektrofotometru SPECORD (AnalytikJena). Hodnoty zeta potenciálů a orientační velikosti připravených nanočástic byly měřeny pomocí DLS Zetasizer Nano ZS (Malvern). Mikrotitrační destičky byly protřepávány na třepače Kavalier LT3 (Verkon). TEM snímky byly pořízeny na JEM 2010 (Jeol, Japonsko). Pro testování fototermálního efektu byl využit laser o vlnové délce 660 nm (100 mW, na výstupu 75% přenos energie).

4. Příprava plasmonických nanočástic stříbra

4.1. Příprava plasmonických nanočástic na základě variace přídávku NaBH₄

Anizotropní nanočástice stříbra byly připraveny dvoustupňovou redukcí amoniakálního komplexu kationtu stříbra [Ag(NH₃)₂]⁺, který byl připraven reakcí dusičnanu stříbrného AgNO₃ a amoniaku NH₃. Nejprve pro první stupeň redukce bylo použito silné redukční činidlo NaBH₄, jehož koncentrace se u každé jednotlivé disperze měnila. Pro druhý stupeň se použilo redukční činidlo v podobně peroxidu vodíku H₂O₂. Reakce probíhaly v kádinkách o objemu 50 ml, za neustálého míchání v přítomnosti dihydrátu citrátu trisodného o stále koncentraci.

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých reakčních látek o těchto objemech a koncentracích:

- 50 ml roztoku dusičnanu stříbrného AgNO₃ o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku amoniaku NH₃ o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku citrátu sodného C₆H₅Na₃O₇ · 2 H₂O o 1% (w/w)
- 100 ml roztoku tetrahydridoboritan sodného NaBH₄ o koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku peroxidu vodíku H₂O₂ o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Takto bylo připraveno při laboratorní teplotě celkově 8 disperzí anizotropních nanočástic stříbra. Pořadí a množství přídávků jednotlivých komponentů této metody je znázorněno v tabulce číslo 1.

Tabulka číslo 1: Objemy a pořadí reakčních komponentů pro přípravu nanočástic stříbra.

Číslo vzorku	AgNO ₃	NH ₃	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O	H ₂ O	NaBH ₄	H ₂ O ₂
1.	5 ml	5 ml	5 ml	4,980 ml	20 μl	5 ml
2.				4,975 ml	25 μl	
3.				4,95 ml	50 μl	
4.				4,9 ml	0,1 ml	
5.				4,8 ml	0,2 ml	
6.				4,5 ml	0,5 ml	
7.				4 ml	1 ml	
8.				2,5 ml	2,5 ml	

Výsledný objem všech disperzí byl 25 ml a každá reakce trvala 10-15 sekund. Jednotlivé disperze se lišily rozdílným přídávkem tetrahydridoboritanu sodného a vody.

Tyto připravené disperze pak byly pro měření na UV/VIS spektrofotometrii 10x zředěny do plastových kyvet. Pro měření zeta potenciálu na DLS Zetasizeru byly 1x ředěny.

4.2. Příprava plasmonických nanočástic na základě variace přídávku NH_3

V této přípravě byly anizotropní nanočástice stříbra opět připraveny dvoustupňovou redukcí amoniakálního komplexu kationtu stříbra $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, který byl připraven reakcí dusičnanu stříbrného AgNO_3 a amoniaku NH_3 . Přídavek amoniaku se zde varioval a koncentrace ve výsledné disperzi postupně zvětšovala. Nejprve pro první stupeň redukce bylo použito silné redukční činidlo NaBH_4 , pro druhý stupeň bylo použito jako redukční činidlo peroxid vodíku H_2O_2 . Reakce probíhaly v kádinkách o objemu 50 ml, za neustálého míchání v přítomnosti dihydrátu citrátu trisodného, jako stabilizátoru o stále koncentraci.

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých reakčních látek o těchto objemech a koncentracích:

- 50 ml roztoku dusičnanu stříbrného AgNO_3 o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku amoniaku NH_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku citrátu sodného $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o 1% (w/w)
- 100 ml roztoku tetrahydridoboritan sodného NaBH_4 o koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku peroxidu vodíku H_2O_2 o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Takto bylo připraveno při laboratorní teplotě celkově 6 reprezentativních disperzí anizotropních nanočástic stříbra. Pořadí a množství přídávků jednotlivých komponentů této metody je znázorněno v tabulce číslo 2.

Tabulka číslo 2: Objemy a pořadí reakčních komponentů pro přípravu nanočástic stříbra.

Číslo vzorku	AgNO ₃	NH ₃	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	H ₂ O	NaBH ₄	H ₂ O ₂
1.	5 ml	1 ml	5 ml	9 ml	50 μl	5 ml
2.		2,5 ml		7,5 ml		
3.		4 ml		6 ml		
4.		5 ml		5 ml		
5.		7,5 ml		2,5 ml		
6.		10 ml		0 ml		

Výsledný objem všech disperzí byl 25,05 ml. Jednotlivé disperze se lišily rozdílným přídatkem amoniaku a vody. Čas reakce záležel na množství přídatku NH₃. Při nízkých koncentracích docházelo k reakci téměř okamžitě po přidání peroxidu vodíku. Tento čas se postupně zvětšoval až do 30 sekund u poslední disperze. Tyto připravené disperze pak byly pro měření na UV/VIS spektrofotometrii 10x zředěny do plastových kyvet. Pro měření zeta potenciálu DLS Zetasizeru byly 1x ředěny.

5. Příprava stříbrných vrstev na mikrotitračních destičkách pro PTT testování

Na mikrotitrační destičce byly pro testování fototermální aktivity stříbrných nanočástic připraveny vrstvy vybraných disperzní nanočástic stříbra pomocí metody samoorganizace vrstvy po vrstvě (self-assembly layer-by-layer) na základě elektrostatických interakcí mezi vrstvami nesoucí opačný náboj. Pro přípravu byly, kromě již předem připravených disperzí nanočástic stříbra (kapitola 5.), nachystány zásobní roztoky jednotlivých použitých reakčních komponentů o těchto objemech a koncentracích:

- 50 ml roztoku kyseliny polyakrylové PAA ($C_3H_4O_2$)_n o 1% (w/w)
- 50 ml roztoku poly(diallyldimethylammonium chloridu) PDDA ($C_8H_{16}NCl$)_n o 0,25% (w/w)

Plastové polystyrenové mikrotitrační destičky o 96 jamkách byly nejprve propláchnuty ethanolem a následně destilovanou vodou, aby byla odstraněna mastnota a nečistota. Poté bylo do každé jamky (kromě třech posledních sloupců, kvůli kontrolnímu vzorku při testování fototermální aktivity) odpipetováno 0,20 ml 1% roztoku kyseliny polyakrylové a destička byla ponechána stát 1 hodinu pro naadsorbování PAA na destičku. Po této době byl zbylý roztok PAA z jamek odstraněn, každá jamka propláchnutá destilovanou vodou pomocí stříčky, odpipetováno do každé jamky 0,20 ml 0,25% roztoku poly(diallyldimethylammonium chloridu) (PDDA) a opět ponecháno stát po dobu 1 hodiny, aby se PDDA naadsorbovalo na PAA. Po této době byl zbylý roztok PDDA z jamek odstraněn a každá jamka propláchnuta destilovanou vodou. Destilovanou vodou byly pak jednotlivé jamky naplněny a nechány po dobu 30 minut na třepačce pro odstranění zbylé PDDA. Následně byla destilovaná voda odstraněna, do každé jamky bylo odpipetováno 0,2 ml předem připravených disperzí nanočástic stříbra a destička byla ponechána stát po dobu 1 hodiny. Nakonec byla zbylá disperze z jamek odstraněna, jamky destilovanou vodou promyty a destička usušená na vzduchu (případně může být pro rychlejší usušení použity fén či sušárna).

6. Fototermální terapie

Pro testy byly použity buňky HeLa, které byly vykultivovány v DMEM médiu v termoboxu při 37 °C a 5% atmosféře CO₂ na 96 jamkových destičkách (s vrstvou i bez vrstvy nanočástic stříbra). Po 24 hodinách byly jamky ozářeny laserem a následně opět po 24 hodinách byl provedený test viability buněk pomocí metody MTT. Experimenty byly prováděny v triplikátech.

Ozáření laserem probíhalo opět v termoboxu při 37 °C a 5% atmosféře CO₂. Pro zajištění ideálního osvětlení celé jamky byl laser umístěn nad jamkou ve výšce 2 cm od jejího dna. Před ozářením bylo z jamky vždy odsáto DMEM médium a po ozáření vyměněno za čerstvé. Viabilita buněk byla vztažena k neozařovaným buňkám v jamkách s vrstvou daného vzorku nanočástic stříbra, u kterých bylo taktéž vyměněno DMEM médium 24 hodin před MTT testy. Viabilita buněk, určující toxicitu samotných nanočástic, byla vztažena k neozařeným buňkám v jamkách, kde nebyly vrstvy nanočástic stříbra. Zde bylo taktéž vyměněno médium 24 hodin před testováním viability. Hodnota energie záření laseru, přepočítaná na jouly (J) je shrnutá v tabulce číslo 3.

Tabulka číslo 3: Výpočet výsledné energie záření laseru působící na jamku

Laser	Výkon [mW]	Přenos energie [%]	Energie za 1 min [J]
660 nm	100	75	4,5

Pro testování fototermálního efektu nanočástic stříbra na buňkách buněčné linie HeLa byly využity 2 destičky, na kterých byly adsorbovány plasmonické nanočástice stříbra (disperze číslo 3 z kapitoly 4.1.), které byly připraveny pomocí nezředěné disperze a s naředěnou disperzí na poloviční koncentraci stříbra. K ozařování jamek byl použit laser o vlnové délce 660 nm a byly využity dávky ozáření o energiích 5, 10, 15 a 20 J. Časy, které byly potřebné pro ozáření těmito dávkami energií laserem, byly shrnuty v tabulce číslo 4. Každé ozařování o konkrétní energii bylo provedeno v triplikátech (3 jamkách).

Tabulka číslo 4: Časy potřebné k ozáření jamek laserem pro dosažení konkrétních energií – 5, 10, 15 a 20 J.

Energie dodaná laserem (660 nm)	Čas
5 J	1 min 6 s
10 J	2 min 13 s
15 J	3 min 20 s
20 J	4 min 26 s

Test viability buněk (MTT test) byl proveden podle následujícího postupu. Nejprve byl připraven roztok barviva MTT (thiazolyl blue tetrazolim bromide) ve fosfátovém pufru PBS (5 mg/ml), který byl následně desetinásobně zředěn pomocí DMEM. Tímto byl připraven pracovní roztok o finální koncentraci MTT 0,5 mg/ml. Z jamky bylo odsáto médium, buňky byly jedenkrát promyty pufru PBS (100 μ L) a následně bylo přidáno 100 μ L DMSO (dimethylsulfoxidu). Absorbance roztoku poté byla měřena při 570 nm a reference při 690 nm. Nakonec byl v excelu proveden odečet těchto hodnot a vyhodnocení.

7. Výsledky a diskuse

7.1. Plasmonické nanočástice stříbra

Anizotropní nanočástice stříbra byly připraveny dvoustupňovou redukcí amoniakálního komplexu kationtu stříbra $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. V prvním stupni bylo použito silné redukční činidlo – tetrahydridoboritan sodný NaBH_4 , které vytvořilo malé zárodky nanočástic stříbra. Poté ve druhém stupni byl jako redukční činidlo použitý peroxid vodíku H_2O_2 , který vyredukoval stříbrné kationty na malých zárodcích, což mělo za následek vznik anizotropních nanočástic stříbra.

Pro tuto bakalářskou práci byly připraveny 2 řady syntéz disperzí založeny na této dvoustupňové redukcí, které mají demonstrovat závislost charakteristik na koncentraci jednotlivých reakčních komponentů. Tyto charakteristiky jsou především tvar a velikost, které souvisí s dalšími vlastnostmi jako je absorbance o určitých vlnových délkách či hodnotě zeta potenciálu. Konkrétně jde o řady, kde se varioval přídavek tetrahydridoboritanu sodného (NaBH_4) a přídavek amoniaku (NH_3). Díky tomuto lze připravit konkrétní disperze pro požadovanou aplikaci jenom na základě změn koncentrací těchto dvou látek.

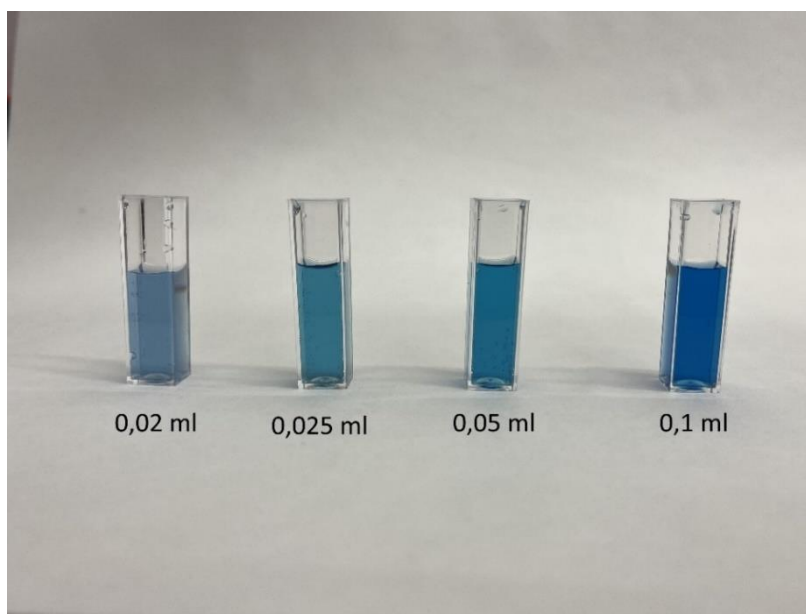
Pro tyto řady příprav byla specificky zvolena koncentrace a typ stabilizační látky. Jako nejvhodnější stabilizační činidlo byl zvolen citrát trisodný (dále jen TSC), který elektrostaticky stabilizoval stříbrné nanočástice, tedy vytvořil na nanočásticích záporný povrchový náboj, který vzájemným odpuzováním nanočástic zabránil agregaci. Mimo to mají jeho roztoky mírně zásadité pH.

7.1.1. Příprava plasmonických nanočástic na základě variace přídavku NaBH_4

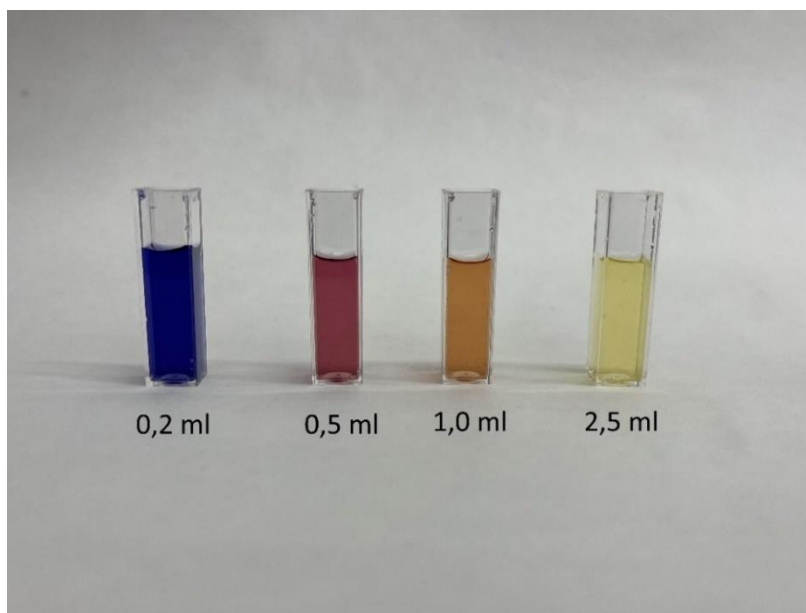
Při přípravách jednotlivých disperzí byl variován přídavek prvního redukčního činidla NaBH_4 , což mělo za následek různé velikosti a morfologie nanočástic stříbra. Kvůli těmto rozdílům bylo dosaženo pokrytí velké části UV/VIS spektra (od 400 nm až 730 nm), tedy podařilo se získat širokou paletu barev – od modré, přes červenou, oranžovou až po žlutou. Absorpční maxima se s přídavkem NaBH_4 postupně snižovala. Celkově bylo připraveno 8 disperzí, pro lepší viditelnost barev byly pro fotografie použity 10x naředěny disperze (obr. 17 a obr. 18).

Daná koncentrace NH_3 zde byla vybrána z poznatků z druhého typu přípravy, která je shrnutá v následující podkapitole. U všech disperzí byla hodnota *pH* v rozmezí 10,2

až 10,3. Tato koncentrace NH_3 byla také vybrána vzhledem k specifickým absorpčním maxim, které budou zmíněny v následujících odstavcích a byly nejlepšími variantami pro následné fototermální testování (pro vlnové délky laserů). V neposlední řadě při této koncentraci NH_3 byla pozorována vysoká stabilita, disperze dokázaly uchovat svoje vlastnosti pouze s menšími změnami i v rámci několika měsíců.



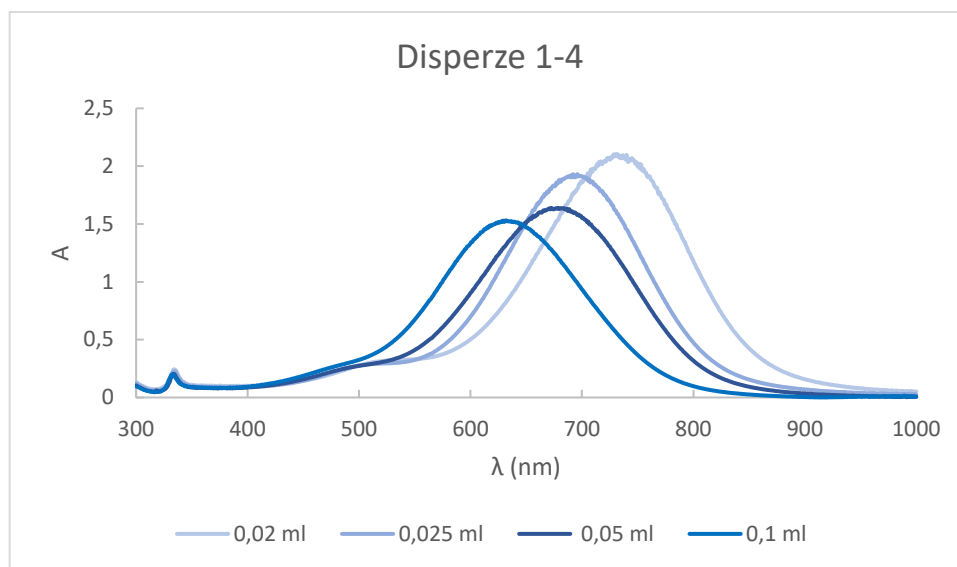
Obrázek 17: Disperze 1-4 a použité množství NaBH_4 .



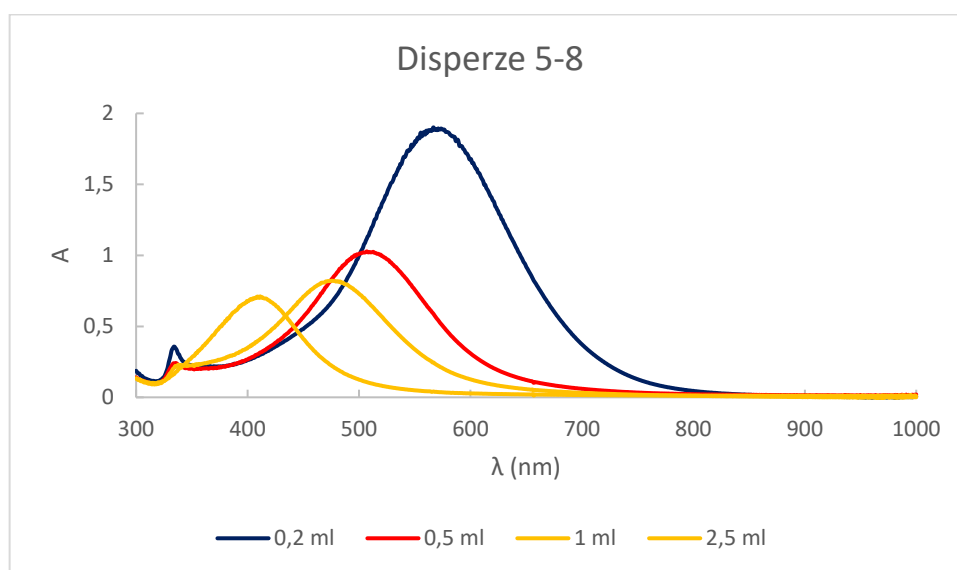
Obrázek 18: Disperze 5-8 a použité množství NaBH_4 .

Odlišné zbarvení disperzí na obrázcích 17 a 18 značí odlišnou absorpci zapříčiněnou různými tvary, kterou můžeme pozorovat na absorpčních spektrech

jednotlivých disperzí (grafy na obrázcích 19 a 20, pro větší přehlednost rozděleno právě do dvou grafů).



Obrázek 19: Absorpční spektra disperzí 1-4 a použité množství NaBH₄.



Obrázek 20: Absorpční spektra disperzí 5-8 a použité množství NaBH₄.

Jak si lze všimnout, všechna spektra disperzí mají pouze jedno hlavní absorpční maximum, které se s přidavkem NaBH₄ postupně snižuje a posouvá do nižších vlnových délek. Všechny absorpční maxima byly shrnuty do tabulky číslo 5.

Tabulka číslo 5: Závislost absorpčních maxim jednotlivých disperzí v závislosti na přídatku NaBH_4 .

Číslo disperze	NaBH_4 ($c=2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) [ml]	A_{max} [nm]
1.	0,02	730
2.	0,025	696
3.	0,05	670
4.	0,1	632
5.	0,2	567
6.	0,5	507
7.	1	475
8.	2,5	413

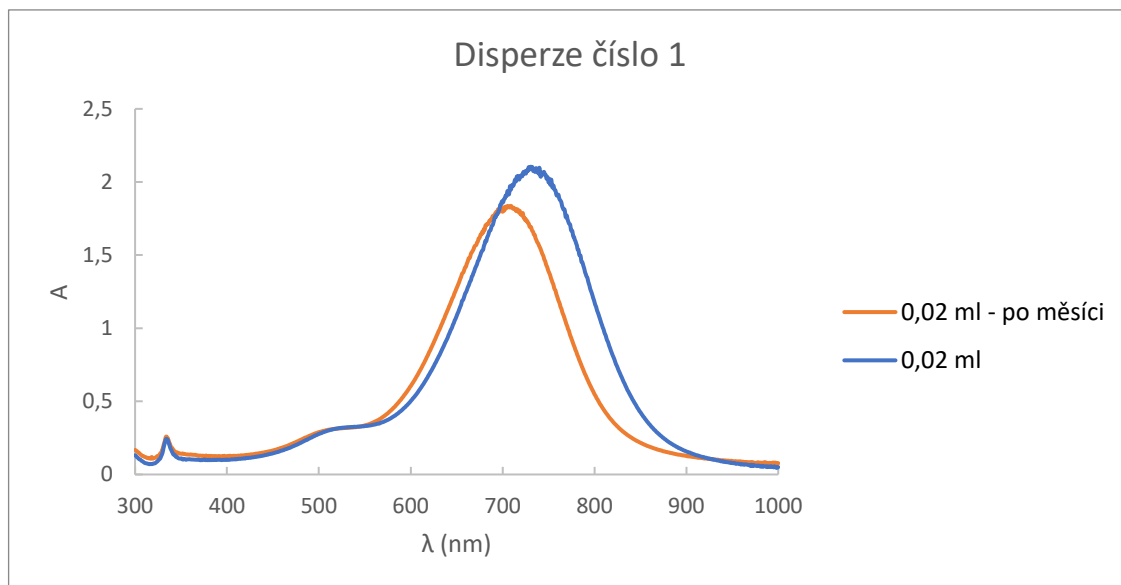
Pro následnou adsorpci nanočástic na povrch mikrotitračních destiček – na kladně nabitě PDDA, bylo žádoucí změřit zeta potenciály. Jednotlivé zeta potenciály byly shrnuty do tabulky číslo 6. Všechny hodnoty zeta potenciálů vykazovaly vysokou zápornou hodnotu. Díky tomu tedy bylo vhodné použít tyto nanočástice pro následnou aplikaci na mikrotitrační destičky. Zároveň tyto hodnoty mohou naznačovat vyšší stabilitu disperzí.

Tabulka číslo 6: Zeta potenciály jednotlivých disperzí v závislosti na přídatku NaBH_4 .

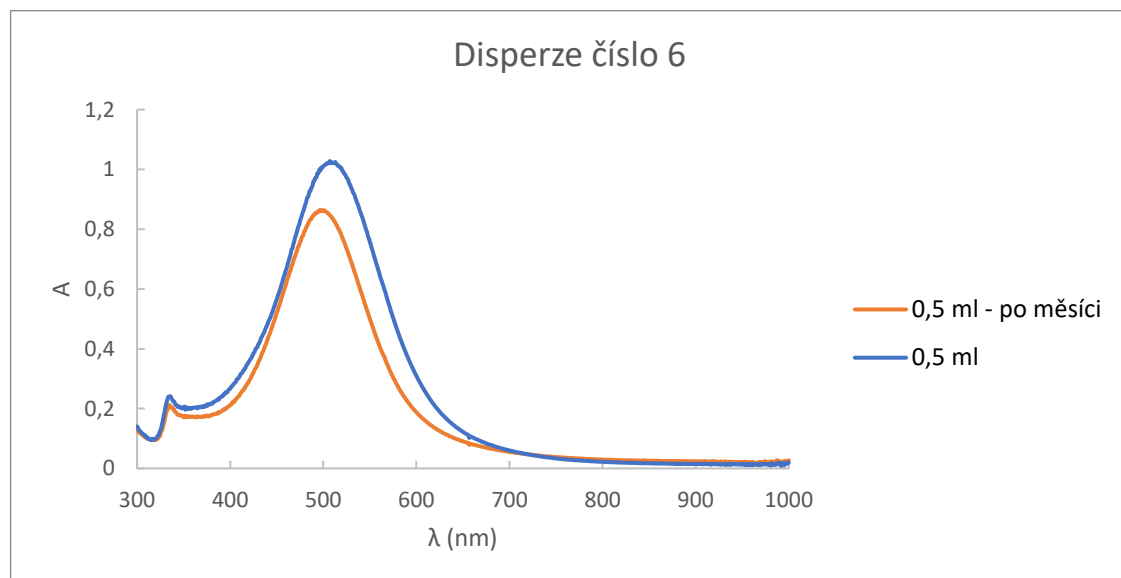
Číslo disperze	NaBH_4 ($c=2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) [ml]	Zeta potenciál [mV]
1.	0,02	-39,1
2.	0,025	-40,7
3.	0,05	-37,5
4.	0,1	-33,0
5.	0,2	-28,3
6.	0,5	-28,0
7.	1	-29,0
8.	2,5	-34,4

Stabilita nanočástic byla stanovována pomocí absorpčních spekter. Pro ukázkou (na obr. 21 až 23) jsou zde uvedeny změny ve spektrech, které byly měřeny s rozdílem jednoho měsíce od přípravy, a to u disperzí číslo 1, 6 a 8. Lze pozorovat změny v posunu

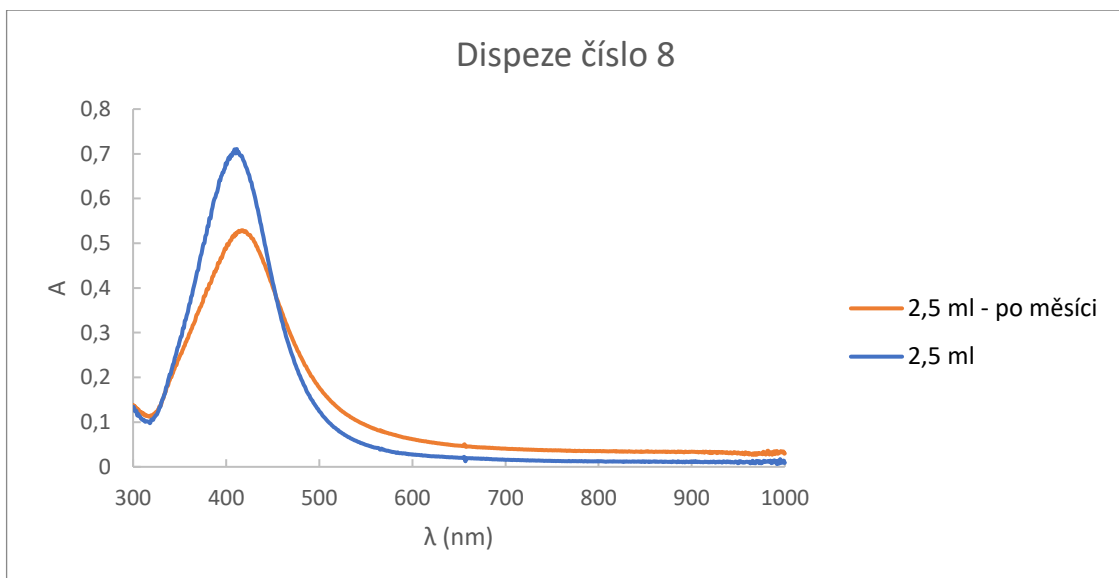
absorpčních píků o pár jednotek až nižších desítek nanometrů. Toto může být způsobeno částečnou rekrystalizací či Ostwaldovým zráním disperze.



Obrázek 21: Absorpční spektra disperze číslo 1 po přípravě a po měsíci od přípravy.
(v legendě jednotlivé přídavky NaBH_4).



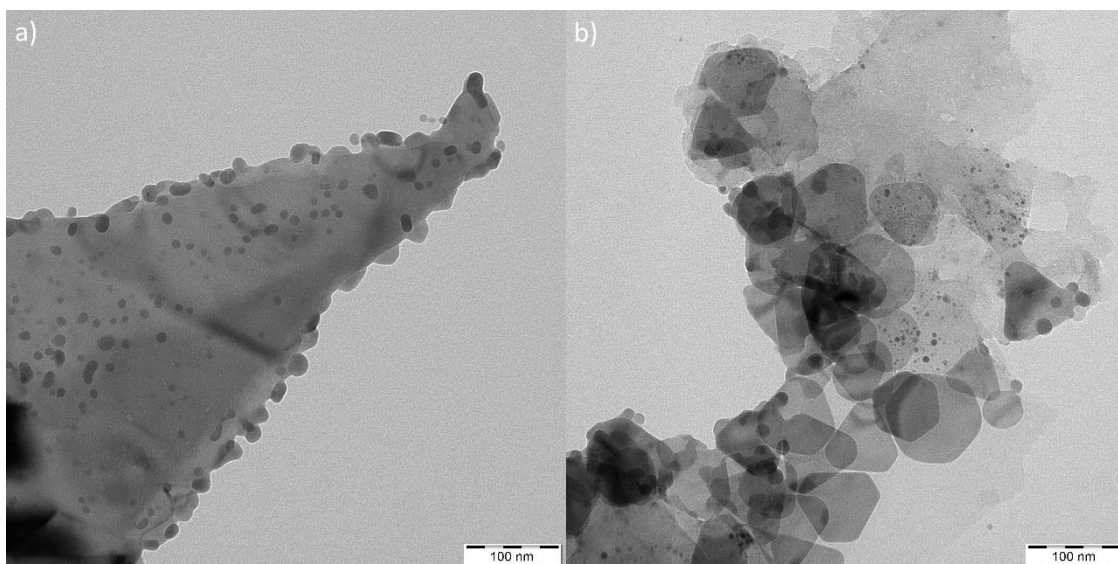
Obrázek 22: Absorpční spektra disperze číslo 6 po přípravě a po měsíci od přípravy.
(v legendě jednotlivé přídavky NaBH_4).



*Obrázek 23: Absorpční spektra disperze číslo 8 po přípravě a po měsíci od přípravy.
(v legendě jednotlivé přídávky NaBH_4)*

Rozdílný tvar nanočástic byl pravděpodobně způsobený tím, že s vyšším přídávkem NaBH_4 docházelo k redukci vyššího množství stříbrných kationtů, tedy vznikalo v prvním redukčním stupni více sférických nanočástic – zárodků, které byly také zároveň s vyšším přídávkem NaBH_4 větší, což mělo za následek to, že při sekundární redukci nebylo možné vyredukovat dostatečné množství stříbrných kationtů pro vznik jiných morfologií, protože většina kationtů již byla předtím zredukována.

To se potvrdilo pomocí TEM snímku. Na obrázku 24a lze vidět jednotlivé sférické zárodky vytvořené prvním krokem redukce pomocí NaBH_4 . Ty byly následně redukovány pomocí H_2O_2 do větších útvarů (obr. 24b). Konkrétně si lze povšimnout nanočástic ve tvaru trojúhelníku, hexagonů a jiných mnohoúhelníků, jejichž velikosti se pohybovaly okolo 100 nm.

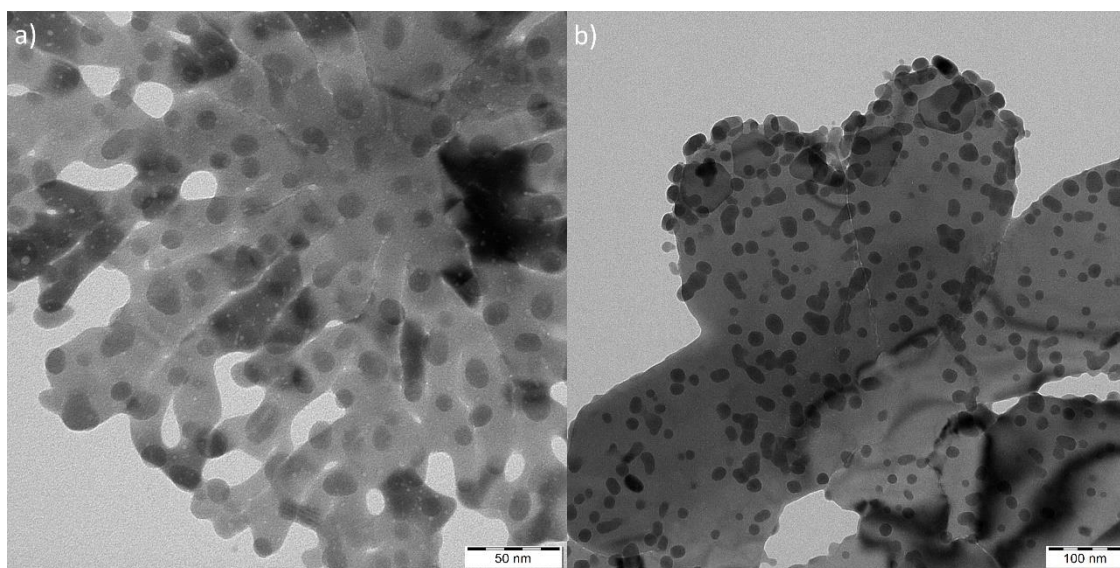


Obrázek 24: TEM snímky disperze AgNPs číslo 1:

a) snímek po redukcí pomocí NaBH_4 (první krok), měřítko 100 nm;

b) snímek po redukcí pomocí H_2O_2 (druhý krok), měřítko 100 nm.

Při použití většího přídavku NaBH_4 se těchto zárodků vytvořilo více (obr. 25a), proto už zde nebylo dostatek Ag^+ iontů pro následnou redukcí do větších ucelených celků. Sice vzniklo pár trojúhelníků, ale větší množství byly už spíše nepravidelné narostlé útvary, či trochu zvětšené zárodky, které se taktéž částečně spojily (obr. 25b).

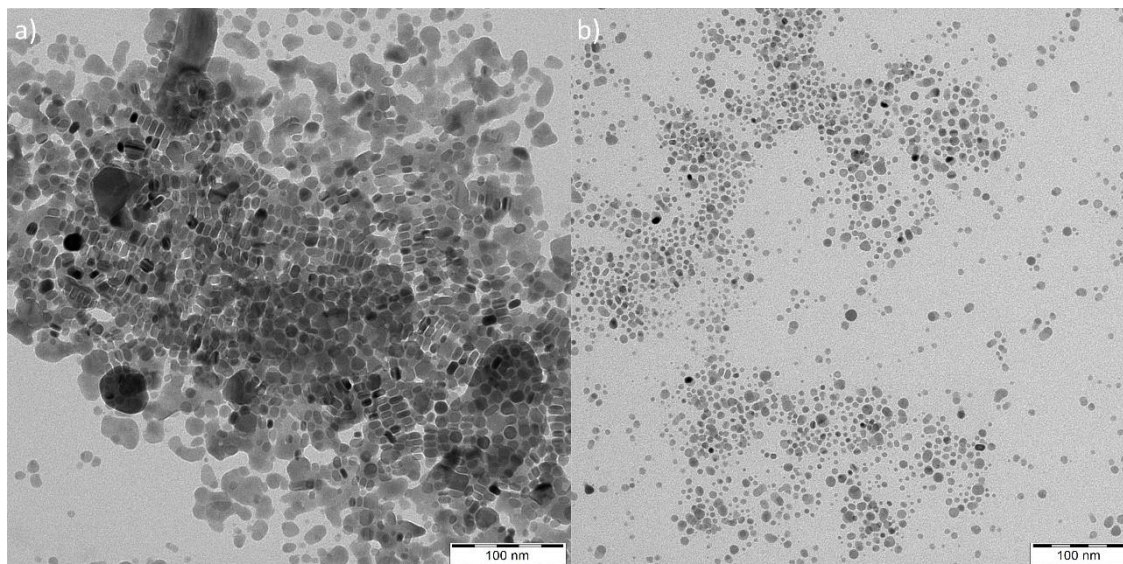


Obrázek 25: TEM snímky disperze AgNPs číslo 5:

a) snímek po redukcí pomocí NaBH_4 (první krok), měřítko 50 nm;

b) snímek po redukcí pomocí H_2O_2 (druhý krok), měřítko 100 nm.

U poslední disperze došlo k zredukování většiny Ag^+ iontů v prvním kroku redukce pomocí NaBH_4 , tedy následné použití H_2O_2 nemělo už prakticky vliv na růst či změnu morfologie (obr. 26a a 26b).

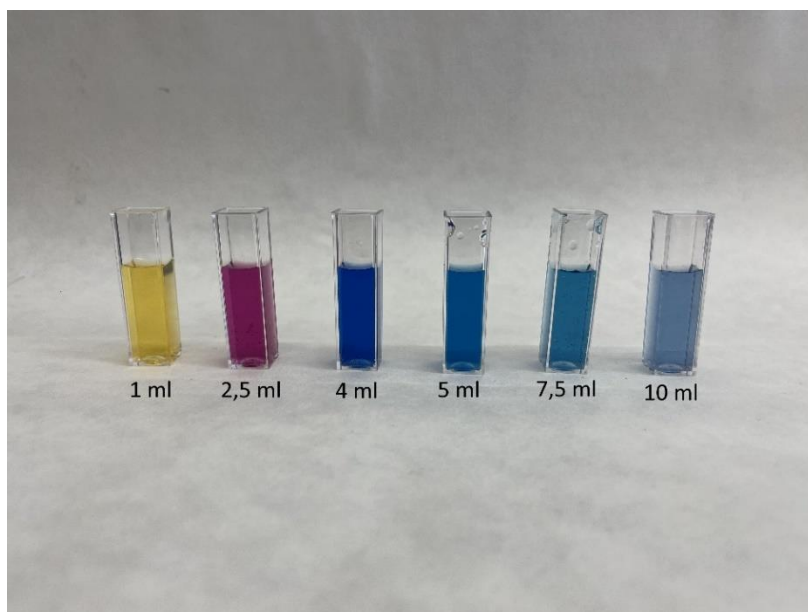


Obrázek 26: TEM snímky disperze AgNPs číslo 8:

- a) snímek po redukci pomocí NaBH_4 (první krok), měřítko 100 nm;*
- b) snímek po redukci pomocí H_2O_2 (druhý krok), měřítko 100 nm.*

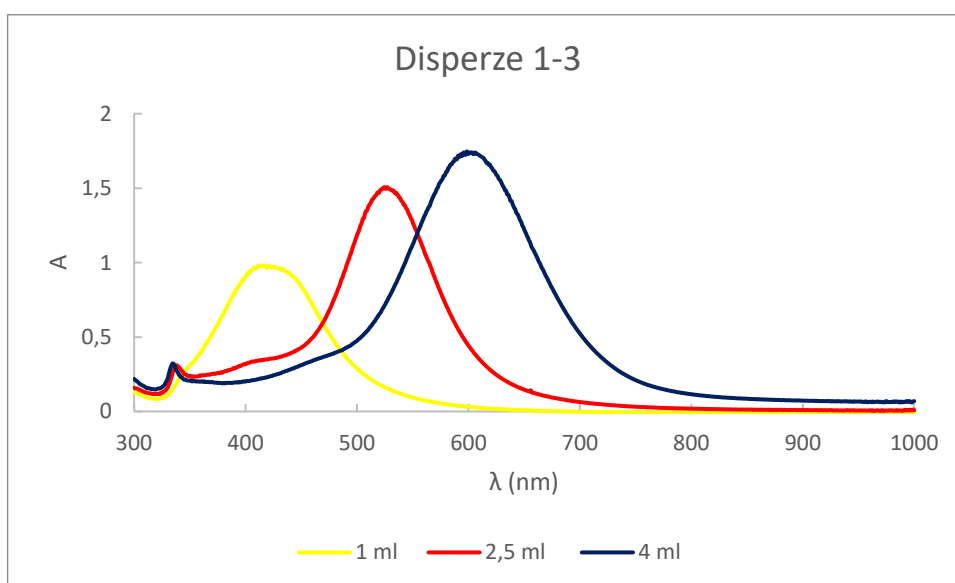
7.1.2. Příprava nanočástic stříbra na základě variace přidavku NH_3

Při této přípravě stříbrných nanočástic byl variován přidavek amoniaku NH_3 , což mělo stejně jak u předešlé přípravy za následek různé velikosti a morfologie nanočástic stříbra. Kvůli těmto rozdílům bylo dosaženo pokrytí velké části UV/VIS spektra (od 400 nm až 780 nm), opět se tedy podařilo se získat velkou paletu barev disperzí nanočástic stříbra – od žluté, přes fialovou až po mnoho odstínů modré. Celkově bylo připraveno 6 disperzí, pro lepší viditelnost barev byly pro fotografie použity 10x naředěny disperze (obr. 27).

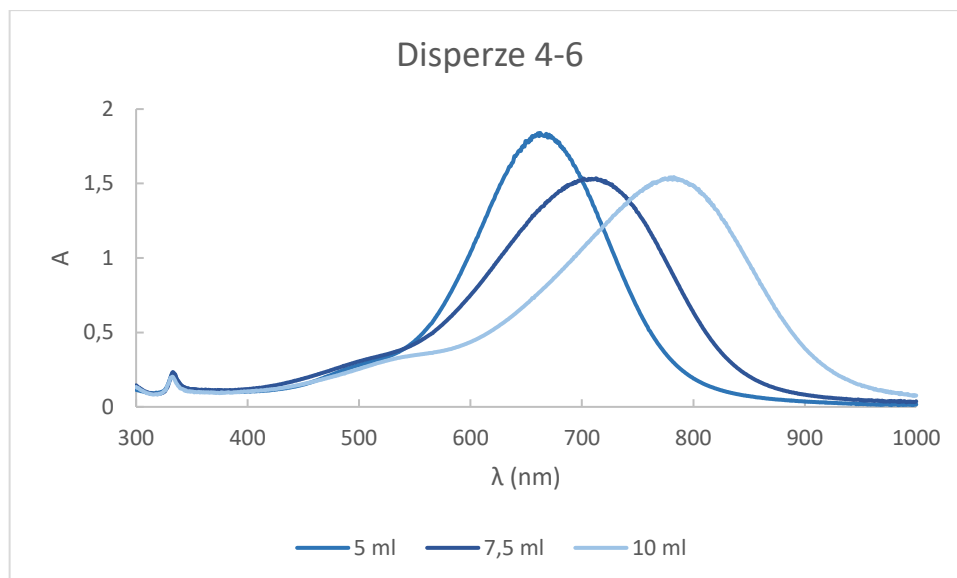


Obrázek 27: Disperze 1 až 6 a použité množství NH_3 .

Odlišné zbarvení disperzí na obrázku 27 značí odlišnou absorpci zapříčiněnou různými tvary, kterou můžeme pozorovat na absorpčních spektrech jednotlivých disperzí. (obr. 28 a 29). Absorpční maxima se přidavkem NH_3 postupně zvyšovala.



Obrázek 28: Absorpční spektra disperzí 1-3 a použité množství NH_3 .



Obrázek 29: Absorpční spektra disperzí 4-6 a použité množství NH_3 .

Můžeme si zde všimnout, že podobně jak u předešlé přípravy, mají disperze pouze jedno hlavní absorpční maximum, které se s přidávkem NH_3 postupně posouvá k vyšším hodnotám vlnových délek. Všechny absorpční maxima byly shrnuty do tabulky číslo 7, kde byly také shrnuty hodnoty pH jednotlivých disperzí nanočástic. To se s přidávkem NH_3 zvyšovalo.

Tabulka číslo 7: Závislost absorpčních maxim a hodnot pH jednotlivých disperzí v závislosti na přidávku NH_3 .

Číslo vzorku	NH_3 (c=0,1M) [ml]	pH	A_{max}
1.	1	9,5	417,5
2.	2,5	9,91	524
3.	4	10,1	598
4.	5	10,19	662
5.	7,5	10,39	701,5
6.	10	10,53	780

Byly změřeny jednotlivé zeta potenciály, které jsou shrnuty v tabulce číslo 8. Všechny hodnoty zeta potenciálů vykazovaly, jak u předešlé řady, vysokou zápornou hodnotu.

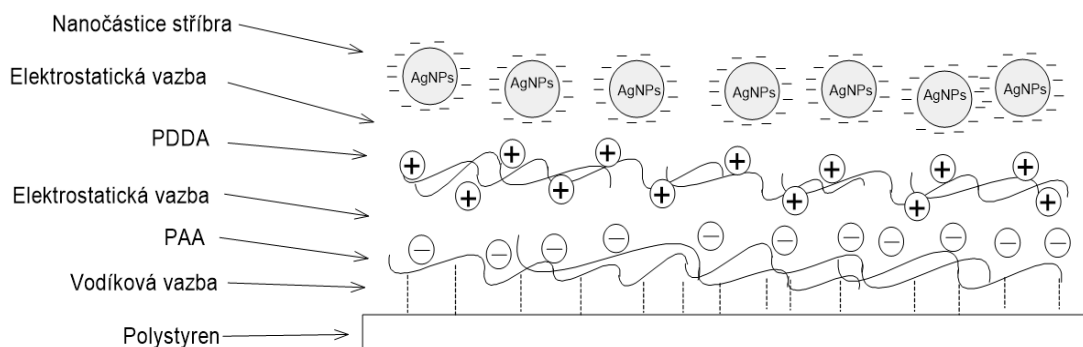
Tabulka číslo 8: Zeta potenciály jednotlivých disperzí v závislosti na přídatku NH_3

Číslo vzorku	NH_3 (c=0,1M) [ml]	Zeta potenciál (mV)
1.	1	-37,9
2.	2,5	-36,6
3.	4	-37,7
4.	5	-37,1
5.	7,5	-37,1
6.	10	-35,9

Obě řady měly tedy demonstrovat, jak se s koncentracemi vybraných reakčních komponentů mění charakteristické vlastnosti nanočástic stříbra. Kombinovat poznatky z obou těchto řad může přinést větší variabilitu pro jednotlivé aplikace, především u fototermální terapie, jelikož je žádoucí posouvat absorpční maximum do vyšších vlnových délek, až blízkých IR. Zároveň i u jiných aplikací, kdy je například potřeba mít nanočástice s konkrétním absorpčním maximem.

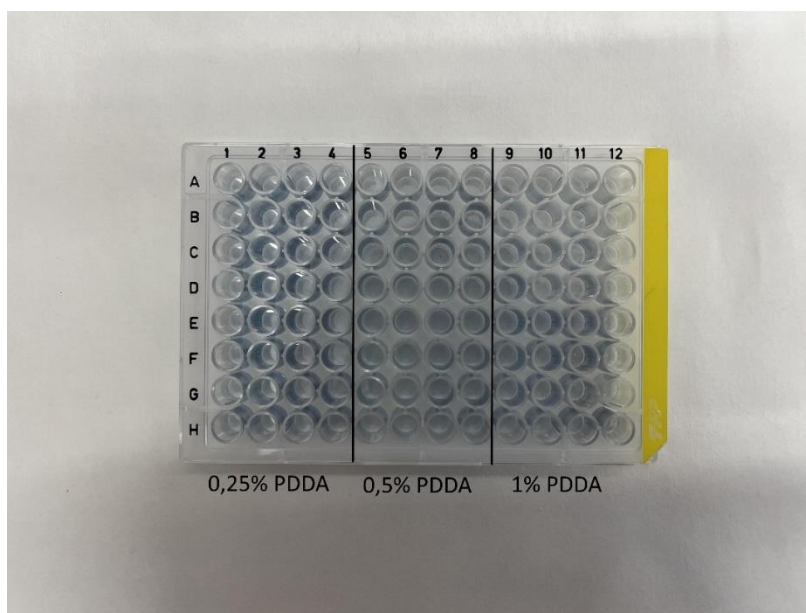
7.2. Modifikace mikrotitračních destiček

Vrstvy nanočástic stříbra na mikrotitračních destičkách byly připraveny pomocí samoorganizace metodou vrstvy po vrstvě Layer-By-Layer. Ta využívá adsorpci a vznik nekovalentních vazeb mezi jednotlivými komponenty (polyelektrolyty, či nanočástic), především působením elektrostatických sil nebo pomocí vodíkové vazby. Polystyrenová destička nemá povrchový náboj, proto byla v prvním kroku použita kyselina polyakrylová (PAA), která se na polystyrén váže pomocí vodíkové vazby. Tímto byla vytvořena vrstva PAA s negativním nábojem, na který byl posléze navázán kladně nabitý poly(diallyldimethylammonium chloridu) (PDDA). Tímto byla vytvořena kladná vrstva, na kterou byly navázány nanočástice stříbra, které mají záporný zeta potenciál.



Obrázek 30: Ilustrace jednotlivých vrstev a forma vazby mezi nimi (obrázek autor).

PDDA jako kladný polyelektrolyt byl vybrán jako nejvhodnější alternativa proti předem používanému chitosanu, jelikož u něj docházelo u tohoto typu nanočástic stříbra ke špatné adsorpci částic, kdy vznikala velmi nehomogenní vrstva. Byly otestovány roztoky PDDA o 1%, 0,5% a 0,25% hmotnostních koncentracích (obr. 31), přičemž jako nejlepší varianta, která adsorbovala nejvíce nanočástic a zároveň vytvořila velmi homogenní vrstvu, byl roztok PDDA o koncentraci 0,25 %. Byly taktéž vyzkoušeny nižší koncentrace, ty ovšem špatně dokázaly adsorbovat nanočástice stříbra, přičemž nevznikla prakticky žádná vrstva.

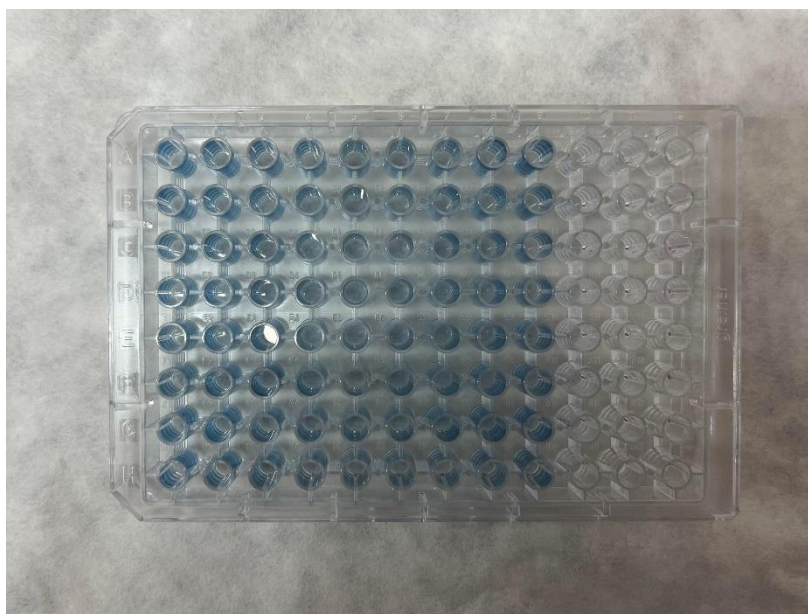


Obrázek 31: Rozdíl adsorbovaných nanočástic stříbra na PDDA o 0,25%, 0,5% a 1% (w/w).

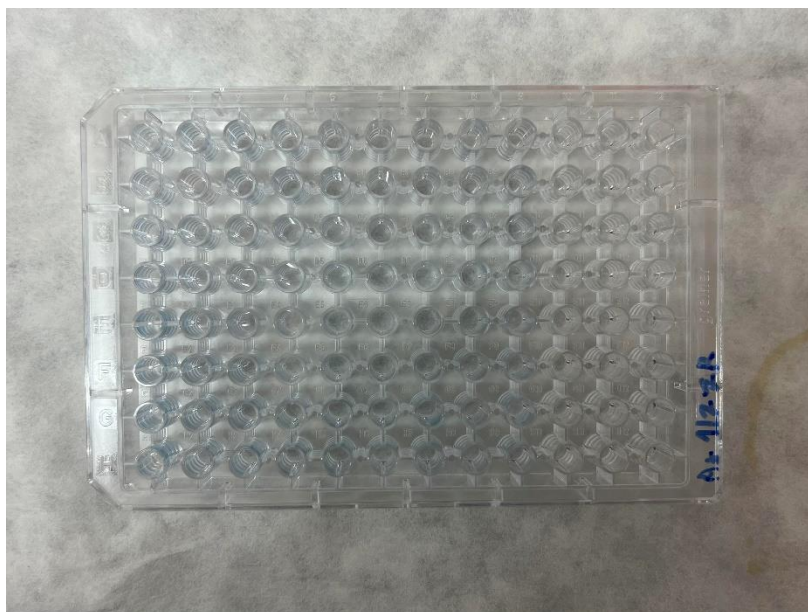
Pro aplikaci na mikrotitrační destičku byla vybrána disperze nanočástic stříbra, která byla připravena dvoustupňovou redukcí amoniakálního komplexu stříbrného kationtu

(příprava z kapitoly 5.1.). Pro testování byla vybrána disperze číslo 3, která byla připravená pomocí přídavku NaBH_4 o objemu 0,05 ml. Tato disperze byla zvolena, protože její absorpční maximum bylo o vlnové délce 665 nm (obr. 34), což nejlépe korespondovalo s využitým laserem o vlnové délce 660 nm pro testování fototermální aktivity, ke které se dostaneme v následující kapitole. Zároveň bylo tuto disperzi vhodné použít i díky zápornému zeta potenciálu.

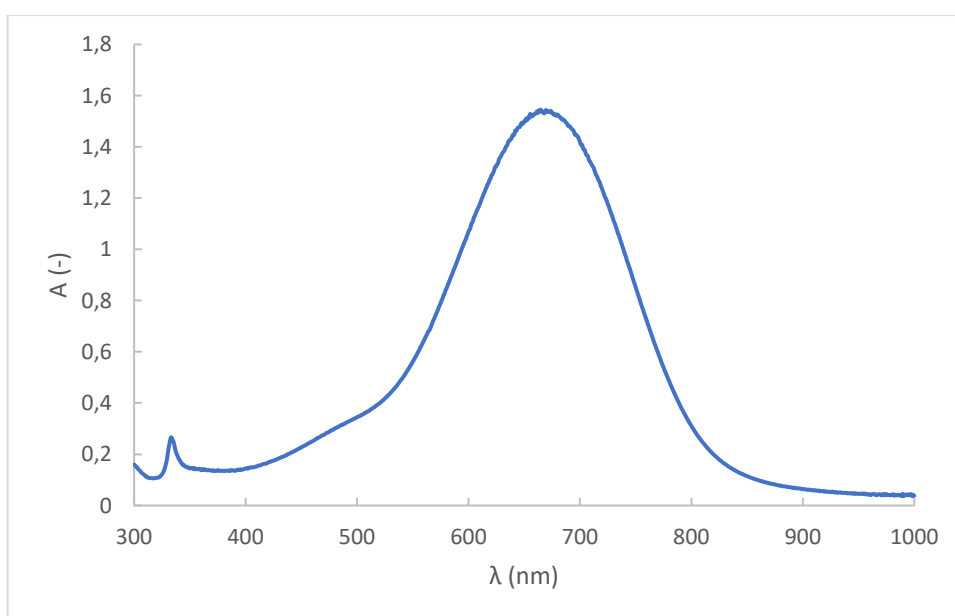
Byly otestovány dvě koncentrace disperzí nanočástic stříbra pro adsorpci na mikrotitrační destičku. Šlo o nezředěnou disperzi a zředěnou disperzi na poloviční koncentraci stříbra. Použití různých koncentrací mělo za následek odlišné množství adsorbovaných nanočástic stříbra, kdy při použití zředěné disperze se adsorbovalo výrazně menší množství (obr. 33) než při použití nezředěné disperze (obr. 32).



Obrázek 32: Mikrotitrační destička připravená pomocí nezředěné disperze nanočástic stříbra (disperze číslo 3), použitá pro následné testování fototermální aktivity.



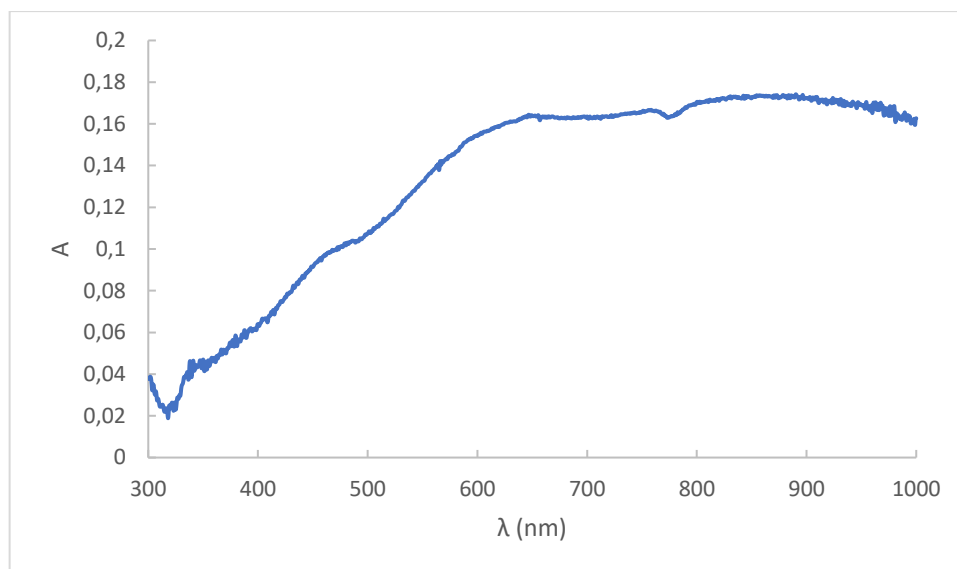
Obrázek 33: Mikrotitrační destička připravená pomocí zředěné disperze na poloviční koncentraci nanočástic stříbra (disperze 3), použitá pro následné testování fototermální aktivity.



Obrázek 34: Absorpční spektrum použité disperze nanočástic stříbra (číslo 3 z řady variace NaBH_4) s absorpčním maximem o vlnové délce 665 nm.

Před samotným testováním fototermální aktivity bylo žádoucí změřit, zdali se absorpční spektrum nanočástic stříbra nezměnilo po adsorbování na povrch mikrotitračních destiček. Jak si lze na obrázku 35 všimnout, absorpční spektrum se

výrazně změnilo, ovšem nedošlo k nežádoucímu posunu absorpce v okolí vlnové délky 660 nm. Tedy samotná adsorpce nanočástic na povrchu mikrotitrační destičky neměla nežádoucí efekt pro následné testy fototermální aktivity.

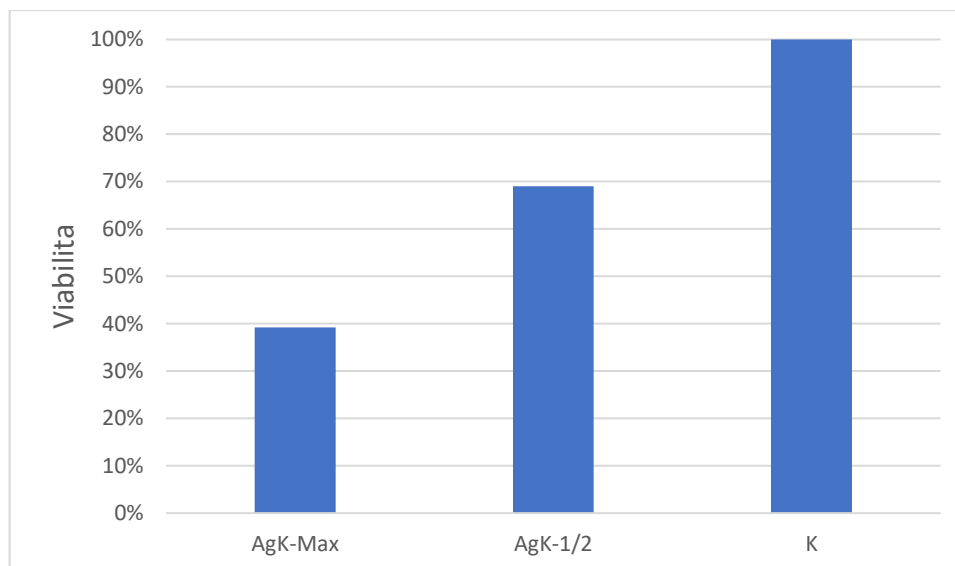


Obrázek 35: Absorpční spektrum adsorbovaných nanočástic stříbra (disperze 3) na mikrotitrační destičce.

7.3. Fototermální terapie

Fototermální terapie za využití plasmonických nanočástic stříbra byla testována na buňkách karcinomu děložního čípku HeLa, které byly vykultivovány v DMEM médiu v termoboxu (37 °C) po dobu 24 hodin. Následně byly ozářeny laserem o vlnové délce 660 nm a o energiích 5, 10, 15 a 20 J. Po ozáření byl přidán DMEM a po 24 hodinách byl proveden MTT test – viability buněk.

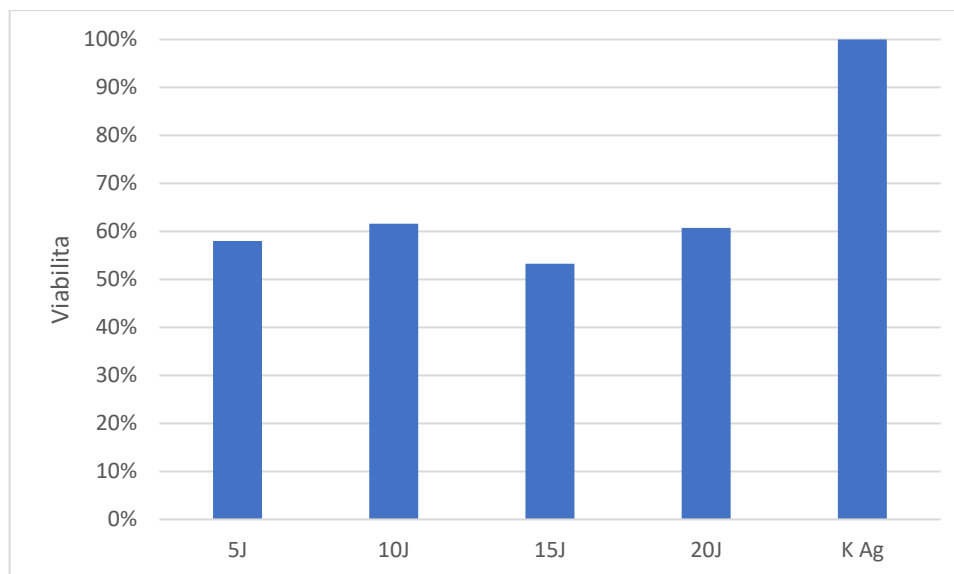
Před samotným testováním fototermální aktivity bylo žádoucí otestovat toxicitu deponovaných nanočástic stříbra u obou destiček. Na obrázku 36 jsou v grafu shrnuté jednotlivé viability buněk v jamkách s nanočásticemi stříbra u připravených destiček, tedy u destičky připravenou s nezředěnou disperzí AgNPs (značená „AgK-Max“) a u destičky připravenou pomocí zředěné disperze AgNPs (značená „AgK-1/2“) proti kontrolnímu vzorku viability buněk (značenou „K“). Ten představuje viability buněk v jamkách, ve kterých nebyla provedena adsorpce nanočástic stříbra (zde taktéž bylo vyměněno médium před MTT testováním).



Obrázek 36: Srovnání viability buněk HeLa v jamkách destiček připravených pomocí nezředěnou disperzí AgNPs (AgK-Max) a pomocí zředěné disperze na poloviční koncentraci stříbra (AgK-1/2) s kontrolou – jamek bez nanočástic (K)

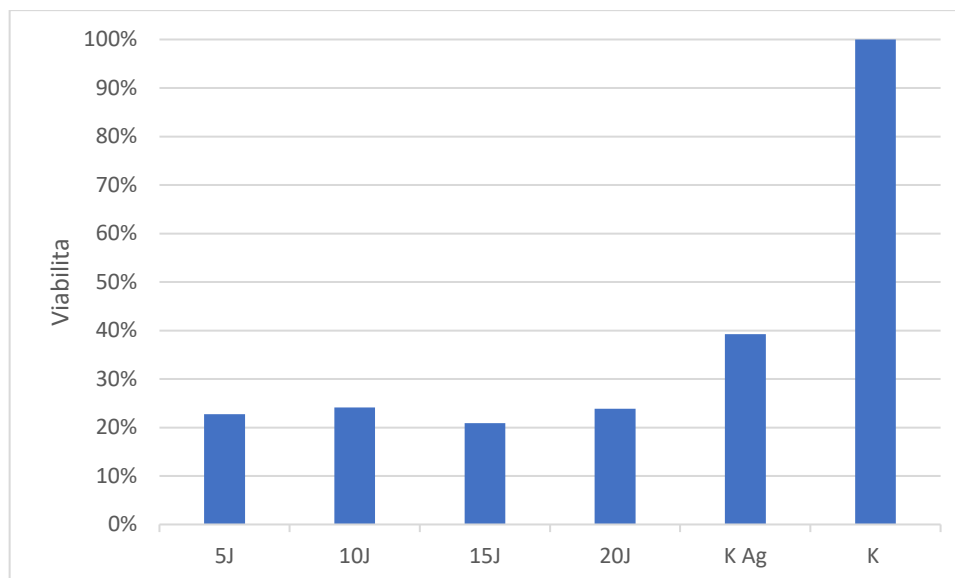
Z grafu je patrné, že u destičky, která byla připravena pomocí nezředěné disperze AgNPs (tedy se adsorbovalo na povrch více nanočástic), docházelo k výraznému poklesu viability buněk. Viabilita se zde snížila na 39,21 %. Naopak u destičky připravené pomocí zředěné disperze AgNPs nedocházelo k tak razantnímu poklesu viability buněk, tedy tato koncentrace je pro následné testování vhodnější, kdy při nižších koncentracích stříbra dokážou buňky na deskách růst lépe. Viabilita se zde snížila na 69 %.

Jak již bylo zmíněno, pro testování fototermální aktivity byly využity nanočástice stříbra (konkrétně nanočástice stříbra disperze číslo 3 z kapitola 4.1.). K ozáření byl použit laser o vlnové délce 660 nm, pomocí něhož byla předaná energie 5, 10, 15 a 20 J. Jako kontrolní vzorek (K Ag) jsou zde jamky, na které bylo adsorbováno stříbro, ale nebyly ozářeny laserem. Jako první se testovala destička, která byla připravena pomocí nezředěné disperze stříbra. Na obrázku 37 můžeme vidět jednotlivé výsledné hodnoty viability buněk HeLa po ozáření laserem s předanou konkrétní energií u této destičky. Již u nízkých energiích dochází k razantnímu poklesu – při 5 J klesla viabilita na 57,98 %, při 10 J klesla viabilita buněk na 61,6 %. Při hodnotách 15 J byla naměřená viabilita 60,78 % a při 20 J 60,78 %.



Obrázek 37: Viabilita buněk HeLa po ozáření laserem 660 nm s dávkami energie 5, 10, 15, 20 J na kultivační destičce připravenou pomocí nezředitelné disperze AgNPs; „K Ag“ představuje kontrolu (neozářené jamky s nanočásticemi).

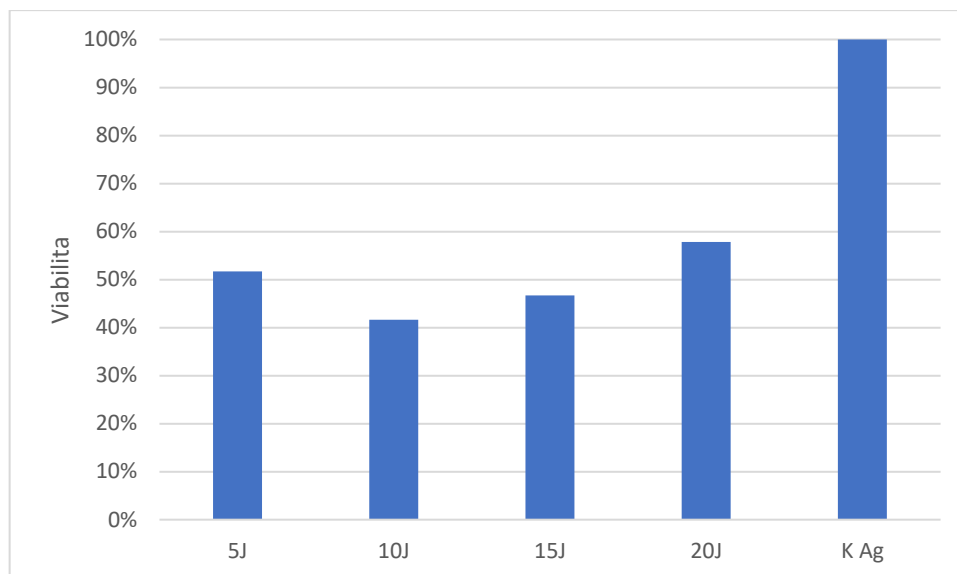
Není zde vidět ovšem předpokládaný trend, že se zvyšující se dávkou ozáření by výsledná viabilita byla nižší než u nižších energií. Samotná finální viabilita se zde už příliš nemění. To může být zapříčiněno několika důvody. Jedním z nich je, že samotná koncentrace adsorbovaných nanočástic stříbra byla už příliš toxická, a tedy již většina buněk byla usmrcena před samotným ozářením, kdy již malé množství stačilo k zabití zbytku buněk. Pro lepší porovnání byly v obrázku číslo 38 shrnuté jednotlivé viability buněk vztahované ke kontrolnímu vzorku bez nanočástic stříbra. Lze zde vidět, že již samotné nanočástice snížily viabilitu přes 60 % a samotné viability se příliš nesnížily se samotným ozářením. Dalším důvodem může být, že již nízká dávka ozáření je pro buňky tak toxická, že s vyšší dávkou se již snížená viabilita nemění. To se také potvrdilo během samotného testování, kdy docházelo razantnímu úbytku již při nízkých dávkách energie (5 a 10 J). Bohužel tento výsledek zhoršil fakt, že při krajích jamek stále zůstávaly zdravé buňky, které poté při MTT testování způsobovaly fialové zabarvení, a tedy zvyšovaly naměřenou viabilitu. Prakticky by tedy měla být naměřená viability nižší.



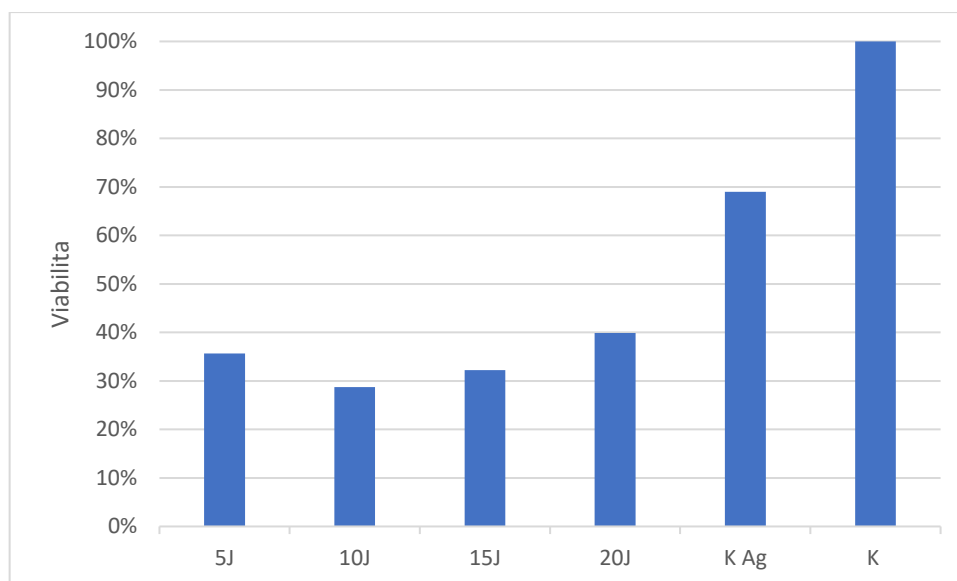
Obrázek 38: Viabilita buněk HeLa po ozáření laserem 660 nm s dávkami energie 5, 10, 15, 20 J na kultivační destičce připravenou pomocí nezředěné disperze AgNPs; „K Ag“ představuje neozářené jamky s nanočásticemi stříbra; „K“ představuje kontrolu (neozářené jamky bez nanočástic).

Jako druhá se testovala mikrotitrační destička, která byla připravena pomocí zředěné disperze na poloviční koncentraci stříbra. Zde se adsorbovalo méně nanočástic než u předešlé destičky. Samotná koncentrace adsorbovaných nanočástic tedy nebyla tak vysoká. I zde se testovaly všechny již zmíněné dávky energie (5, 10, 15 a 20 J). Jednotlivé výsledné viability HeLa buněk byly shrnuty do obrázku 39. I zde můžeme vidět již u nízkých energií, že dochází k razantnímu poklesu – při 5 J klesla viabilita na 51,73 %, při 10 J klesla viabilita buněk až na 41,63 %. Při hodnotách 15 J byla naměřená viabilita 46,69 % a při 20 J 57,84 %. Jako nejúčinnější dávka energie se prokázalo být 10 J. Opět zde nevidíme trend, že s vyšší dávkou energie bude klesat viabilita. Z tohoto můžeme předpokládat, že i zde byly již nízké dávky energie záření kritické, co se týče toxicity.

Samotné množství navázaných nanočástic nebylo tak účinné jako u předešlé destičky, co se týče celkového poklesu viability buněk. Ovšem když porovnáme pokles způsobený fototermálním efektem (nikoliv i toxickým působením samotných nanočástic stříbra – obr. 40), je toto adsorbované množství vhodnější.



Obrázek 39: Viabilita buněk HeLa po ozáření laserem 660 nm s dávkami energie 5, 10, 15, 20 J na kultivační destičce připravenou pomocí zředěné disperze AgNPs; „K Ag“ představuje kontrolu (neozářené jamky s nanočásticemi).



Obrázek 40: Viabilita buněk HeLa po ozáření laserem 660 nm s dávkami energie 5, 10, 15, 20 J na kultivační destičce připravenou pomocí zředěné disperze AgNPs; „K Ag“ představuje neozářené jamky s nanočásticemi stříbra; „K“ představuje kontrolu (neozářené jamky bez nanočástic).

Když porovnáme výsledné viability buněk na jednotlivých destičkách (shrnuty v tabulce číslo 9), tak byla účinnější destička, která byla připravena s poloviční koncentrací disperze nanočástic stříbra.

Tabulka číslo 9: Shrnutí viability buněk u jednotlivých destiček po ozáření laserem 660 nm s dávkami energie 5, 10, 15 a 20 J.

Energie	Destička (nezředěné AgNPs)	Destička (zředěné AgNPs)
5 J	57,98 %	51,73 %
10 J	61,60 %	41,63 %
15 J	53,28 %	46,69 %
20 J	60,78 %	57,84 %

Minimální viability se podařilo dosáhnout tedy u destičky připravené se zředěnou disperzí a při působení laseru 660 nm a energii 10 J, když porovnáváme viabilitu s kontrolní jamkou s vrstvou nanočástic. Proti kontrole bez vrstvy nanočástic stříbra se tedy dostáváme až k poklesu na 28,73 %.

IV. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo studium plasmonických nanočástic ušlechtilých kovů a příprava plasmonických nanočástic stříbra. Ty byly deponovány na mikrotitrační destičky pomocí metody samoorganizace vrstvy po vrstvě na základě elektrostatických interakcí mezi vrstvami nesoucí opačný náboj. Dále byl u nich testován jejich fototermální efekt pro fototermální terapii a studovány další možná biologická využití.

Plasmonické nanočástice stříbra byly připraveny pomocí dvoustupňové redukce amoniakálního komplexu stříbra $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, který byl připraven pomocí dusičnanu stříbrného AgNO_3 a amoniaku NH_3 . Pro první stupeň redukce bylo využito silné redukční činidlo tetrahydridoboritan sodný NaBH_4 a pro druhý stupeň byl využit peroxid vodíku H_2O_2 . Jako stabilizátor byl využit citrát trisodný (TSC). Celkově pro tuto práci byly připraveny 2 řady disperzí. V první řadě se měnil přídavek NaBH_4 , v druhé pak přídavek NH_3 . Variací těchto látek se podařilo dosáhnout různých morfologií a velikostí nanočástic, a tedy i zbarvení jednotlivých disperzí nanočástic stříbra. Tímto se podařilo řízeně pokrýt velkou část UV-VIS spektra. Jednotlivé disperze byly charakterizovány pomocí UV-VIS spektrofotometru, u všech byl kvůli následné depozici na mikrotitrační destičky změřen zeta potenciál. Všechny hodnoty zeta potenciálu vykazovaly vysokou zápornou hodnotu, proto bylo vhodné je pro depozici použít. Taktéž byly charakterizovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) pro přesnější zjištění velikostí a morfologií.

K depozici nanočástic stříbra na mikrotitrační destičky byla využita metoda samoorganizace (self-assembly) vrstvy po vrstvě (Layer-By-Layer). K tomuto byla využita kyselina polyakrylová (PAA), která vytvořila pomocí vodíkových vazeb záporně nabitou vrstvu na neutrálně nabitě polystyrenové destičce. Následně byl využit poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA), který pomocí elektrostatických vazeb vytvořil na vrstvě PAA kladně nabitou vrstvu. Nakonec na ní byly adsorbovány nanočástice stříbra také pomocí elektrostatické vazby. K tomuto byla využita nezředěná disperze nanočástic stříbra a zředěná disperze na poloviční koncentraci stříbra. Tímto byly vytvořené vrstvy o odlišných množstvích adsorbovaných nanočástic.

Na takto deponovaných mikrotitračních destičkách byla testována fototermální terapie na nádorových buňkách děložního čípku HeLa. Buňky HeLa byly kultivované v médiu DMEM. K ozáření jamek byl využit laser s vlnovou délkou záření 660 nm

a dávky energií 5, 10, 15 a 20 J. 24 hodin po ozařování byl proveden MTT test – test viability buněk. Prokázalo se, že již při nízké dávce energií (5 a 10 J), docházelo k výraznému poklesu viability buněk, a to až o polovinu. K největšímu poklesu viability docházelo při energii ozáření 10 J u destičky připravené pomocí 1x zředěné disperze. Zde byl zjištěn pokles viability až na 41,63 %. Tedy navzdory použití velmi malých energetických dávek jsou výsledky nadějně a v budoucnosti by mohla být fototermální terapie za využití nanočástic stříbra slibnou cestou v boji proti nádorovým onemocněním. K tomuto vede ovšem ještě dlouhá cesta. Zároveň bylo zjištěno, že množství nanočástic stříbra adsorbovaných na mikrotitrační destičce připravené pomocí nezředěné disperze prokazovalo vysokou toxicitu oproti destičce, kde bylo adsorbováno nanočástic méně. Proto v budoucím výzkumu by bylo vhodné určit ideální poměr koncentrace deponovaných nanočástic stříbra vzhledem k toxicitě a efektivní účinnosti jejich fototermálního efektu. Také by předmětem dalšího výzkumu mohlo být testování selektivnosti fototermální terapie za využití nanočástic stříbra vůči nádorovým buňkám a zdravým buňkám.

V. SUMMARY

The aim of this bachelor's thesis was to study plasmonic nanoparticles of noble metals and preparation of silver plasmonic nanoparticles. These were deposited on microtiter plates using the layer-by-layer self-assembly method. Furthermore, their photothermal effect was tested for photothermal therapy, and other potential biological applications were studied.

Silver nanoparticles were prepared using a two-step reduction of the silver ammonia complex $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, which was prepared from silver nitrate AgNO_3 and ammonia NH_3 . Sodium borohydride NaBH_4 was used as strong reducing agent for the first reduction step, and hydrogen peroxide H_2O_2 was utilized for the second reduction step. Trisodium citrate (TSC) was used as a stabilizer. In total, 2 series of dispersions were prepared for this work. In the first series, the addition of NaBH_4 was varied, and in the second series the addition of NH_3 was varied. By varying these substances, it was possible to achieve different morphologies and sizes of nanoparticles, and thus different colors were achieved. This managed to cover part of the UV-VIS spectrum in a controlled manner. Each dispersion was characterized using a UV-VIS spectrophotometer, and the zeta potential was measured for all dispersions to facilitate subsequent deposition onto microtiter plates. Since the zeta potential was highly negative for all dispersions, which were suitable for deposition. Additionally, dispersions were also characterized using transmission electron microscopy (TEM) for more accurate determination of size and morphology.

For the deposition of silver nanoparticles onto microtiter plates, the layer-by-layer self-assembly method was employed. Polyacrylic acid (PAA) was used for this purpose forming a negatively charged layer on the neutrally charged polystyrene plate through hydrogen bonding. Subsequently, poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) was utilized to create a positively charged layer on the PAA layer through electrostatic interactions. Finally, silver nanoparticles were adsorbed onto this layer using electrostatic interactions. Both undiluted and once-diluted dispersions of silver nanoparticles were used for this purpose, resulted in layers with different amounts of bound nanoparticles.

Microtiter plates deposited in this way were used to test photothermal therapy on HeLa cervical cancer cells. The HeLa cells were cultured in DMEM medium. The laser with a wavelength of 660 nm and energy doses of 5, 10, 15 and 20 J were used for irradiating the wells. 24 hours after the irradiation, an MTT test was performed to

determinate cell viability. It was found that even in low energy doses (5 and 10 J), there was a significant decrease in cell viability (up to a half). The greatest decrease in viability was observed at an energy dose of 10 J on a plate prepared using a 1x diluted dispersion, where viability was reduced to 41.63 %. Even though very low energy doses were used, the results are promising, and in the future, photothermal therapy utilizing silver nanoparticles could be a promising approach in the fight against cancer. However, there is still a long way to go before reaching that point. It was also found that the amount of silver nanoparticles absorbed on the microtiter plate that was prepared using an undiluted dispersion exhibited high toxicity compared to plates with fewer adsorbed nanoparticles. Therefore, it would be appropriate for future research to determine the ideal ratio of deposited silver nanoparticles concentration with respect to toxicity and the effective efficiency of their photothermal effect. Testing the selectivity of photothermal therapy using silver nanoparticles against cancer cells versus healthy cells could be a subject of further research.

VI. ZDROJE

1. Capek, I. *Noble Metal Nanoparticles: Preparation, Composite Nanostructures, Biodecoration and Collective Properties*. (Springer, Tokyo, 2017).
2. Rai, M., Ingle, A. P., Birla, S., Yadav, A. & Santos, C. A. D. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Critical Reviews in Microbiology* **42**, 696–719 (2016).
3. Mayer, K. M. & Hafner, J. H. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. *Chem. Rev.* **111**, 3828–3857 (2011).
4. Campos, A. *et al.* Plasmonic quantum size effects in silver nanoparticles are dominated by interfaces and local environments. *Nat. Phys.* **15**, 275–280 (2019).
5. Kim, M., Lee, J.-H. & Nam, J.-M. Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications. *Advanced Science* **6**, 1900471 (2019).
6. Kvítek, L. & Panáček, Aleš. *Základy koloidní chemie*. (Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2007).
7. Poole, C. P. & Owens, F. J. *Introduction to Nanotechnology*. (Wiley-Interscience, New York, 2003).
8. Kladeková, D. *VYBRANÉ KAPITOLY Z KOLOIDNEJ CHÉMIE*. vol. 2011 (Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH Prírodovedecká fakulta).
9. Pucek, R. & Kilianová, M. *Cvičení ze základů nanomateriálové chemie / Robert Pucek, Martina Kilianová*. (Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci).
10. Kvítek, L. *et al.* The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *J. Mater. Chem.* **15**, 1099–1105 (2005).
11. Baig, N., Kammakam, I. & Falath, W. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances* **2**, 1821–1871 (2021).
12. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. & Rizzolio, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* **25**, 112 (2019).
13. Gottschalk, C. W. Thomas Graham, 1805-1869. *Nephrology* **4**, 211–216 (1998).
14. Mekuye, B. & Abera, B. Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Select* **4**, 486–501 (2023).
15. Shandhiya, M., Balasundaram, J. & Saminathan, S. A comprehensive review on antibacterial analysis of natural extract-based metal and metal oxide nanoparticles. *Archives of Microbiology* **206**, (2024).

16. Novák, J. *et al.* *Fyzikální chemie - bakalářský a magisterský kurz*. 506 (VŠCHT, Praha, 2008).
17. Bartovská, L. & Šišková, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2005).
18. Atkins, P. W. & De Paula, J. *Fyzikální chemie*. (Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2013).
19. Vojuckij, S. *Kurs Koloidní Chemie*. (Praha, 1974).
20. Pouchlý, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. (Vydavatelství VŠCHT, Praha, 2008).
21. What is Tyndall effect? *BYJU'S* <https://byjus.com/question-answer/what-is-tyndall-effect/> (13.4.2024).
22. Hammond, J. L., Bhalla, N., Rafiee, S. D. & Estrela, P. Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries. *Biosensors* **4**, 172–188 (2014).
23. Hong, Y., Huh, Y.-M., Yoon, D. & Yang, J. Review Article Nanobiosensors Based on Localized Surface Plasmon Resonance for Biomarker Detection. *Journal of Nanomaterials* **759830**, (2013).
24. Sandu, T. Shape effects on localized surface plasmon resonances in metallic nanoparticles. *J Nanopart Res* **14**, 905 (2012).
25. Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668–677 (2003).
26. Adnan, N. N. M. *et al.* Effect of gold nanoparticle shapes for phototherapy and drug delivery. *Polym. Chem.* **7**, 2888–2903 (2016).
27. Gellé, A. *et al.* Applications of Plasmon-Enhanced Nanocatalysis to Organic Transformations. *Chem. Rev.* **120**, 986–1041 (2020).
28. Gellé, A. & Moores, A. Plasmonic nanoparticles: Photocatalysts with a bright future. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **15**, 60–66 (2019).
29. *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*. (Blackwell Pub, Oxford, UK ; Ames, Iowa, 2005).
30. Lunardi, C. N., Gomes, A. J., Rocha, F. S., De Tommaso, J. & Patience, G. S. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. *Can J Chem Eng* **99**, 627–639 (2021).
31. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **235**, 337–351 (2016).
32. Shyam, A., Chandran, S. & George, B. Plant mediated synthesis of AgNPs and its applications: an overview Plant mediated synthesis of AgNPs and its applications: an overview. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry* **51**, (2020).

33. Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H. & Kalaskar, M. G. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **53**, 101174 (2019).
34. Panáček, A. *et al.* Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B* **110**, 16248–16253 (2006).
35. Dhaka, A., Chand Mali, S., Sharma, S. & Trivedi, R. A review on biological synthesis of silver nanoparticles and their potential applications. *Results in Chemistry* **6**, 101108 (2023).
36. Ambrožová, J. Ř., Čiháková, P. & Škopová, V. STUDIUM BIOCIDNÍCH ÚČINKŮ NANOČÁSTIC STRĚBRA.
37. Panáček, A. *et al.* Polyacrylate-Assisted Size Control of Silver Nanoparticles and Their Catalytic Activity. *Chem. Mater.* **26**, 1332–1339 (2014).
38. Panáček, A. *et al.* Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotech* **13**, 65–71 (2018).
39. Shipunova, V. O. *et al.* Photothermal Therapy with HER2-Targeted Silver Nanoparticles Leading to Cancer Remission. *Pharmaceutics* **14**, 1013 (2022).
40. Ghobashy, M. *et al.* An overview of methods for production and detection of silver nanoparticles, with emphasis on their fate and toxicological effects on human, soil, and aquatic environment. *Nanotechnology Reviews* **10**, (2021).
41. AbuDalo, M. A., Al-Mheidat, I. R., Al-Shurafat, A. W., Grinham, C. & Oyanedel-Craver, V. Synthesis of silver nanoparticles using a modified Tollens' method in conjunction with phytochemicals and assessment of their antimicrobial activity. *PeerJ* **7**, e6413 (2019).
42. Shirtcliffe, N., Nickel, U. & Schneider, S. Reproducible Preparation of Silver Sols with Small Particle Size Using Borohydride Reduction: For Use as Nuclei for Preparation of Larger Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **211**, 122–129 (1999).
43. Nishimoto, M., Abe, S. & Yonezawa, T. Preparation of Ag nanoparticles using hydrogen peroxide as a reducing agent. *New J. Chem.* **42**, 14493–14501 (2018).
44. Velgosova, O., Mačák, L., Čižmárová, E. & Mára, V. Influence of Reagents on the Synthesis Process and Shape of Silver Nanoparticles. *Materials* **15**, 6829 (2022).
45. Parnklang, T. *et al.* Shape transformation of silver nanospheres to silver nanoplates induced by redox reaction of hydrogen peroxide. *Materials Chemistry and Physics* **153**, 127–134 (2015).
46. Daniel, M.-C. & Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **104**, 293–346 (2004).

47. Hammami, I., Alabdallah, N. M., jomaa, A. A. & kamoun, M. Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of King Saud University - Science* **33**, 101560 (2021).
48. Shamaila, S. *et al.* Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen. *Nanomaterials (Basel)* **6**, 71 (2016).
49. Zhan, X., Yan, J., Tang, H., Xia, D. & Lin, H. Antibacterial Properties of Gold Nanoparticles in the Modification of Medical Implants: A Systematic Review. *Pharmaceutics* **14**, 2654 (2022).
50. Pan, Y. *et al.* Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* **3**, 1941–1949 (2007).
51. Talarska, P., Boruckowski, M. & Żurawski, J. Current Knowledge of Silver and Gold Nanoparticles in Laboratory Research—Application, Toxicity, Cellular Uptake. *Nanomaterials (Basel)* **11**, 2454 (2021).
52. Kus-Liśkiewicz, M., Fickers, P. & Ben Tahar, I. Biocompatibility and Cytotoxicity of Gold Nanoparticles: Recent Advances in Methodologies and Regulations. *Int J Mol Sci* **22**, 10952 (2021).
53. Amina, S. J. & Guo, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *Int J Nanomedicine* **15**, 9823–9857 (2020).
54. Suchomel, P. *et al.* Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity. *Sci Rep* **8**, 4589 (2018).
55. Qian, Z. & Park, S.-J. Silver Seeds and Aromatic Surfactants Facilitate the Growth of Anisotropic Metal Nanoparticles: Gold Triangular Nanoprisms and Ultrathin Nanowires. *Chem. Mater.* **26**, 6172–6177 (2014).
56. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2115–2120 (2006).
57. Koepl, S., Solenthaler, C., Caseri, W. & Spolenak, R. Towards a Reproducible Synthesis of High Aspect Ratio Gold Nanorods. *Journal of Nanomaterials* **2011**, e515049 (2010).
58. Keeney, M. *et al.* Nanocoating for biomolecule delivery using layer-by-layer self-assembly. *Journal of Materials Chemistry B* **3**, 8757–8770 (2015).
59. Srivastava, S. & Kotov, N. A. Composite Layer-by-Layer (LBL) Assembly with Inorganic Nanoparticles and Nanowires. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1831–1841 (2008).
60. de Villiers, M. M., Otto, D. P., Strydom, S. J. & Lvov, Y. M. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 701–715 (2011).
61. Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Rab, S. & Suman, R. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal* **7**, 70–77 (2023).

62. Xu, L. *et al.* Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics* **10**, 8996–9031 (2020).
63. Jiang, Y. *et al.* Silver nanoparticles modified two-dimensional transition metal carbides as nanocarriers to fabricate acetylcholinesterase-based electrochemical biosensor. *Chemical Engineering Journal* **339**, 547–556 (2018).
64. Murthy, S. K. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine* **2**, 129–141 (2007).
65. Burduşel, A.-C. *et al.* Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel)* **8**, 681 (2018).
66. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci* **23**, 217–228 (2008).
67. Riley, R. S. & Day, E. S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **9**, e1449 (2017).
68. Zhang, J. *et al.* Daptomycin-Biomaterialized Silver Nanoparticles for Enhanced Photothermal Therapy with Anti-Tumor Effect. *Polymers* **14**, 2787 (2022).
69. Boca, S. C. *et al.* Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy. *Cancer Lett* **311**, 131–140 (2011).
70. Mackey, M. A., Ali, M. R. K., Austin, L. A., Near, R. D. & El-Sayed, M. A. The Most Effective Gold Nanorod Size for Plasmonic Photothermal Therapy: Theory and In Vitro Experiments. *J. Phys. Chem. B* **118**, 1319–1326 (2014).
71. Thompson, E. A. *et al.* Differential response of MCF7, MDA-MB-231, and MCF 10A cells to hyperthermia, silver nanoparticles and silver nanoparticle-induced photothermal therapy. *International Journal of Hyperthermia* **30**, 312–323 (2014).
72. Hong, E. J., Choi, D. G. & Shim, M. S. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **6**, 297–307 (2016).