

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Tomáš Malina

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Cytotoxicita nanomateriálů

Bakalářská práce

Tomáš Malina

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Markéta Havrdová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Markéty Havrdové za použití literárních zdrojů, které jsem uvedl.

V Olomouci dne.....

.....

Tomáš Malina

Souhrn

Obor nanotechnologie se může vnímat jako technologie schopná vytvářet a charakterizovat materiály v nanometrickém měřítku. Představuje rozšiřující se oblast výzkumu s obrovským potenciálem budoucích aplikací v různých technických a biomedicínských oblastech. Nanotechnologie jsou již využívány v řadě odvětví (medicína, kosmetika, potravinářství, strojírenství, elektronika), avšak stále se vyvíjí nanomateriály s novými specifickými vlastnostmi a využitím. V biomedicínských oblastech se však objevují otázky ohledně jejich potenciální toxicity, dlouhodobých vedlejších účinků a biologické rozložitelnosti, které stále zůstávají nezodpovězeny.

Bakalářská práce slouží jako přehled základních vlastností nanomateriálů a jejich interakcí s biologickými systémy. V rešerši jsou obecně popsány hlavní mechanismy cytotoxicity a zmíněny výsledky vědeckých studií zaměřených na toxicitu vybraných nanomateriálů.

Summary

Nanotechnology is nowadays a very popular field of science which improves technology in many applications such as electronics, textiles, biomaterials and medicine. Miraculous properties of nanotechnology are hidden in the size of nanomaterials. Consequently nanomaterials are extraordinary conducting or/and magnetic and have special optic, thermal and catalytic properties. Therefore, these materials are utilized for improvement of medical instruments, devices and for new diagnostic methods and treatment. Nevertheless, the questions about their potential toxicity, a long term side effect and biodegradability are still the main interest of research.

This bachelor thesis should serve as a review of basic properties of nanomaterials and their interactions with biological systems. In this review, the main mechanisms of cytotoxicity were described and various scientific studies about toxicology of specific nanomaterials included.

Poděkování:

Rád bych poděkoval především vedoucí práce Mgr. Markétě Havrdové za odborné vedení, cenné rady, strávený čas a celkovou pomoc při vypracování bakalářské práce, a také za možnost pracovat v laboratořích Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů.

V neposlední řadě děkuji také své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu mého studia.

Obsah

Cíle práce:	8
Úvod:	9
Kapitola 1 – Oxidační stres	10
1.1. Reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive oxygen species).....	10
1.1.1. Zdroje ROS	11
1.1.2 Přehled aktivních forem kyslíku	12
1.1.3 Oxidační poškození způsobené vlivem ROS	14
1.2. Antioxidanty	16
1.2.1 Enzymatické antioxidanty	16
1.2.2 Neenzymatické antioxidanty	17
1.3. Měření oxidačního stresu	18
Kapitola 2 – Úvod do nanotechnologie	21
2.1. Vlastnosti nanomateriálů	22
2.1.1. Povrchové vlastnosti:.....	22
2.1.2. Jevy spojené s konečným rozměrem nanočástic	22
2.2. Struktura nanočástic	23
2.2.1. Modifikace nanočástic	23
2.3. Interakce nanočástic s buňkami.....	24
Kapitola 3: Nanočástice jako zdroj oxidačního stresu	26
3.1. Příklady nanočástic používaných v průmyslových a biomedicínských oblastech	27
3.1.1. Nanočástice stříbra (Ag NPs)	28
3.1.2. Nanočástice oxidu titaničitého (TiO ₂ NPs).....	30
3.1.3. Nanočástice zlata (Au NPs)	31
3.1.4. Nanočástice oxidů železa (IONPs)	33
3.1.5. Kvantové tečky (QDs)	35
3.1.6. Uhlíkové nanomateriály.....	39
Závěr:	45
Literatura:	46
Seznam použitých zkratk:	62

Cíle práce:

Cíle bakalářské práce (rešerše) jsou: 1) vysvětlení oxidačního stresu jako hlavní příčiny poškození buněk vyvolané toxickou látkou, 2) popsání základních vlastností nanomateriálů a jejich interakcí s buněčnou membránou, 3) kompletní přehled cytotoxicity vybraných nanomateriálů podložený vědeckými studiemi.

Úvod:

Ačkoliv se lidstvo setkávalo s nanočásticemi od pradávna, až v posledních dvou desetiletích nastal ve výzkumu nanotechnologie výrazný pokrok. Nanočástie jsou zájmem mnoha vědců, především kvůli jedinečným fyzikálně chemickým vlastnostem, které vznikají při zmenšení materiálů pod 100 nm. Mnoho teoretických a experimentálních studií se zabývá syntézou a vývojem nových druhů nanomateriálů, jelikož jejich aplikace jsou široce využívány. S vývojem nanomateriálů však vznikají i rizika jejich biokompatibility. Zatímco toxicita makroskopických materiálů je dobře prozkoumána, nanomateriály vykazují nové toxikologické vlastnosti (Hussain *et al*, 2009).

Ve většině studií je toxicita nanomateriálů testována především na in vitro úrovni. Nanomateriál je inkubován s buněčnou kulturou po určitou dobu, během které interaguje s plazmatickou membránou a následně i s vnitrobuněčnými kompartmenty. Mezi nejčastější příčinu toxicity patří oxidační stres vyvolaný zvýšenou hladinou reaktivních forem kyslíku (ROS). V menším množství se tyto volné radikály vyskytují v buňce i při běžných fyziologických dějích (Huo *et al*, 2009), avšak v důsledku interakce nanočástice s buňkou, může dojít k narušení vnitrobuněčné rovnováhy, která vede k nahromadění ROS. Vzniklý oxidační stres způsobuje oxidační poškození důležitých biomolekul (proteinů, lipidů, DNA) a často vede až ke smrti buňky (Møller *et al*, 2009). Cytotoxicita nanočástic může být ovlivněna velikostí, tvarem a povrchovou úpravou nanočástic, ale také závisí na podané koncentraci a citlivosti testované buněčné linie (Roiter *et al*, 2009).

Kapitola 1 – Oxidační stres

Redoxní stav buňky neboli oxidačně – redukční rovnováha je poměr mezi množstvím reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které vznikají jako vedlejší produkty látkové výměny a endogenních thiolových pufrů, které buňku chrání před oxidačním poškozením. V případě narušení ustavené rovnováhy dochází k oxidačnímu stresu, který může vést až závažnému poškození buňky.

Mezi obranné antioxidační mechanismy buněk se řadí thiol redukující pufr, který se skládá z malých proteinů s redukčními sulfhydrylovými skupinami (gluthathion GSH, thioredoxin TRX) a další enzymatické systémy jako je superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza (Finkel *et Hoolbrook*, 2000).

1.1. Reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive oxygen species)

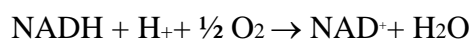
Reaktivní kyslíkové radikály, neboli ve zkratce ROS (reactive oxygen species), vznikají ve vyšších eukaryotních systémech v důsledku redukce molekulárního kyslíku v průběhu dýchání a také vlivem dalších enzymatických dějů. ROS jsou v buňce zastoupeny v několika velmi důležitých procesech, které zahrnují obranu proti patogenům, růst buňky, aktivaci transkripce genů, vnitrobuněčný přenos signálů a hlavně apoptózu. V případě výrazného nárůstu těchto radikálů dochází ke změnám hodnot endogenních thiolových pufrů, což může vést k trvalé aktivaci signálních drah a expresi genů zodpovědných za indukci apoptózy. Nově vyvinutá protinádorová léčiva indukují ROS v rakovinných buňkách, aby došlo k jejich selektivní likvidaci (Davis *et al.*, 2001).

Při metabolismu vznikají ROS především v mitochondriích částečnou redukcí kyslíku v momentě, kdy elektron uniká z transportního elektronového řetězce během dýchání. Za tvorbu kyslíkových radikálů jsou také zodpovědné endogenní enzymatické systémy, jako například membránová NADPH – oxidáza a cytosolová xanthin – oxidáza, a buněčné zdroje jako je peroxisomální cytochrom P450 oxidáza. Mezi nejznámější formy ROS patří především superoxid $O_2^{\bullet-}$, peroxid vodíku H_2O_2 a hydroxylový radikál OH^{\bullet} . Existují také sekundární reaktivní produkty - lipidové peroxidy (Gamaley *et Klyubin*, 1999).

1.1.1. Zdroje ROS

Mitochondrie

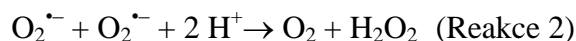
V dýchacím řetězci probíhající v mitochondriích dochází k přesunu elektronů po redoxním spádu z organických látek až na kyslík, který se právě díky čtyřelektronům redukuje na vodu za uvolnění velkého množství energie. (Reakce 1)



$$\Delta G^\circ = -219.25 \text{ kJ mol}^{-1} \quad (\text{Reakce 1})$$

Při redukci kyslíku na vodu dochází k tvorbě reaktivních meziproductů, ze kterých následně mohou vznikat hlavní reaktivní kyslíkové radikály: superoxid $\text{O}_2^{\bullet-}$, peroxid vodíku H_2O_2 a hydroxylový radikál OH^\bullet . Jednotlivé kroky redukce kyslíku zahrnují (Liu *et al*, 2002):

- a) Jednoelektronovou redukci kyslíku NADPH oxidázou za vzniku $\text{O}_2^{\bullet-}$ a jeho dismutaci za vzniku peroxidu vodíku H_2O_2 (Reakce 2).



- b) Fentonovu reakci H_2O_2 s Fe nebo s Cu, při které dochází k vytvoření hydroxylového radikálu OH^\bullet (Reakce 3).



NADPH oxidáza (NOX)

Jedná se o multienzymový komplex, jehož jedinou funkcí je tvorba ROS. NADPH oxidáza katalyzuje elektronový přenos z NADPH na molekulární kyslík, přičemž se vytváří meziproducty $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . Množství kyslíkových radikálů, které oxidáza vytvoří, závisí na typu buňky, ve které tato reakce probíhá (Bedard *et Krause*, 2007). Nárůst v aktivitě NOX souvisí se stárnutím buněk a také s Alzheimerovou nemocí. Radikály vzniklé právě aktivitou tohoto komplexu mohou být zodpovědné za chronické onemocnění jako např. plicní fibróza, rakovina a jiné (Lambeth, 2007).

Xanthin oxidáza

Xanthin oxidáza hraje důležitou roli při katabolismu purinů, kdy přeměňuje xanthin na kyselinu močovou. Při tomto procesu dochází uvnitř buněk k tvorbě superoxidu a peroxidu vodíku (Sanders *et al*, 1997).

Peroxisomy

Důležitou roli v redoxní rovnováze buňky a oxidačním stresu mají peroxisomy. Jak z jejich názvu vyplývá, hrají stěžejní roli v metabolismu peroxidu vodíku (H_2O_2). Peroxisomy obsahují enzymy, které jsou schopné H_2O_2 vytvářet (oxidázy) i odbourávat (katalázy). Avšak enzymy s katalytickou aktivitou, mohou při rozkladu H_2O_2 generovat další ROS, jako například xanthin oxidáza vytváří superoxid $\text{O}_2^{\cdot-}$ a oxid dusnatý NO^{\cdot} , které navzájem reagují za vzniku peroxinitritu (ONOO^-). Navíc, ze samotného H_2O_2 mohou Fentonovou reakcí vznikat hydroxylové radikály (OH^{\cdot}), a proto se dají peroxisomy považovat za zdroj ROS. Jelikož ONOO^- a OH^{\cdot} jsou velice nestálé molekuly, musí peroxisomy obsahovat také antioxidační enzymy, které jsou schopny tyto molekuly degradovat (např. superoxid dismutáza, peroxiredoxin 5, glutathion kappa S- transferáza) (Antonenkov *et al*, 2010).

1.1.2 Přehled aktivních forem kyslíku

Superoxid $\text{O}_2^{\cdot-}$

Superoxid se tvoří v mitochondriích a vzniká redukcí kyslíku jedním elektronem. Přestože se jedná o radikál, superoxid postrádá schopnost procházet přes lipidovou dvojvrstvu a zůstává tak uzavřen v prostoru, ve kterém vznikl (Finkel, 1998). Jeho tvorba probíhá náhodně především v prostředí vnitřní membrány mitochondrií (v místě průběhu dýchacího řetězce), protože se tam nachází bohatý výskyt volných elektronů. Superoxid může také vznikat enzymaticky, především aktivitou flavoenzymů, z nichž mezi nejznámější patří xanthin oxidáza, lipoxygenáza, cyklooxygenáza a další enzymové komplexy (NADPH dependentní oxidáza) (Thannickal *et Fanburg*, 2000). Dvě molekuly superoxidu spolu mohou reagovat za vzniku peroxidu vodíku, který také patří mezi důležité ROS, a molekulárního kyslíku.

Peroxid vodíku H_2O_2

Peroxid vodíku vzniká dismutací superoxidu nebo přímým působením oxidáz (monoaminoxidázy, glutathionoxidázy, xanthinoxidázy) (Sakuma *et al*, 2015). Přestože se neřadí mezi volné radikály, patří k reaktivním formám kyslíku, protože proniká skrz lipidové membrány a při vysokých koncentracích tedy dokáže poškozovat klíčové buněčné struktury jako DNA nebo lipidy. (Kirkland, 1991). Peroxid vodíku je stěžejní molekulou v oxidačním stresu také z dalšího důvodu, jelikož se jedná o meziprodukt při tvorbě ještě více

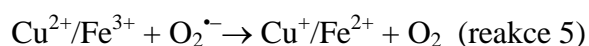
reaktivnějších molekul. Jedná se o kyselinu chlornou (HClO, reakce 4) a především o hydroxylový radikál OH[•], který vzniká pomocí Fentonové reakce (reakce 3).

Významnou funkci však má i při antioxidační ochraně. Působí totiž jako vnitrobuněčná signální molekula, která pomáhá aktivovat detoxikační enzymy, jako jsou například kataláza, glutathion peroxidáza a peroxiredoxiny, které následně eliminují ROS a vyrovnávají buněčnou redoxní rovnováhu (Park *et al*, 2004).



Hydroxylový radikál OH[•]

Hydroxylový radikál se označuje za nejnebezpečnější kyslíkový radikál, protože má schopnost silně reagovat s biomolekulami (Betteridge, 2000). Tento radikál vzniká z peroxiduvodíku reakcí katalyzovanou kovovými ionty (Cu⁺ nebo Fe²⁺), které jsou často vázány s jinou molekulou. Tato reakce se nazývá Fentonova reakce. Ve spojitosti s touto reakcí je důležitý také superoxid, který vzniklé ionty (Fentonovou reakcí) recyklovat (reakce 5). Dohromady spolu reakce 3 a 5 tvoří Haber – Weissovu reakci (Halliwell, 1987).



Oxid dusný (NO)

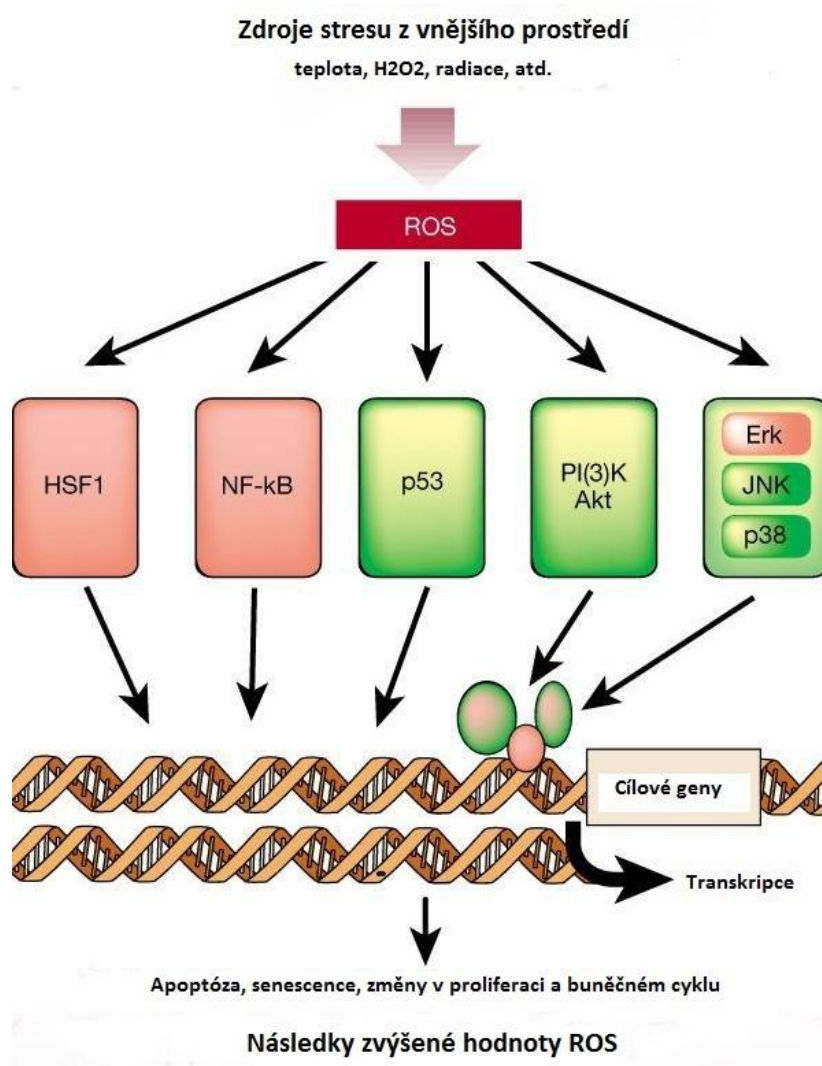
Oxid dusný nereaguje s většinou biomolekul jako ostatní ROS, ale jeho nepárový elektron se váže na další volné radikály a vytváří tak méně reaktivní molekuly. Funguje jako takzvaný vychytávač volných radikálů (scavenger) a dokonce byly dokumentovány případy, kdy NO inhiboval peroxidaci lipidů v buněčné membráně (Hogg *et Kalyanaraman*, 1998). Pokud je však produkován ve velkém množství současně se superoxidem, navzájem spolu reagují za tvorby peroxynitritu (OONO⁻, reakce 6), který je vysoce cytotoxický a dokáže dále reagovat s biomolekulami v jedno- nebo dvou- elektronových reakcích (Beckman *et Koppenol*, 1996). Peroxynitrit může dále tvořit vysoce reaktivní molekuly, podléhat homolýze (za tvorby OH[•] a NO₂[•]) nebo se přeskupit na dusičnan (NO₃⁺).



Ačkoliv se oxid dusný podílí na vzniku velmi reaktivních molekul, které mohou být pro buňku velmi škodlivé, vědci se shodují, že v důsledku jeho působení na redoxní systém buňky zastává oxid dusný funkci spíše jako antioxidant než jako oxidant.

1.1.3 Oxidační poškození způsobené vlivem ROS

Jak již bylo zmíněno, nárůst ROS nad kapacitu enzymatických systémů, zodpovědných za regulaci těchto radikálů, může vést k potenciálně toxickému oxidačnímu stresu. V takovém případě mohou tyto vysoce reaktivní radikály poškodit DNA, RNA, proteiny a lipidové složky, což může v konečném důsledku způsobit buněčnou smrt. Schéma celého procesu je znázorněno na obrázku č. 1. Vnější vlivy (např. teplota, radiace atd.) vyvolají ROS a následně také aktivaci různých transkripčních faktorů (NF- κ B, HSF1), které podmiňují nadměrnou expresi antioxidantních enzymů (kataláza, glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza). Tato kaskáda dějů se projevuje změnami v proliferaci, senescenci a změnami v buněčném cyklu. Při velkém narušení homeostázy už buňka není schopná obnovit buněčnou rovnováhu a celý proces vede k apoptóze (Finkel *et* Holbrook, 2000).



Obrázek č. 1: Hlavní signální dráhy aktivované jako odpověď na oxidační stres. Převzato z Finkel *et* Holbrook, 2000.

DNA

Kyslíkové radikály se označují jako mutagenní především díky jejich negativním chemickým efektům na molekulu DNA. Důsledkem reakcí s radikály může docházet k různému poškození molekuly. Nejreaktivněji se projevuje hydroxylový radikál OH^\bullet , jelikož dokáže rozrušovat struktury všech složek DNA.

Poškození DNA může probíhat několika způsoby. ROS například často poškozuje guanin, protože má ze všech bází nejmenší oxidační potenciál. Modifikace guaninu ve formě jeho oxidace, nitrace nebo alkylace může následně vyvolat mutagenезi, vznik můstek mezi DNA a proteiny, což ve výsledku vede k ovlivnění replikace a transkripce DNA (Jena *et al*, 2012).

Oxidační poškození může nastat i modifikací thyminu, hydroxylovým radikálem OH^\bullet , který následně vytváří můstek s guaninem a mění tak strukturu řetězce DNA (Labet *et al*, 2008). Podobně dokáží ROS modifikovat i další báze, které následně tvoří můstky s cukernou částí DNA (Cooke *et al*, 2003). Dokumentovány jsou případy vzniku vazby, jak mezi bází a proteinem (Perrier *et al*, 2006), tak i mezi cukernou složkou a proteinem (Sczepanski *et al*, 2010).

Lipidy

Peroxidace lipidů je jedním z nejvíce rozšířených a prozkoumaných působení kyslíkových radikálů. Nacházejí se totiž v klíčové části buňky, kterou je plazmatická membrána. Metabolismus lipidů řídí peroxisomy, které pomáhají chránit buňku tím, že udržují optimální kompozici lipidů v membráně (Fransen *et al*, 2013). Pokud však dojde k nárůstu volných radikálů v buňce, podléhají lipidy vlivem oxidačního stresu peroxidaci. Oxidace lipidové dvojvrstvy následně může měnit strukturu membrány, její propustnost a funkci, což může vést až k lyzi buňky. Peroxidaci lipidů zvyšuje přítomnost vysoké koncentrace nenasycených mastných kyselin, které jsou vůči oxidačnímu stresu velmi citlivé a stávají se tak lehkým cílem pro reakci s volnými radikály (Yin *et al*, 2011). Peroxidaci způsobují především vysoce reaktivní a nestabilní radikály, jako je například ONOO^- (Ho *et al*, 2002).

1.2. Antioxidanty

Hlavní funkce antioxidačního systému spočívá v zajištění rovnováhy mezi hladinou oxidantů a antioxidantů. Podílí se tak na ochraně buňky před nepříznivými účinky kyslíkových radikálů, které vznikají jejich hromaděním. Antioxidační systém lze rozdělit na enzymatické a neenzymatické antioxidanty. Mezi enzymatické oxidanty se řadí superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza, do neenzymatických antioxidantů patří glutathion, kyselina askorbová (vitamin C) a α -tokoferol (vitamin E).

1.2.1 Enzymatické antioxidanty

Za enzymatické antioxidanty se považují molekuly, které inhibují oxidaci jiných molekul v buňce tím, že katalyzují reakce, které zajišťují odbourávání volných radikálů (Sies, 1997). Mezi hlavní antioxidační enzymy patří superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza.

Superoxid dismutáza (SOD)

Superoxid dismutáza katalyzuje reakci přeměny vysoce reaktivního aniontu superoxidu na méně reaktivní peroxid vodíku, který je následně odbourán pomocí katalázy nebo jiných peroxisomálních enzymů. Dismutáza tvoří 3 formy: cytoplazmatickou Cu/Zn - SOD1, mitochondriální Mn - SOD2 a extracelulární SOD3. Formy SOD 1 a 2 zajišťují odstranění iontu superoxidu uvnitř buňky, respektive v mitochondriích, zatímco SOD 3 katalyzuje reakce, které probíhají vně buňky (Zelko *et al*, 2002).

Kataláza

Kataláza urychluje reakci přeměny peroxidu vodíku na vodu a kyslík, přičemž využívá železa (Fe) nebo manganu (Mn) jako kofaktoru. Kataláza se nachází především v peroxisomech, kde pomáhá odbourávat peroxidu vodíku (viz kapitola 1.1.2 Zdroje ROS). Dále má funkci detoxifikace různých substrátů, jako jsou například alkoholy a fenoly. Účinnost katalázy se dá ještě zvýšit navázáním NADPH, který také brání její degradaci (Kirkman *et al*, 1999).

Glutathion peroxidáza (GPx)

Podobně jako kataláza, glutathion peroxidáza katalyzuje redukci peroxidu vodíku za pomoci redukované formy glutathionu. GPx dokáže redukovat také další typy peroxidů na alkoholy (např. lipidové peroxidy v membráně). Jedná se o peroxidázu, která obsahuje selen

(Se) a vyskytuje se jak v cytosolu, tak také v mitochondriích. Některé studie považují GPx za důležitou složku antioxidantní obrany i při fyziologickém stavu buňky (Jones *et al*, 1981), zatímco jiné jí zobrazují jako enzym významný pouze při oxidačním stresu (Kelner *et Bagnell*, 1990). Všichni se však shodují, že se jedná o klíčovou část enzymatické obrany proti oxidačnímu poškození.

1.2.2. Neenzymatické antioxidanty

Neenzymatické antioxidanty fungují jako tzv. vychytávači (scavengers). Jedná se o chelatační činidla, která inhibují endogenní zdroje oxidantů nebo aktivují antioxidantní systémy. Dělí se na metabolické (glutathion), které jsou tvořeny jako meziprodukty při metabolismu buňky, a vyživující (vitamin E a C), které je nutné přijímat v potravě.

Glutathion

Glutathion (glutamyl – cysteinyl – glycin neboli GSH) se vyskytuje v buněčném jádře, cytosolu i v mitochondriích a je to hlavní intracelulární antioxidant. Vychytává a odbourává aktivní formy kyslíku za přítomnosti glutathion peroxidázy. Působí jako kofaktor několika detoxikačních enzymů (glutathion peroxidáza, glutathion transferáza, a další) a je schopný regenerovat významné antioxidanty (vitamin C a E) zpět do jejich aktivní formy (Masella *et al*, 2005).

Vitamín E

Vitamín E je lipofilní antioxidant, který chrání membrány před poškozením způsobeným především radikály peroxidů při oxidaci tuků. Mezi nejaktivnější isoformy patří hlavně α – tokoferol. Při studiích byla dokázána ochranná funkce vitamínu E u neuronů (Kabay *et al*, 2009).

Vitamín C (kyselina askorbová)

Vitamín C neboli kyselina askorbová je nejsilnější antioxidant, který se podílí na odstranění volných radikálů pomocí elektronového přenosu a v mnoha reakcích působí jako kofaktor antioxidantních enzymů. Příkladem jeho funkce může být proces odstranění superoxidu a peroxidu vodíku z buňky, během kterého vitamin C spolupracuje se superoxid dismutázou (SOD) a katalázou. Jak již bylo zmíněné dříve, SOD katalyzuje přeměnu superoxidového aniontu na peroxid vodíku, který je dále v katalyzované reakci přeměněn na vodu a kyslík. Kataláza má však k molekule H_2O_2 nízkou afinitu a proto není rozštěpeno jeho

celkové množství. Naopak vitamin C díky své vysoké afinitě odstraní zbytkovou koncentraci H_2O_2 a zabrání tak potenciálnímu poškození buňky hydroxylovými radikály (Arrigoni *et De Tullio*, 2002).

1.3. Měření oxidačního stresu

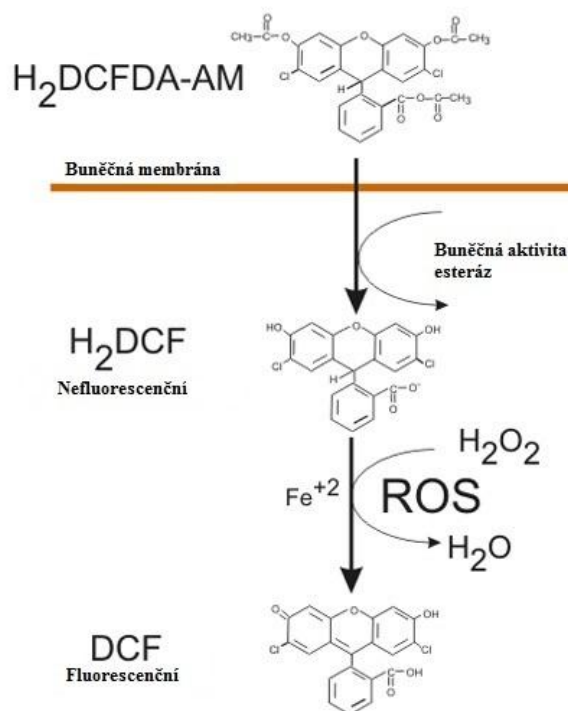
Jak již bylo zmíněno na začátku této kapitoly, oxidační stres je způsoben zvýšenou hladinou ROS, která aktivuje antioxidační obranný mechanismus buňky. Oxidační stres může být zjištěn několika způsoby: 1) měřením hladiny ROS, 2) měřením množství antioxidantů, 3) detekcí poškozených biomolekul.

Fluorescenční sondy jsou specifická barviva založena na oxidačně – redukčních reakcích mezi ROS a redukovanou sondou, která po své oxidaci začne emitovat fluorescenci. Detekci tohoto záření lze určit a změřit velikost signálu určitého radikálu v přesném místě buňky. Pro každý kyslíkový radikál existuje různé množství sond, které mají specifické vlastnosti právě vůči určitému radikálu (Wardman, 2007). Na obrázku č. 2 je uveden příklad interakce fluorescenční sondy s ROS.

Při měření hladiny ROS se využívá interakcí reaktivních kyslíkových radikálů s chemickými sloučeninami vyskytujícími se uvnitř buněk. Interakcí ROS s intracelulárními látkami vzniká fluorescenční komplex, jehož intenzita je měřitelná a vyhodnocena jako hladina ROS. Tímto způsobem se například vyhodnocuje přítomnost superoxidu, který redukuje cytochrom c (reakce 7) na barevný produkt (McCord *et Fridovich*, 1968).



Dlaší možností je spektroskopické stanovení narůstající hodnoty peroxidu vodíku. Existuje řada fluorogenních substrátů, které slouží jako donory vodíku a jsou ve spojení s enzymem (křenovou peroxidázou), který následně tvoří intenzivně fluorescenční produkty. Narůstající hodnoty H_2O_2 tak vedou k narůstání fluorescenčního produktu, který je možno měřit. Mezi nejpoužívanější substráty patří například kyselina homovanilová (Ruch *et al*, 1983).



Obrázek č. 2: Příklad interakce fluorescenční sondy H₂DCFDA-AM s ROS (v tomto případě s H₂O₂). Převzato z Held, 2012.

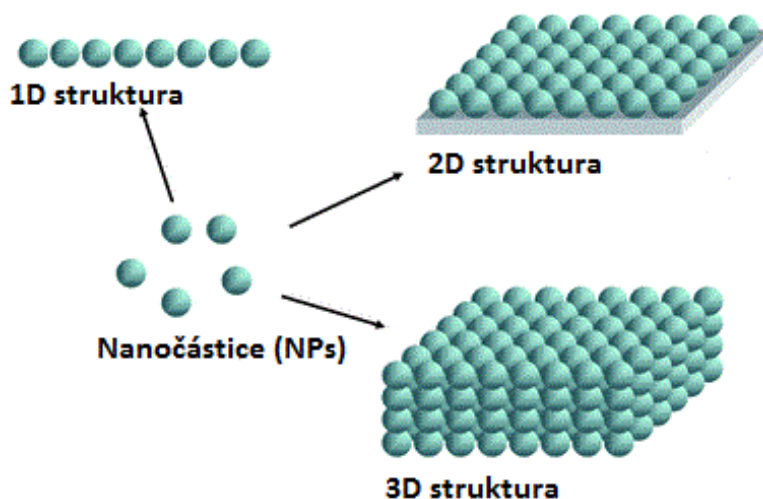
Druhý způsob měření oxidačního stresu využívá antioxidační enzymy, které slouží k obnovení redoxní stability buňky (kapitola 1.2.1 Enzymatické antioxidyanty). Měření oxidačního stresu však potřebuje silný detekční signál, a proto se používají nejdůležitější antioxidační enzymy, mezi které patří kataláza, superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a glutathion reductáza. Metody měření zahrnují reakce katalyzované jednotlivými antioxidačními enzymy, kde je výsledný oxidační stres následně stanoven spektrofotometricky. Například při detekci superoxidu se používají látky, které v reakci se superoxidem vytvářejí barevné produkty, které jsou následně spektrofotometricky měřeny (Skalická et al, 2012). Stanovení oxidačního stresu pomocí peroxidu vodíku je založeno na poklesu absorbance H₂O₂, která představuje rozklad peroxidu vodíku působením kataláz (Schellhorn, 1995).

Poslední metoda měření oxidačního stresu využívá markery poškození biomolekul v buňce. Existuje velké množství markerů, které se využívají pro měření oxidačního poškození různých organel buňky, avšak mezi nejdůležitější patří především karbonylové sloučeniny, které vznikají v důsledku oxidačního poškození proteinů. Jejich výborná chemická stabilita z nich dělá vhodné cíle pro laboratorní měření (Dalle-Donne et al, 2005). Druhý důležitý

marker představuje 8-hydroxy-2-deoxyguanosin (8OHdG), jelikož se jedná o marker, který se využívá pro detekci oxidačního poškození DNA (Valavanidis et al, 2009).

Kapitola 2 – Úvod do nanotechnologie

V poslední době dochází k velkému rozvoji v odvětví nanotechnologie. Jedná se o výzkum materiálů, které díky svým velmi malým rozměrům vykazují specifické fyzikálně chemické vlastnosti. Materiál spadající do tzv. nanosvěta, musí mít alespoň jeden rozměr pod 100 nm. Nanomateriály se podle rozměru dělí do třech kategorií (viz obrázek č. 3). Do první kategorie spadají materiály, které mají pouze jeden rozměr pod 100 nm. Patří sem například velmi tenké povrchové vrstvy nebo filmy. Druhá kategorie obsahuje materiály, které jsou nanometrické ve dvou rozměrech (nanodráty a nanotrubičky). Mezi nanomateriály omezené ve všech třech rozměrech (dimenzích) patří nanočástice a kvantové tečky (Liu *et* Tang, 2010).



Obrázek č. 3: Schéma rozdílných (1D, 2D, 3D) sestav nanomateriálů. Převzato z Liu *et* Tang, 2010.

Fyzikální chování látek v nanometrovém měřítku popisuje kvantová mechanika, jejíž zákony jsou formulovány především ve Schrödingerově rovnici. Tato rovnice je pro kvantovou fyziku (nanofyziku) stejně důležitá jako Newtonova pohybová rovnice pro běžnou mechaniku (Di Sia, 2013). Podrobný popis kvantové fyziky není předmětem této práce, avšak všechny anomální vlastnosti nanomateriálů jsou na ni založené.

2.1. Vlastnosti nanomateriálů

Zmenšováním rozměrů materiálů na atomární úroveň dochází ke změnám povrchových vlastností materiálu a vlastností spojených s konečným rozměrem částic.

2.1.1. Povrchové vlastnosti:

Povrchové anomálie nanočástic jsou způsobeny zmenšením materiálu pod kritickou mez, kdy dochází k rozpadu krystalové symetrie. Zvyšuje se počet atomů na povrchu na úkor objemu nanočástice a dochází ke zvýšení reaktivity mezi povrchovými atomy. U magnetických materiálů se zvyšuje povrchová anizotropie a neuspořádanost povrchových magnetických momentů. Povrch nanočástice tak může vykazovat odlišnou magnetickou aktivitu než její jádro (Xu *et al*, 2007).

2.1.2. Jevy spojené s konečným rozměrem nanočástic

Specifické vlastnosti, které nanočástice vykazují ve spojení s jejich konečným rozměrem, vznikají v důsledku kvantového omezení pohybu elektronů. Projevem těchto anomálií může být nenulová energie základního stavu částice a kvantování dovolených energetických hladin v nízkodimenzionálních strukturách (Havrdova, 2012). Mezi jevy spojené s konečným rozměrem řadíme jednodoménovost částic a superparamagnetismus.

Jednodoménovost nanočástic

Makroskopický magnetický materiál je rozdělen do Weissových domén o velikosti 0,1 μm (pro krystalu magnetitu), ve kterých se nachází různě orientované magnetické momenty (Bastow *et Trinchi*, 2009). Jednotlivé domény jsou ohraničené doménovými stěnami, jejichž vlastnosti závisí na energetických, krystalografických a geometrických parametrech. Zmenšováním velikosti materiálu přestává být doménová struktura energeticky výhodná a dochází k postupnému ubývání domén, až částice začne vykazovat jednodoménový charakter. Při takto malém rozměru materiálu, resp. nanomateriálu spolu interagují jednotlivé magnetické momenty atomů. V jednodoménové nanočástici získají všechny atomové magnetické momenty stejný směr (určený magnetickou anizotropií) a navenek vykazují obrovský magnetický moment, tzv. superspin (Tucek, 2008).

Superparamagnetismus

Jednodoménovost je propojená se superparamagnetismem, který nastává při zmenšování jednodoménové nanočástice (Thanh, 2012). Tento jev je tedy spojený

s konečným rozměrem nanočástic a dochází při něm k ovlivnění celkového magnetického stavu nanočástice teplotní energií. Nanočástice vykazuje superparamagnetické chování, pokud se anizotropní energie stane srovnatelnou s energií teplotních fluktuací. Díky teplotní energii dojde ke spontánnímu překlopení magnetického momentu z původního snadného směru, ve kterém byla magnetizace udržována anizotropní energií, do směru druhého i bez přítomnosti vnějšího magnetického pole (Bhagwat *et al*, 2005). Doba, po kterou magnetický moment setrvává ve snadném směru, než zaujme nový směr magnetizace, se nazývá relaxační čas. Superparamagnetismus je tedy způsoben soutěžením anizotropní energie s energií teplotních fluktuací (Suominen *et al*, 2007).

Superparamagnetické nanočástice mají silnou magnetickou odezvu i v nízkém magnetickém poli, čehož se využívá při vývoji nových kontrastních látek pro MRI (Wang *et al*, 2013).

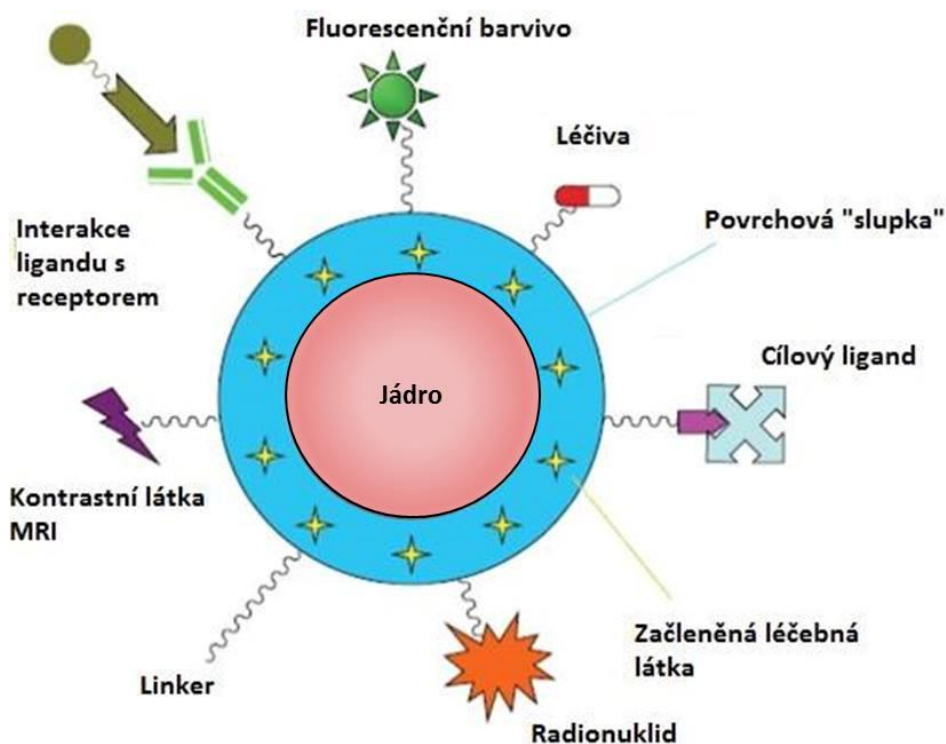
2.2. Struktura nanočástic

Značné rozdíly ve fyzikálně – chemických vlastnostech nanočástic v porovnání s jejich makroskopickou fází již byly rozeznány v mnoha odvětvích vědy a techniky. Dochází k využívání mnoha různých materiálů, u kterých došlo ke zlepšení vlastností při zmenšení jejich rozměrů. Jedná se o polovodičové, magnetické, kovové nebo polymerní nanosystémy, u kterých byl zjištěn potenciálně nadějný účinek v biomedicínských oborech (Karlsson *et al*, 2009).

2.2.1. Modifikace nanočástic

Struktura nanomateriálů pro bioaplikace se ve většině případů neskládá pouze z jádra nanočástice, ale obsahují také tzv. slupku neboli povrchovou vrstvu z jiného materiálů. Takto upravené nanočástice mají oproti neupraveným jednoduchým částicím výrazné výhody, které často vedou ke zlepšení jejich vlastností a využití. Mezi takové výhody patří především nižší toxicita a lepší bio- a cytocompatibilitu (Law *et al*, 2008) a dále také zvýšená rozpustnost, konjugace s dalšími bioaktivními molekulami a termální a chemická stabilita (Chatterjee *et al*, 2014).

Mezi další látky, které se používají pro modifikaci povrchu nanočástic, patří různé organické polymery. Jedná se například o protilátky, ligandy, fluorescenční značky, léčivé látky, radionuklidy a další (viz obrázek č. 4). Takto upravené nanočástice se následně využívají pro specifické interakce (Liu *et al*, 2010).



Obrázek č. 4: Schéma multifunkční nanočástice pro molekulární zobrazování, cílené dodávání léčiv a další terapie. Převzato z Chatterjee *et al*, 2014.

2.3. Interakce nanočástic s buňkami

První interakci nanočástice s buněčným systémem provází velký počet jevů a interakcí, které oba systémy ovlivňují. Po adsorpci nanočástic na membránu buňky totiž dochází k prvnímu kontaktu mezi odlišnými vlastnostmi nano a bio složky. Za součást biologické složky je třeba také počítat růstové médium, které obsahuje proteiny, glukózu a další biomolekuly, které se mohou vázat na povrch nanočástice a ovlivňovat jejich interakci s buněčnou membránou (Cedervall *et al*, 2007). Co se týče nanočástic, povrchový náboj, struktura povrchu, tvar a přítomnost obalové vrstvy ligandů patří mezi klíčové vlastnosti, které ovlivňují internalizaci částic do buňky (Verma *et al*, 2008).

Způsobů, jakými dokáže nanočástice překonat lipidovou dvojvrstvu, je známo hned několik. Zatímco větší nanočástice podléhají endocytóze, čili obalení částice do membránové vezikuly, která následně putuje do cytosolu (Conner *et al*, 2003), menší částice, jako například 3 – 4 nm velké nanočástice zlata, dokáží proniknout do buněk přímo difúzí nebo pinocytózou, jak se prokázalo díky měření mikroskopie atomárních sil (Shukla *et al*, 2005). Podobný endocytický osud potvrdily studie také u nanočástic oxidů železa (Wilhelm *et al*, 2008). Při průniku menších nanočástic je však stěžejní, aby po jejich průchodu zůstala

membrána buňky neporušena, neboť by důsledky mohly vést až ke smrti buňky (Leroueil *et al.*, 2008).

Jelikož nejvyšší míru toxického účinku dokáží nanočástice vyvolat pouze v interakci s vnitrobuněčným prostředím, představuje jejich internalizace neboli tzv. uptake do buňky tak klíčový krok při potenciální cytotoxicitě nanočástic.

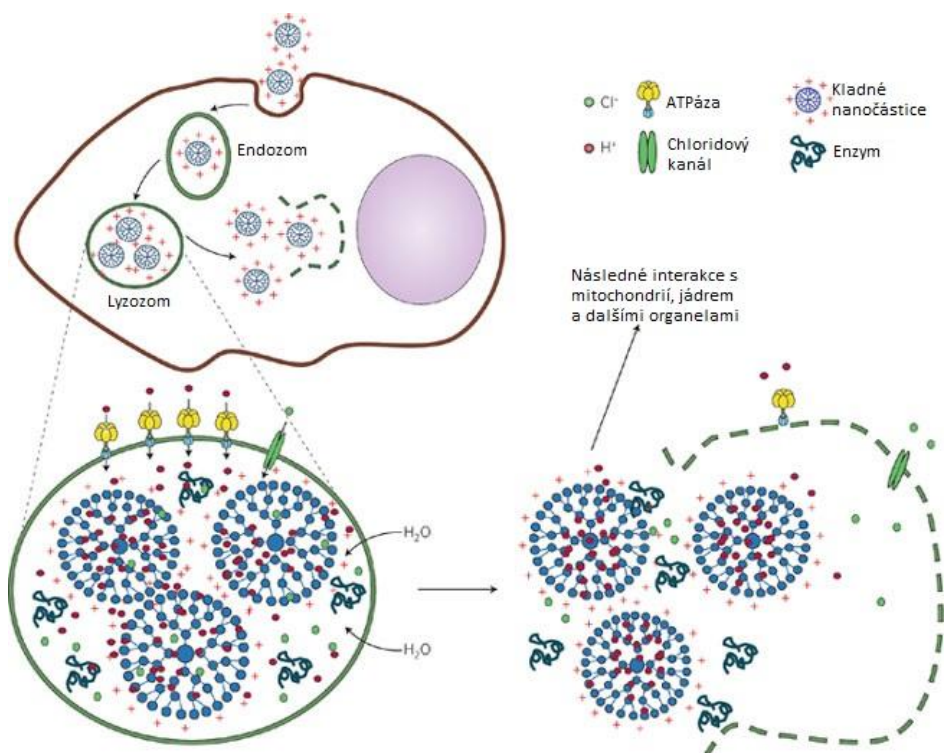
Kapitola 3: Nanočástice jako zdroj oxidačního stresu

Syntéza nových nanomateriálů a jejich aplikace stále roste a řada teoretických i experimentálních studií se zaměřuje na jejich toxicitu. Nanočástice mají rozmanité vlastnosti a parametry, kterými mohou toxicitu vyvolat. Patří mezi ně velikost, tvar, struktura a vlastnosti povrchu (povrchová reaktivita, hydrofilní/hydrofóbní vlastnosti), náboj, chemické složení, homogenita a stabilita nanomateriálu (Oberdörster *et al*, 2005). Toxicita nanočástic se může projevit různými způsoby a vyvolat širokou škálu buněčných odpovědí, jako jsou změny v morfologii, snížení/zvýšení proliferace, pokles životnosti, oxidační stres, genotoxicita (Rouch *et al*, 1995).

Díky velmi malé velikosti dokáží nanočástice vstoupit do biologických systémů, kde interagují s vnitrobuněčnými strukturami a makromolekulami. Velikost částic se považuje za jeden z hlavních faktorů, který přispívá k nanotoxicitě. Díky své velikosti mají nanočástice mnohem vyšší reaktivní potenciál než velké částice a dokáží indukovat vznik většího množství volných radikálů (Nel *et al*, 2006). Nadměrná produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) způsobuje oxidační stres a zodpovídá tak za velmi velké procento cytotoxicity (viz kap. 1.2.3 Oxidační poškození způsobené ROS). Jelikož se velká část kyslíkových radikálů generuje v dýchacím řetězci v mitochondriích, kde však v malém množství pozitivně ovlivňují například proliferaci, expresi genů a regulaci redoxního prostředí (Dalle-Donne *et al*, 2007), nanočástice jsou schopny narušit tuto funkci mitochondrií a vytvořit oxidační stres, který následně vede k apoptóze (Murphy, 2009). Nanočástice o velikosti 2 – 10 nm mohou vstupovat i do buněčného jádra (Huo *et al*, 2014, Boyoglu *et al*, 2013), kde mohou způsobit mutaci DNA (Fröhlich *et al*, 2010). Velikost částice tedy může výrazně ovlivnit její potenciální toxicitu.

Další důležitý faktor, který má vliv na potenciální toxicitu částice, je její povrchový náboj. V různých studiích bylo popsáno, že kladné nanomateriály působí vyšší toxicitu než nanomateriály negativní. (Goodman *et al*, 2004, Mahmoudi *et al*, 2011). Jedním z důvodů může být tzv. electron sponge efekt, který nastává pouze u kladných nanočástic. Tento děj probíhá díky vysoké afinitě kladně nabitých částic k lipidům na povrchu membrány, které jsou následně endocytovány do vezikul. Když se částice následně dostanou do kyselého prostředí lyzozomu, dokáží nenasycené amino skupiny vychytat protony, které jsou dodávány

ATPázou (protonovou pumpou). Tento proces vede ve výsledku k roztržení lyzozomu a vypuštění nanočástic do cytoplazmy (viz obrázek č. 5) (Leroueil *et al*, 2008).



Obrázek č. 5: Tzv. electron sponge effect – částice unikne z endosomu a interaguje s dalšími organelami, včetně jádra, do kterého může prostoupit. Převzato z Nel *et al*, 2009.

Obecně z literatury vyplývá, že největší biokompatibilitu vykazují uhlíkové nanomateriály (uhlíkové tečky, grafen a grafenové tečky), u nanočástic zlata a oxidů přechodných kovů dochází k rozporupným výsledkům při testování jejich cytotoxicity. A v poslední řadě stříbrné nanočástice a kvantové tečky působí ve vysokém procentu případů toxicky, jelikož vykazují výborné antibakteriální účinky (stříbro) a jsou složeny z jader z těžkých kovů (kvantové tečky).

3.1. Příklady nanočástic používaných v průmyslových a biomedicínských oblastech

S postupně výraznějším vývojem oboru nanotechnologie jde ruku v ruce také častější tvorba nových nanočástic. Nanočástice mohou být tvořeny různými materiály, které následně ovlivňují jejich základní vlastnosti a potenciální účinek. V současnosti se nanomateriály používají v různých oblastech, které zahrnují pokročilé materiály, elektroniku (Xiao *et al*,

2003), magnetismus, optiku (Gao et al, 2002), biomedicínu (Bergey et al, 2002), kosmetiku (Shaal et al, 2010), environmentální detekci (Zhu et al, 2004) a monitoring (Zhang et al, 2006). Ve většině případů zde však nedochází k vystavení jejich účinkům, avšak s potenciálem, který v sobě ukrývá nanotechnologie a její využití, se dá předpokládat, že v budoucnu dojde k výraznému nárůstu v pravděpodobnosti vystavení působení nanomateriálů (Oberdörster et al, 2005).

Tato kapitola je zaměřena na toxicitu nejčastěji aplikovaných příkladů nanočástic, jejich potencionálnímu využití a toxickým účinkům, které mohou vyvolat při interakci s živým organismem.

3.1.1. Nanočástice stříbra (Ag NPs)

Nanočástice stříbra (AgNPs) patří mezi jedny z nejvíce rozšířených nanočástic v biomedicínských aplikacích, kde se využívá jejich antibakteriálních a antimykotických vlastností (Groll *et al*, 1996). AgNPs se řadí mezi nejvíce komercializovaný nanomateriál (Ahamed *et al*, 2008) a díky optickým vlastnostem se využívá i ve fotonických a senzorických aplikacích (McFarland *et al*, 2003). Ačkoliv mají AgNPs antibakteriální a antimykotické účinky, intracelulárně působí toxicky (ROS, genotoxicita (Arora *et al*, 2008)). Cytotoxicitu AgNPs je možné minimalizovat snížením koncentrace použitého vzorku, jelikož AgNPs vykazují antimikrobiální účinky již při velice nízkých dávkách (1 µg AgNPs ve 100 µl bakteriální suspenze dokáže zcela inhibovat bakteriální růst)(Pal *et al*, 2007). Nanočástice stříbra prostupují přes bakteriální membránu a ovlivní její fyziologické procesy. Bakteriocidní účinky byly potvrzeny při interakci AgNPs s bakteriemi *Fusarium Oxysporum* (Durán *et al*, 2007) a *Escherichia Coli* (Tripathi *et al*, 2009) a antimykotické účinky vůči plísním *Trichophyton mentagrophytes* a *Candida albicans* (Kim *et al*, 2009). AgNPs dokáží rozrušit membránu plísně a inhibovat tak proces pučení (Kim *et al*, 2009). Účinnost nanočástic byla porovnána s fungicidním amfotericinem B a výsledky byly srovnatelné (Hartsel *et Bolard*, 1996).

Zmíněné vlastnosti jen minimálně ukazují potenciál využití stříbrných nanočástic v oblastech bio medicínského výzkumu. Při interakci s buněčným materiálem však nanočástice stříbra mohou vykazovat toxické účinky, které následně vedou k buněčné smrti.

Mezi nejpravděpodobnější mechanismy toxicity Ag NPs patří tvorba ROS a s nimi spojený oxidační stres (Arora *et al*, 2008), který může být vyvolán i následkem vyčerpání

glutathionu. Další příčinou toxicity (způsobenou AgNPs) je změna aktivity antioxidantních enzymů a peroxidace lipidů, což vede k oxidativnímu poškození buňky (Ahamed *et al*, 2007). Nanočástice stříbra také způsobují poruchy mitochondriálního dýchacího řetězce. Dochází tam k nahromadění kyslíkových radikálů a přerušení tvorby ATP, což může vést k poškození DNA (Asharani *et al*, 2008). Při testování nízkých dávek způsobily částice stříbra expresi genů spojených s buněčným cyklem a apoptózou v lidských jaterních buňkách ($c < 0,5 \mu\text{g/ml}$) (Kawata *et al*, 2009) a také vyvolaly toxické účinky v lidských mezenchymálních kmenových buňkách ($c = 3 \mu\text{g/ml}$) (Greulich *et al*, 2009). Tyto dvě studie tedy potvrdily, že nanočástice stříbra mohou být velmi nebezpečné i ve velmi nízkých koncentracích.

Stejně jako u ostatních nanočástic, i u AgNPs byly provedeny testy *in vitro*, které testovaly toxicitu částic v závislosti na jejich velikosti. Ve studii autoři použili buněčnou linii THP-1 a AgNPs o velikosti 20 nm a 40 nm. Z výsledku WST-1 testu vyplývá, že menší nanočástice jsou o něco více toxické - hodnota IC 50 nastala při koncentraci 110 $\mu\text{g/ml}$, avšak IC 50 u 40 nm AgNPs byla 140 $\mu\text{g/ml}$. Po 48 hodinách životnost buněk klesla pod IC 50 již při 18 $\mu\text{g/ml}$ (AgNPs 20 nm) a 30 $\mu\text{g/ml}$ (AgNPs 40 nm), avšak 20 nm nanočástice vykazovaly výraznější toxické účinky (Haase *et al*, 2011). V další studii zaměřené na potenciální vliv velikosti částic na jejich toxicitu autoři použili buněčnou linii BEAS-2B, na které testovali AgNPs o velikostech 10, 40 a 75 nm, potaženy PVP a citrátem. Životnost buněk byla měřena za pomoci Alamar blue (AB) a LDH testů. Ve výsledku došli autoři ke zjištění, že životnost buněk ovlivňují a toxickým účinkem působí pouze AgNPs o velikosti 10 nm, které navíc nevykazovaly žádné rozdíly s ohledem na typ potažení (Gliga *et al*, 2014). U AgNPs tak byla také potvrzena závislost velikosti nanočástic na jejich potenciální cytotoxicitě.

Jelikož se ve vodním prostředí z nanočástic stříbra (Ag NP) uvolňují Ag^+ ionty (Kim *et al*, 2009), snaží se vědci rozpoznat toxicitu způsobenou rozpuštěným iontem (Johnston *et al*, 2010) a toxické efekty nanočástice. Studie zaměřené na tohle téma se ve svých výsledcích poněkud rozcházejí. Autoři (Kawata *et al*, 2009, Chae *et al*, 2009) tvrdí, že se obě tyto látky společně podílejí na celkové toxicitě nanočástic, na druhé straně však přichází studie (Kim *et al*, 2009, Asharani *et al*, 2008) s tvrzením, že Ag NPs způsobují toxicitu nezávisle na působení volných Ag^+ iontů. Někteří vědci zase uvádí předpoklad, že Ag NPs zde mohou fungovat jako tzv. „Trojský kůň“, který dokáže obcházet typické bariéry buňky a následně uvolňuje Ag^+ iont, který ji poškodí (Park *et al*, 2010).

Pomocí Ramanovy spektroskopie (SERS) bylo dokázáno, že při detekci analytu v interakci s nanočásticemi stříbra dochází k takovému zesílení Ramanova signálu, který umožňuje detekovat jednotlivé molekuly v analytu (Potara *et al*, 2012). Specifickým optickým vlastností stříbra pomáhají s větší přesností detekovat imunoglobuliny, peptidy a další molekuly (Shrivastava *et al*, 2008) a nanočástice stříbra v budoucnu používat jako potenciální biosenzory (McFarland *et al*, 2003).

Potenciální ohrožení lidského zdraví v důsledku působení stříbrných nanočástic musí být v budoucnu ještě dostatečně prozkoumáno, avšak již teď se mohou považovat za důležitou třídu nanomateriálů s širokým průmyslovým a medicínským využitím.

3.1.2. Nanočástice oxidu titaničitého (TiO₂ NPs)

Nanočástice oxidu titaničitého (TiO₂ NPs) patří spolu s částicemi oxidu zinečnatého a měďnatého mezi nejpoužívanější nanočástice přechodných kovů, které mohou mít široký okruh uplatnění. V současnosti se používají v oblastech magnetického chlazení (Roy *et al*, 1993), medicíny (Wellman *et al*, 1998) a farmacie (Gélis *et al*, 2004) a také se staly součástí optických a nahrávacích zařízení (Prinz *et al*, 2008).

U TiO₂ NPs mají fotokatalytické účinky (Yu *et al*, 2007), které zajišťují stálost bílé barvy a dezinfekční vlastnosti (Pant *et al*, 2013). Přidávají se do bílého pigmentu barev a papírů, používají se v kosmetice, potravinách a v dalších výrobcích, které se každodenně využívají (Kaida *et al*, 2003). Avšak vysoké dávky mohou způsobovat plicní záněty (Warheit *et al*, 2008) nebo vést k nádorovému onemocnění (Heinrich *et al*, 1995).

Jak již bylo zmíněno, TiO₂ NPs jsou široce používané a proto se staly tématem řady cytotoxicitních studií. Vědci potvrdili, že TiO₂ NPs inkubované s buněčnou linií A549 zvyšují hladinu ROS (Jugan *et al*, 2009) a následkem toho způsobují nepřímou genotoxicitu (Bhattacharya *et al*, 2009). Za nepřímou genotoxicitu se považuje interakce s biomolekulami mimo DNA, které následně způsobují genotoxické efekty. Jedná se především o peroxidaci lipidů a vznik proteinových aduktů (Kirsch-Volders *et al*, 2003). Příčinou nadměrné tvorby ROS je především interakce TiO₂ NPs s mitochondriemi, jejímž následkem dochází k prudkému poklesu aktivity dehydrogenázy a ke změně membránového potenciálu (Ghosh *et al*, 2013).

Z toxikologických studií vyplývá, že z přechodných kovů použitých v interakci s lidskými buňkami vykazují TiO₂ NPs nejmenší zjištěnou toxicitu (Lai *et al*, 2008, Jin *et al*,

2008, Karlsson *et al*, 2008). Toxicita byla testována i na neutrofilních buňkách a ani při maximální použité koncentraci (100 $\mu\text{g/ml}$) TiO_2 NPs nezpůsobily nekrotický efekt (Goncalves *et al*, 2010).

Značná toxicita TiO_2 NPs byla však prokázána na lidských lymfatických buňkách, u kterých došlo po 24 hodinách k chromozomálním aberacím, po 48 hod k inhibici buněčného cyklu. Některé buňky však podléhaly apoptóze již po 6 hod (Wang *et al*, 2007). Oxidační stres a následné poškození DNA vlivem TiO_2 NPs bylo zjištěno také na lidských epidermálních buňkách. Použitá koncentrace TiO_2 NPs byla srovnatelná s dávkou TiO_2 NPs vyskytujících se v kosmetických přípravcích, která by mohla při menším poranění do kůže proniknout. Proto opět vyvstává otázka bezpečnosti při aplikaci těchto částic do spotřebního zboží (Shukla *et al*, 2011).

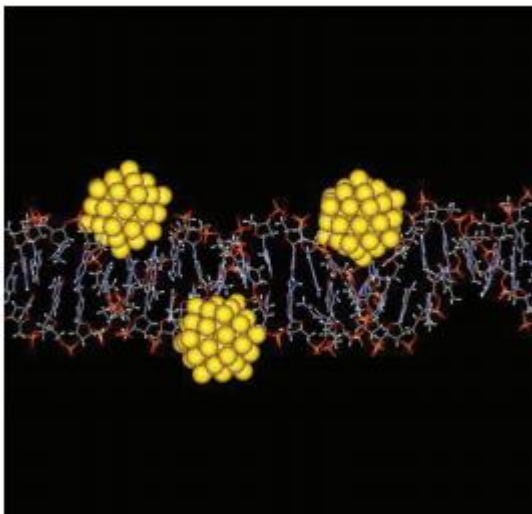
Jelikož se jedná o částice, které se vyskytují v běžně používaných materiálech, potenciální toxické efekty TiO_2 NPs jsou stále předmětem mnoha studií, avšak prozatím bez jednotných určujících výsledků. Právě velmi odlišné výsledky prokazují, že pochopení mechanismu toxicity TiO_2 NPs je velmi důležitým krokem, ke kterému však bude ještě potřeba provést další studie prováděné především *in vivo*.

3.1.3. Nanočástice zlata (Au NPs)

Jako další materiál, ze kterého se vytváří nanočástice s velmi specifickými vlastnostmi, se využívá zlato. Nanočástice zlata (Au NPs) vykazují podobně jako Ag NPs mimořádné optické vlastnosti, které z nich činí velice cenné materiály používané pro cílené dodávání léčiv a genů (Han *et al*, 2007), léčbu rakoviny a biologické zobrazování (Murphy *et al*, 2008). V závislosti na tvaru a velikosti částice dokáží Au NPs absorbovat nebo rozptýlit dopadající světlo na určitou vlnovou délku, čili fenomén zvaný lokalizovaná povrchová plazmonová rezonance (LSPR – Localized surface plasmon resonance) (Au *et al*, 2009). Au NPs vykazuje také fototermální schopnosti přeměnit blízké infračervené světlo na teplo, což má vědecký potenciál v protinádorové léčbě (Hasan *et al*, 2009).

Jelikož zlato spadá do skupiny vzácných kovů a tudíž nevykazuje skoro žádnou chemickou reaktivitu, předpokládalo se, že by nemělo vyvolat ani buněčnou toxicitu. Nanorozměr však změní chování materiálu a tím i jeho toxicitu (Panyala *et al*, 2009). Při velmi malých velikostech (1,4 nm) mohou Au NPs potenciálně navodit toxické účinky proniknutím do jádra a interagovat s DNA (viz obrázek č. 6) (Tsoli *et al*, 2005). Zlato z kovů

vykazuje největší elektronegativitu, která způsobuje přitažlivé síly mezi nanočásticemi a záporně nabitou DNA (Tsoli *et al*, 2005).



Obrázek č. 6: Irreverzibilní vazba mezi AuNPs a DNA, převzato z Tsoli *et al*, 2005

Toxikologické studie zabývající se zlatými nanočásticemi popisují rozporuplné závěry. Bylo dosaženo výsledků, které potvrzují netoxické účinky Au NPs *in vitro* (Connor *et al*, 2005, Male *et al*, 2008) a také *in vivo* (Kattumuri *et al*, 2007), avšak v rozporu s těmito výsledky existuje také mnoho takových, které toxicitu zlata potvrzují.

Toxicita Au NPs byla potvrzena také na buněčné linii lidského cervikálního karcinomu (HeLa buňky), kde byla zjištěna koncentračně závislá cytotoxicita. Po 24 hodinách byla za pomoci MTT testu nalezena hodnota IC₅₀ (koncentrace, při které odumře 50 % testovaných buněk), která odpovídala 41 µg/ml nanočástic. Následné studium morfologie buněk pomocí značení DAPI ukázalo v jádře zlomy chromozomů a fragmentaci chromatinu, což se považuje za jasný důkaz cytotoxických účinků Au NPS vůči rakovinným HeLa buňkám (Dhas *et al*, 2014). Potvrzení výsledku přinesla i další studie na HeLa buňkách, která přinesla podobnou hodnotu IC₅₀ (Pan *et al*, 2009).

In vivo studie PEG-Au NPs prokázala odlišnou distribuci částic v testované myši v závislosti na velikosti částice. Zatímco u částic o velikosti 5 a 10 nm došlo k akumulaci především v játrech myši, částice o velikosti 30 nm se nahromadily ve slezině (Zhang *et al*, 2011). Důležitou roli velikosti částice potvrdila také *in vitro* studie na několika buněčných liniích (HeLa, Sk-Mel-28, L929, J774A1). Ve studii se zabývali cytotoxickým efektem nanočástic zlata s rozdílnou velikostí. Autoři použili AuNPs o velikostech 0,8 nm, 1,2 nm, 1,4 nm, 1,8 nm a 15 nm. Po provedení MTT testu bylo zjištěno, že nejvyšší toxicitu způsobily

AuNPs o velikosti 1,4 nm ($IC_{50} = 30 - 46 \mu M$). Ostatní AuNPs působily mnohem menší toxicitu, jelikož zjištěné hodnoty pro AuNPs o velikosti 0,8 nm, 1,2 nm a 1,8 nm byly mnohem vyšší (Postupně 250, 140 a 230 μM). AuNPs o velikosti 15 nm nevykazovaly žádný toxický účinek ani při koncentracích několikrát větších než částice menší ($IC_{50} = 6300 \mu M$) (Pan *et al*, 2007). Velikost nanočástice tedy hraje klíčovou roli v biologické odpovědi organismu vůči nanočástici, což se potvrdilo také v *in vivo* studii na slávce jedlé (*Mytilus edulis*) (Tedesco *et al*, 2010).

Z uvedených výsledků studií vyplývá, že nanočástice zlata mohou způsobit cytotoxické efekty, ať už se jedná o *in vivo* nebo *in vitro* studie. Tyto účinky se však mohou využít především v biomedicínských oborech, protože bylo dokázáno, že Au NPs toxicky působí také na buňky rakovinné. Toxicita a také distribuce částic v organismu se liší podle velikosti jednotlivých částic, avšak prozatím nebyla zjištěna určitá velikost, která by způsobovala jednotné výsledky.

3.1.4. Nanočástice oxidů železa (IONPs)

Oxid železa obecně patří mezi ferromagnetický materiál, který reaguje na vnější magnetické pole vytvořením magnetického momentu ve směru siločar vnějšího pole (Mornet *et al*, 2004). Díky velmi malé velikosti se však částice mohou stát superparamagnetickými (viz kapitola 2.2.2. Jevy spojené s konečným rozměrem částic) a vykazovat silný signál i v nízkém magnetickém poli.

Těchto vlastností se využívá v biomedicínských aplikacích, kdy se částice využívají jako kontrastní látky pro magnetickou rezonanci, mediátory při magnetické hypertermii rakoviny a také jako magneticky posílené vektory pro cílené dodávání léčiv a genů (Soenen *et al*, 2009).

Jelikož se železo vyskytuje v lidském těle a hraje klíčovou roli v několika signálních dráhách, považovali ho vědci za netoxické. Následně však došlo ke zjištění, IONPs mohou způsobit příliš vysoké dávky železa uvnitř buněk. Přebytek železnatého iontu tak může zapříčinit oxidační stres a s ním spojené poškození (Soenen *et al*, 2011).

Superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPION) se podle jejich hydrodynamického průměru dělí na standard SPION (SSPIO), 50 – 150 nm; ultrasmall SPION (USPIO), <50 nm (Elias *et Tsourkas*, 2009). Velikost částic a povrchové modifikace

ovlivňují internalizaci nanočástic do buněk, intracelulární biodistribuci a potenciální toxicitu SPION (Duguet *et al*, 2006).

Vnější vrstva IONPs se dostává do kontaktu s buněčnou membránou a ovlivňuje internalizaci nanočástic (Bulte *et Kraitchman*, 2004). Aby byla zajištěná maximální biokompatibilita, povrch nanočástic se modifikuje přírodními nebo syntetickými biodegradabilními polymery. Přírodní polymery obsahují polysacharidy: např. dextran, alginát, chitosan a proteiny jako je kolagen, albumin a želatina. Mezi syntetické polymery se řadí polyester: např. poly(lactic acid) (PLA), polyetery: např. polyethylene glycol (PEG), polyanhydridy: např. poly(sebacic acid) a další (Thanh *et al*, 2012).

Řada studií se zaměřuje na porovnání cytotoxicity SPION s různými typy povrchových úprav vůči SPION bez funkcionalizační vrstvy. Bylo potvrzeno, že nanočástice magnetitu (Fe_3O_4) s dextranem na povrchu snižují buněčnou proliferaci a následně evokují buněčnou smrt (při dávce 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), stejně jako nefunkcionalizované nanočástice, avšak buňky vystavené holým nanočásticím vykazovaly mnohem výraznější porušení membrány (Berry *et al*, 2004). Nejvíce biokompatibilní vlastnosti měly nanočástice magnetitu potažené albuminem, které při stejné koncentraci nezpůsobily buněčnou smrt (Berry *et al*, 2003). Výsledky těchto studií opět potvrzují důležitou roli povrchových úprav nanočástic oxidů železa při jejich toxickém účinku. Ačkoliv se za klíčový mechanismus odpovědný za cytotoxicitu buňky považuje oxidativní stres, citrátem potažené SPION (9 nm) vykazovaly zvýšený oxidativní stres v krysích makrofázích, aniž by výrazně poklesla jejich životnost (Stroh *et al*, 2004, Petters *et al*, 2015). Nárůst oxidativního stresu byl však pouze dočasný, neboť během 24 hodin došlo k poklesu ROS na normální hladinu. Autoři se domnívají, že tento nárůst způsobily ionty železa uvolněné z nanočástic během brzké fáze inkubace. Pro testování genotoxických účinků SPION potažených meso-2,3-dimerkaptojantarovou kyselinou (DMSA) byly použity lidské fibroblasty (MSTO-211H.) Při dávkách 10 – 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ autoři nepozorovali vznik genotoxických účinků, avšak byl zaznamenán lehký avšak významný pokles životnosti buněk. Ve studii prezentovali autoři také zajímavé zjištění, jelikož SPION při koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nevykázaly sníženou životnost, ale vykázaly mírný, avšak opět statisticky významný, nárůst v metabolické aktivitě mitochondrií (Auffan *et al*, 2006).

Jiná studie se zabývala porovnáním toxicity nanočástic s rozdílnými povrchovými vlastnostmi. Různé buněčné linie (mozkové - BE-2-C, srdeční - HCM a ledvinové - HEK293)

byly značeny stejně velkými SPION – COOH, SPION – NH₂ a nemodifikovanými SPION. Funkční skupina – COOH zajišťovala negativní náboj na povrchu, částice SPION a SPION – NH₂ měly náboj pozitivní. Bylo potvrzeno, že povrchový náboj nanočástic ovlivňuje interakci s negativně nabitou buněčnou membránou. Výsledky ukázaly, že nejvyšší hodnoty cytotoxicity ve všech buněčných liniích vykazují pozitivně nabitě částice SPION – NH₂, jelikož díky svému náboji dokáží uniknout z lysozomů a dostat se do cytosolu buňky (viz obrázek č. 5: tzv. electron sponge efekt) (Mahmoudi *et al*, 2011).

SPION již dnes představují klíčovou složku používanou v biomedicínských oborech, avšak vzhledem k velkému množství různých nanočástic, které je možné syntetizovat, se při jejich použití stále nachází mnoho nejasností. Nicméně, SPION potažené dextranem patří mezi schválené kontrastní látky pro použití v medicíně (Meng *et al*, 2009).

3.1.5. Kvantové tečky (QDs)

Fluorescenční polovodičové krystaly neboli kvantové tečky se začínají stále více využívat v biologických aplikacích, především v odvětví fluorescenční mikroskopie. Univerzálnost a rozvoj fluorescenčních senzorů a značení proteinů v živých buňkách přinesl jasnější pochopení dynamiky cytoskeletu, transdukce signálu a mezibuněčných interakcí (Binz *et al*, 2004). Nicméně charakteristické fotofyzikální vlastnosti těchto fluoroforů, které zahrnují široké absorpční/emisní profily a nízké prahové hodnoty vybělení (Miyawaki *et al*, 2003), mají omezenou účinnost v dlouhodobém zobrazování a při současné detekci více než jednoho signálu (Schröck *et al*, 1996). Avšak využitím fluoroforů z kvantových teček (QDs fluorofory) se předpokládá, že by specifické vlastnosti kvantových teček mohly tyto problémy překonat (Chan *et Nie*, 1998).

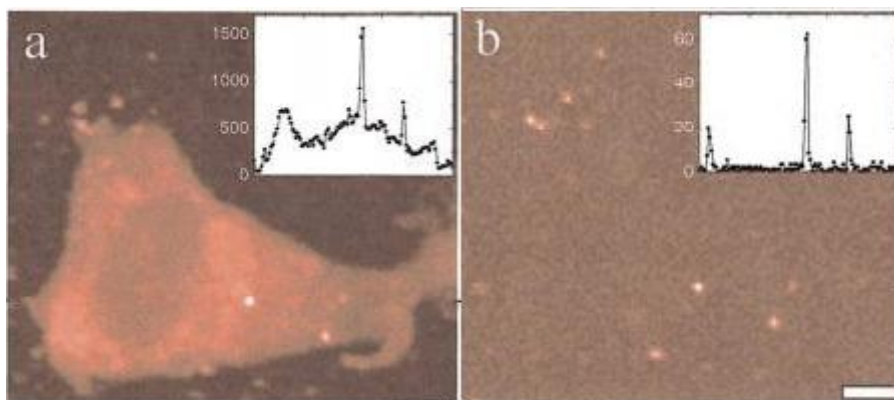
Nové generace kvantových teček tak mohou mít dalekosáhlý potenciál pro studium intracelulárních procesů na úrovni jedné molekuly, buněčné zobrazování s vysokým rozlišením, zaměřování nádorů a diagnostiky.

Vlastnosti QDs

Kvantové tečky používané v biologických aplikacích, se vyskytují výhradně ve formě koloidních nanokrystalů. Jejich tvar a velikost lze ovlivnit délkou chemické reakce, teplotou a použitím různých ligandů (Alivisatos, 1996). Mezi jedinečné vlastnosti QDs patří především vysoký kvantový výtěžek, vysoký extinkční molární koeficient ϵ (10 – 100 x vyšší než u organických barviv) (Leatherdale *et al*, 2002), velká hodnota efektivního Stokesova posunu,

vysoká odolnost proti vybělení a mimořádná odolnost proti světelné a chemické degradaci (Murphy, 2002, Alivisatos, 2004). Ve srovnání s molekulárními barvivy se u QDs vyjímá schopnost úpravy velikosti fluorescenčního emisního spektra v závislosti na velikosti jádra kvantové tečky a široké excitační spektrum, které umožňuje excitaci směsi kvantových teček pomocí jedné vlnové délky (>100 nm) odebrané z jejich spektra emisního.

Dále se kvantové tečky vyznačují dlouhodobou fluorescenční životností, která umožňuje na rozdíl od krátké životnosti většiny fluoroforů použití časově řízených detekcí (viz obrázek č. 7) (Dahan *et al*, 2001). Při této detekci dochází k oddělení signálu kvantových teček od signálu, který vzniká jako pozadí při autofluorescenci vyskytující se v buňkách, jelikož autofluorescenční životnost obvykle nepřesahuje 5 ns, zatímco fluorescenční životnost QDs může dosahovat až hodnoty 150 ns (Bouccara *et al*, 2014).



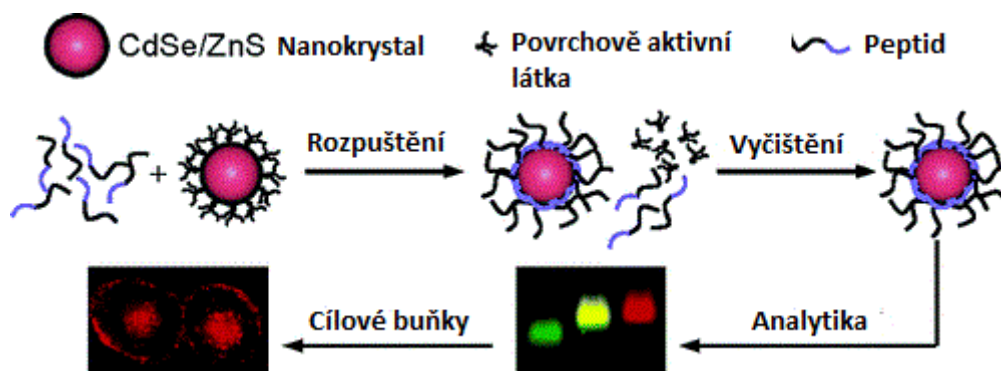
Obrázek č. 7: Časově rozlišený konfokální obraz buňky; a) obraz získaný ze všech detekovatelných fotonů; b) obraz získaný pouze z fotonů detekovatelných po 35 – 65 ns od laserového pulzu (background-free detekce QDs) převzato z (Dahan *et al*, 2001).

Stejně jako u ostatních fluoroforů může u QDs vlivem povrchových nerovností docházet na povrchu částic k oxidaci, která snižuje výsledný kvantový výtěžek. Aby se zamezilo povrchové reaktivitě, povrch QDs se pasivuje dalšími atomovými vrstvami materiálu s vyšší energií zakázaného pásu na vrchní straně jádra. Tyto obaly zvyšují fotostabilitu teček a zajišťují vyšší kvantový výtěžek (až na 90%)(Sukhanova *et al*, 2004).

Specificky modifikované QDs

Pokud se QDs nepoužívají jako nespecifické fluorescenční barvivo, vyžadují pro cílený transport určitý druh biologické molekuly. Dochází tak k vytvoření hybridů, které se skládají z anorganické nanostruktury (QDs) a biomolekuly (protilátky, protein, DNA atd.).

Tyto specificky aktivní nanomateriály vykazují vlastnosti obou konjugovaných materiálů, čili mají spektroskopický charakter nanokrystalu a biologickou funkci povrchově připojených biomolekul. Vzhledem ke konečné velikosti (srovnatelné nebo mírně větší než většina proteinů) může být jedna tečka konjugována k několika proteinům najednou. Následně se tak chová jako nanoskelet, který spojuje několik proteinů nebo jiných biomolekul k sobě a vytváří tak multifunkční nano – bio hybrid (viz obrázek č. 8) (Pinaud *et al*, 2004).



Obrázek č. 8: Multifunkční nano – bio hybrid kvantové tečky a peptidů, převzato z Pinaud *et al*, 2004.

Jako velmi výhodné biomolekuly se ukázaly přírodní peptidy. S jednoduchou výměnou peptidu se správnou sekvencí může totiž hybrid jednoduše získat všechny potřebné funkce. Peptidy navíc při konjugaci zachovávají originální konstrukci a fluorescenční vlastnosti teček, poskytují biologický cíl a umožňují začlenění více funkcí. Výsledné hybridy tak mají výborné koloidní a fluorescenční vlastnosti, biokompatibilitu a navíc může být tento peptidový komplex snadno přizpůsoben pro dodatečné funkce (Whaley *et al*, 2000).

Využití QDs

Kvantové tečky byly testovány ve většině biotechnologických aplikací, které využívají fluorescenci, jako například technologie DNA čipů, imunologické značení membránových proteinů (Sukhanova *et al*, 2004), mikrotubulů (Wu *et al*, 2003) a fluorescenční značení hybridizace chromozomů (Xiao *et al*, 2004).

Pro imunofluorescenci se u kvantových teček využívá vlastnosti teček, které i ve velmi malém počtu dokáží produkovat signál. Několik studií uvádí fenomén malých skupin kvantových teček, které mají schopnost tzv. blikání a tím poskytují dostatečný signál (Xiao *et al*, 2004, Gao, 2013). Proto lze kvantové tečky pozorovat i v takových podmínkách, kdy jedna kvantová tečka odpovídá jedné cílové molekule. Navíc se QDs vyskytují v podstatě

v neomezeném množství dobře oddělených barevných kombinacích, které mohou být všechny excitovány za pomoci jediné vlnové délky. Tato vlastnost může být využita v konfokální mikroskopii při kolokalizaci více barevných jednotlivých kvantových teček při rozlišovací schopnosti v řádu nanometrů (Lacoste *et al*, 2000).

Kvantové tečky se mohou využít i při sledování rakovinných buněk *in vivo* během metastáze (Hoshino *et al*, 2004). Došlo k vyvinutí multifunkční sondy, která se skládala z konjugátu tečky a protilátky proti nádoru (Gao *et al*, 2004). V jiné studii se autoři pokusili o odlišný přístup, když nádorové buňky označili pomocí QDs a ty následně pozorovali při postižení plicní tkáně (Voura *et al*, 2004). V obou studiích došlo pomocí fluorescenční spektroskopie k *in vivo* vizualizaci tkání, ve kterých se hromadily kvantové tečky.

Cytotoxicita kvantových teček

QDs jsou syntetizované z těžkých kovů (selenid a telurid kadmenný (CdSe, CdTe)) a jejich toxicita se snižuje obalením jádra sulfidem zinečnatým (ZnS). Toxicita je tedy zapříčiněna především uvolněním Cd^{2+} iontů z povrchu kadmiového jádra (Derfus *et al*, 2004, Kirchner *et al*, 2005). Cytotoxicita je opět způsobena jednak oxidačním stresem vyvolaným samotnými QDs, které naruší vnitrobuněčnou rovnováhu, tak i Cd^{2+} ionty.

Vznik ROS a následné poškození DNA vlivem QDs bylo popsáno ve studii (Green *et al*, 2005), ve které se vědci zaměřili na povrchovou oxidaci QDs po UV ozáření. Stejně jako životnost i oxidační stres se může úměrně měnit s koncentrací přidaného vzorku (tzv. dose-response efekt) (Lin *et al*, 2006). Životnost s koncentrací vzorku běžně klesá, avšak hladina ROS s koncentrací roste (Yan *et al*, 2011). Tento efekt byl prokázán i u nádorových buněk (MCF-7) značených QDs (Lovrić *et al*, 2005). Z této cytotoxicitní studie nadále vyplynul naprosto nový poznatek o možných příčinách toxicity způsobených QDs. Autoři se zaměřili jednak na oxidační stres vyvolaný QDs, ale také na toxicitu způsobenou uvolněními Cd^{2+} ionty. Při testech byly buňky inkubované nejen se samotnými QDs, ale také s QDs v kombinaci s N-acetylcysteinem, který slouží jako tzv. pohlcovač ROS. Právě v tomto případě byla detekována nižší toxicita než u buněk značených pouze kvantovými tečkami (Lovrić *et al*, 2005). Při testování závislosti toxicity Cd QDs na úniku volných iontů Cd^{2+} autoři potvrdili hypotézu spoluúčinku uvolněných iontů a oxidačního stresu. V těchto studiích se buňky (lidské embryonální ledvinové buňky, HEK293) naočkovaly různými koncentracemi CdTe QDs a CdCl_2 a následně se měřila jejich toxicita. Cd QDs vykazovaly vyšší toxicitu než CdCl_2 , i v případě, že koncentrace vnitrobuněčných Cd^{2+} iontů byly u obou vzorků identické.

Tento výsledek tak potvrzuje, že za cytotoxický účinek kvantových teček nezodpovídají pouze uvolněné ionty těžkých kovů, ale také nárůst hladiny reaktivních kyslíkových radikálů, které mohou poškozovat buněčné proteiny, lipidy a DNA (Chen *et al*, 2012, Su *et al*, 2010, Green *et al*, 2005).

Jak již bylo zmíněno (v kapitole 2.4. Interakce nanočástic s buňkami), toxicita je spojená s mnoha vlastnostmi nanomateriálů (velikost, tvar, reaktivita povrchu, aj.). Stejně jako jiné nanomateriály, tak i QDs vykazují rozdílnou toxicitou v závislosti na jejich velikosti (Lovrić *et al*, 2005). Z literatury vyplývá, že menší QDs ($2,2 \pm 0,1$ nm) způsobují vyšší toxicitu než větší QDs ($5,2 \pm 0,1$ nm) (Seleverstov *et al*, 2006). U buněk značených menšími QDs došlo ke kondenzaci chromozomů a tzv. membránovému blebbingu, při kterém vznikají nepravidelné záhyby plazmatické membrány (tzv. bleby) a rozvolnění cytoskeletu. Navíc QDs s tak malými rozměry prostupují do buněčného jádra a dalších vnitrobuněčných organel (Lovrić *et al*, 2005). Povrchová chemie ovlivňuje biokompatibilitu nanomateriálů, a proto se řada vědců zabývá optimalizací povrchových vlastností QDs (Karabanovas *et al*, 2014). Ke zvýšení stability QDs se používá ZnS (Bellanger *et al*, 2015), kyselina merkaptopropionová (MPA) (Zhang *et al*, 2012), ZnO (Sakly *et al*, 2014), oxid křemičitý, který nese polyethylenové skupiny (PEG-silan) (Kirchner *et al*, 2005) a polymery (Chen *et al*, 2006). Avšak MPA obal není dostatečně stabilní, aby zabránil úniku Cd^{2+} iontů z povrchu QDs. Toxická dávka takto modifikovaných CdSe QDs nastala při velice nízkých koncentracích ($0,65 \pm 0,12$ μM). Naopak CdSe QDs obaleny ZnS (síránem zinečnatým) dokázaly zamezit uvolnění Cd^{2+} iontů a snížit toxický efekt, ke kterému došlo při koncentraci $5,9 \pm 1,3$ μM (Kirchner *et al*, 2005). Povrchová chemie kvantových teček se tak může označit za důležitý faktor ve výzkumu jejich cytotoxicity.

3.1.6. Uhlíkové nanomateriály

Uhlík patří mezi nejrozšířenější přírodní prvky na zemi a nachází uplatnění v širokém okruhu aplikací, které zahrnují obrovské množství užitečných materiálů včetně nanomateriálů. Mezi nejpoužívanější uhlíkové nanomateriály se řadí uhlíkové kvantové tečky (v angličtině carbon dots, C-dots, CDs) a grafenové kvantové tečky (graphene dots GDs).

Uhlíkové tečky (CDs)

Uhlíkové tečky obecně představují kulovité uhlíkové nanočástice s hydrodynamickým průměrem menším než 10 nm, které mají vynikající fluorescenční vlastnosti. Barva fluorescence, kterou dokáží emitovat, se mění v závislosti na jejich velikosti, kdy u větších

CDs je jejich emitovaná barva posunuta více směrem k červenému spektru oproti menším tečkám (Luo *et al*, 2013). CDs tak představují novou třídu fluorescenčních nanomateriálů, které mohou velmi výrazně konkurovat obvyklým kvantovým tečkám, jelikož vykazují velmi podobné vlastnosti. Oproti klasickým kvantovým tečkám však drží CDs díky excelentní biokompatibilitě velmi důležitý trumf. V blízké době tak lze očekávat nárůst výzkumů ohledně jejich potenciálního využití jako bio senzory (Liu *et al*, 2014), sondy pro biologické zobrazení (Cao *et al*, 2007) a vektory pro cílené dodávání léčiv (Chandra *et al*, 2011).

Při porovnání s polovodičovými kvantovými tečkami jsou CDs hydrofilní a více fotostabilní (Baker *et Baker*, 2010), avšak mají nižší fluorescenci (kvantový výtěžek <15 %) (Liu *et al*, 2007). Jelikož jsou CDs biokompatibilní a slibné pro medicínské aplikace (Bhunja *et al*, 2013), (Sun *et al*, 2006), vědci se zabývají různými typy syntéz CDs a jejich povrchovými úpravami (Wang *et al*, 2011), aby fluorescenci zvýšili (Kenneth, 2011).

Toxicita CDs

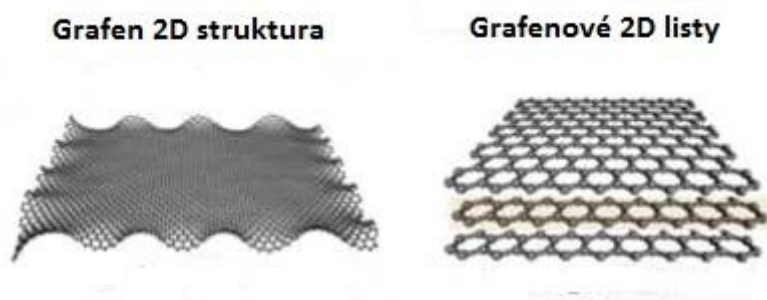
Toxicita uhlíkových teček je testována na řadě buněčných linií (MCF-7 (Dong *et al*, 2012), HT-29 (Dong *et al*, 2012), HepG2 (Ray *et al*, 2009)) z pohledů různých parametrů nanomateriálu. Nejčastěji se porovnávají rozdílné změny proliferace, životnosti a úmrtnosti, které jsou způsobené nepasivovanými CDs a modifikovanými CDs, někdy i samotnými polymery, které jsou pro modifikaci CDs používány (Dong *et al*, 2012). Ze studií (Dong *et al*, 2012) a (Ray *et al*, 2009) vyplývá, že vyšší toxicitu způsobují PEGylované CDs ve srovnání se samotnými CDs. U těchto studií je však nutné podotknout, že dochází k použití velmi vysokých koncentračních řad (100 – 1000 µg/ml), aby se ve výsledku dosáhlo hodnoty IC 50. Dávka potřebná při aplikacích CDs pro fluorescenční značení však představuje hodnotu několikanásobně nižší (Ray *et al*, 2009). Výsledky těchto studií tak opět dokazují vynikající biokompatibilní vlastnosti CDs.

Na červených krvinkách (RBC) byl sledovaný vliv CDs na hemolýzu. Po tří hodinové inkubaci erytrocytů s CDs byla porovnána rychlost hemolýzy s kontrolními RBC. V kontrolním vzorku podlelo hemolýze asi 8 % RBC, zatímco u erytrocytů inkubovaných s CDs se procenta hemolytických buněk pohybovala od 14 do 20 % v závislosti na funkcionalizaci povrchu CDs. Hemolýza nejrychleji probíhala u RBC značených nefunkcionalizovanými CDs, kdy nejvyšší hodnoty dosáhly 22,96 %. Tato studie tedy opět ukázala velmi důležitou funkci povrchových úprav CDs (Chandra *et al*, 2011).

Biokompatibilita CDs byla zkoumána také v několika in vivo testech. Testovaným myším (CD1) byly intravenózně podané 3 dávky PEG-CDs ($c = 1000 \mu\text{g/ml}$) a byly sledovány 28 dní. Během této doby nebyly u myši pozorovány žádné klinické symptomy (Yang *et al*, 2009). V další podobné studii, ve které byla myším (Balb/c) podaná vysoká dávka holých CDs (20 mg/kg váhy zvířecího modelu), nenastaly toxické účinky, výrazný pokles váhy nebo smrt (Tao *et al*, 2012). Pro lepší porozumění chování CDs in vivo došlo k testování jejich biodistribuce v těle myši. Ve studii byly připravené CDs vpraveny do myši pomocí třech různých způsobů: intravenózně, intramuskulárně a subkutánně. K metabolizaci nanočástic dochází obvykle dvěma hlavními cestami za pomoci jater (do žluči) a ledvin (do moči). Pro zjištění hlavní metabolické cesty byly CDs značeny pomocí fluorescenční značky ZW800 a následně se jejich signál detekoval v jednotlivých orgánech. Po 1 hodině od vpravení do těla myši se velká část CDs nacházela v ledvinách a pouze malé procento se detekovalo v játrech. Při porovnání metod vpravení CDs byla rychlost biodistribuce do ledvin vyhodnocena následovně: intramuskulární cesta > subkutánní cesta > intravenózní cesta. Po 24 hodinách došlo k vyloučení veškerých CDs z těla, jelikož nedocházelo k detekci žádného signálu bez ohledu na metodu vpravení CDs do těla. (Huang *et al*, 2013)

Grafen

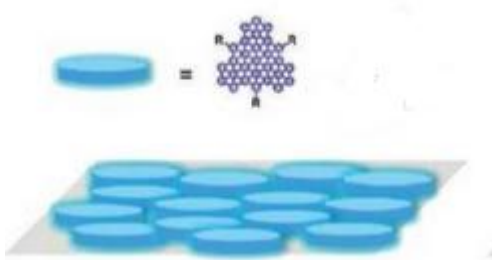
Grafen se skládá pouze z jedné vrstvy atomů uhlíku vázaných do 2D mřížky (viz obrázek č. 9). Jedná se o nový typ materiálů, který vykazuje vynikající elektrickou a tepelnou vodivost a výborné mechanické a optické (absorpční) vlastnosti. Nevýhodou pro využití grafenu je však fakt, že se jedná o materiál, který nezpůsobuje fluorescenci, dochází u něj k nízké disperzi v rozpouštědlech a může podléhat velké agregaci (Geim *et Novoselov*, 2007).



Obrázek č. 9: Struktura grafenu a tzv. grafenových listů, převzato z Sanchez *et al*, 2011.

Grafenové tečky (GDs)

GDs představují vynikající vlastnosti jejich výchozího materiálu, grafenu. Jak již bylo zmíněno dříve, jedná se o jednu vrstvu atomů uhlíku poskládaných do mřížky. Právě díky této struktuře má grafen velice specifické parametry, mezi které patří například velmi velká plocha povrchu (Zhou *et al*, 2010), vysoká transportní mobilita (Zhou *et al*, 2010), vynikající mechanická pružnost (Zhou *et al*, 2011) a excelentní termální a chemická stabilita (Zhou *et al*, 2010). Když se tyto vlastnosti spojí se specifickými fluorescenčními vlastnostmi kvantových teček (dlouhá fluorescenční životnost, odolnost vůči vybělení atd.), tak vzniká materiál velmi specifického tvaru (tzv. 2D disky, viz obrázek č. 10) a s obrovským potenciálem pro řadu biologických aplikací. V současnosti dochází k využití GDs například při výrobě elektrochemických sond (Zhao *et al*, 2011), katalýze oxidačně – redukčních reakcí (Liu *et al*, 2010) a především opět při biologickém zobrazení a značení (Sun *et al*, 2008).



Obrázek č. 10: Grafenové tečky, tzv. 2D disky, převzato z Bacon *et al*, 2014

Toxicita grafenu

Doposud je jen málo literárních zdrojů popisující toxicitu grafenu (GFNs, graphene nanosheets), avšak biologická odpověď buněk značených GFNs závisí na počtu jeho vrstev, velikosti mřížky, povrchové úpravě a hodnotě podané dávky, jako je tomu u jiných, již dostatečně prozkoumaných nanomateriálů. Názory na mechanismus toxického účinku GFNs se poměrně liší. Ačkoliv se opět předpokládá výrazný vliv reaktivních forem kyslíku (ROS), někteří autoři uvádějí jako další příčinu toxicity vliv hydrofobního povrchu GFNs, který by mohl reagovat s membránovými lipidy a narušit plazmatickou membránu (Sanchez *et al*, 2011). Specifickou vlastností grafenu je jeho tvar. Jak již bylo zmíněno, morfologie GFNs je ve formě 2D listů, které na rozdíl od ostatních nanomateriálů, přichází do styku s buněčnou kulturou z obou stran. Tato vlastnost hraje důležitou roli při metabolismu buněk a bylo zjištěno, že nižší koncentrace GFNs metabolismus buněk urychluje, zatímco vyšší koncentrace ho zpomaluje. Opačný účinek vykazují uhlíkové trubičky (složené ze svinutých

grafenových listů), čímž se potvrzuje klíčový vliv tvaru nanomateriálu na jeho cytotoxicitu (Sanchez *et al.*, 2012).

Toxicita grafenových teček (GDs)

U grafenových teček (GDs), které tvarově představují tzv. 2D disky se tento tvar paradoxně označuje za biokompatibilní. Buňky snadněji interagují s 2D disky než s klasickými kvantovými tečkami (Bacon *et al.*, 2014).

Toxicitní (resp. biokompatibilní) chování GDs bylo sledováno *in vitro* i *in vivo* studiích. U nádorových buněk MCF-7 inkubovaných 24 hod s GDs nenastal výrazný pokles životnosti ani při koncentraci 100 µg/ml, přestože GDs pronikly až do jádra (Dong *et al.*, 2012). Rozdílná biodistribuce GDs uvnitř buněk byla popsána na různých typech kmenových buněk: neurálních kmenových b. (NSCs), pankreatických kmenových b. (PPCs) a srdečních kmenových b. (CSCs). Životnost buněk neklesla na hodnoty IC 50 ani při koncentraci 200 µg/ml, avšak GQDs nepronikly do buněčného jádra a vyskytovaly se pouze v cytoplazmě (Zhang *et al.*, 2012).

Nepatrná cytotoxicita a biodistribuce GDs pouze v cytoplazmě byla potvrzena i na nádorových liniích A549 a C6, ve které byly 12 hod inkubovány s povrchově upravenými GDs: NH₂ – GDs, COOH – GDs a CO-N (CH₃)₂-GQDs. Na buněčných liniích A549 a C6 grafenové tečky nepronikly do jádra a modifikace povrchu tedy neovlivnila biokompatibilitu GDs (Yuan *et al.*, 2014).

In vivo testy byly provedeny na myších (Balb/c), kterým byla intravenózně aplikovaná dávka (20 mg/kg) každý druhý den po dobu 14 dní. Ani po 40 dnech jejich sledování, nenastaly žádné příznaky toxicity PEG-GDs. Po této době byla také provedená kompletní *in vitro* analýza z buněk odebraných ze zvířecích modelů. Z cytotoxicitních testů WST-1, LDH, ROS detekce a analýzy buněčné smrti vyplynulo, že GDs nevykazují žádnou zjevnou *in vitro* toxicitu (Chong *et al.*, 2014). GDs jsou tedy nadějně pro potenciální využití v biologických aplikacích (Nurunnabi *et al.*, 2013).

Ačkoliv většina studií uvádí, že GDs vykazují výborné biokompatibilní vlastnosti a velice nízkou toxicitu, lze najít i takové, které prezentují opačné výsledky. Toxické účinky byly prokázány na U251 buňkách (lidské buňky glioblastomu), kde GDs generovaly vznik ROS a s tím spojené zvýšení oxidačního stresu, který následně vedl k aktivaci obou typů programované buněčné smrti (apoptóza, autofágie) (Markovic *et al.*, 2012). Přestože se jedná

o ojedinělý případ, kdy GQDs vykazují výraznější cytotoxicitu, dokazuje tato studie potřebu dalšího testování GQDs pro bezpečnost jejich použití.

GQDs se považují za jedny z nejvíce biokompatibilních materiálů, což bylo mnohokrát dokázáno různými autory, avšak stále existují otázky ohledně jejich bezpečného využití, a proto je třeba každý nový nanomateriál podložit cytotoxicitní studií.

Závěr:

Tato rešerše pojednávala o toxicitě nejvyžívanějších a nejnovějších nanomateriálů, které jsou hlavním cílem řady srovnávacích studií. V první části byla rozepsána problematika oxidačního stresu a následně práce přešla na úvod do nanotechnologie. V této kapitole byly zmíněny obecné i specifické vlastnosti nanomateriálu, jejich využití i parametry, které mohou toxicitu ovlivnit. Rozdílná toxicita vybraných nanomateriálů, do kterých se řadily nanočástice stříbra, zlata, oxidů železa, kvantové tečky a uhlíkové nanostruktury (uhlíkové a grafenové kvantové tečky), byly popsány v poslední rozsáhlé kapitole. Cytotoxicita nanomateriálů představuje velmi složitý děj, na kterém se může podílet mnoho vlastností, jako jsou například velikost, tvar, povrchový náboj, povrchové úpravy a především druh materiálu, ze kterého vznikly. Nicméně, nejvíce biokompatibilní nanomateriály se jeví nanočástice uhlíku, především uhlíkové a grafenové tečky, které v mnoha studiích vykazují vynikající nejnižší toxicitu.

Vědci se všeobecně shodují, že největší procento cytotoxicity je způsobeno zvýšenou hladinou reaktivních kyslíkových forem a následným oxidačním stresem, o které tato práce pojednávala, avšak další mechanismy poškozování buněk stále zůstávají nejasné.

V následujících vědeckých letech bych se rád experimentálně zabýval podrobnou analýzou buněčných dějů a toxicitou způsobenou nanomateriály.

Literatura:

- Ahamed, M., & Siddiqui, M. K. J. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clinica Chimica Acta*, 383, 57-64
- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S. M., Schlager, J. J., & Hong, Y. (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 233, 404-410
- Alivisatos, A. P. (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, 271, 933-937
- Alivisatos, P. (2004). The use of nanocrystals in biological detection. *Nature biotechnology*, 22, 47-52
- Antonenkov, V. D., Grunau, S., Ohlmeier, S., & Hiltunen, J. K. (2010). Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxidants & redox signaling*, 13, 525-537
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicology letters*, 179, 93-100
- Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1569, 1-9
- Asharani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2008). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano*, 3, 279-290
- Asharani, P. V., Wu, Y. L., Gong, Z., & Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19, 255102
- Au, L., Zhang, Q., Copley, C. M., Gidding, M., Schwartz, A. G., Chen, J., & Xia, Y. (2009). Quantifying the cellular uptake of antibody-conjugated Au nanocages by two-photon microscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry. *ACS nano*, 4, 35-42
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-Lefranc, J. L., Botta, A., Wiesner, M. R., & Bottero, J. Y. (2006). In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environmental science & technology*, 40, 4367-4373
- Bacon, M., Bradley, S. J., & Nann, T. (2014). Graphene quantum dots. *Particle & Particle Systems Characterization*, 31, 415-428
- Baker, S. N., & Baker, G. A. (2010). Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 6726-6744
- Bastow, T. J., & Trinchì, A. (2009). NMR analysis of ferromagnets: Fe oxides. *Solid state nuclear magnetic resonance*, 35, 25-31
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271, C1424-C1437

- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87, 245-313
- Bellanger, X., Billard, P., Schneider, R., Balan, L., & Merlin, C. (2015). Stability and toxicity of ZnO quantum dots: Interplay between nanoparticles and bacteria. *Journal of hazardous materials*, 283, 110-116
- Bergey, E. J., Levy, L., Wang, X., Krebs, L. J., Lal, M., Kim, K. S., Pakatchi, S., Liebow, Ch., & Prasad, P. N. (2002). DC magnetic field induced magnetocytolysis of cancer cells targeted by LH-RH magnetic nanoparticles in vitro. *Biomedical Microdevices*, 4, 293-299
- Berry, C. C., Wells, S., Charles, S., & Curtis, A. S. (2003). Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24, 4551-4557
- Berry, C. C., Wells, S., Charles, S., Aitchison, G., & Curtis, A. S. (2004). Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, 25, 5405-5413
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress?. *Metabolism*, 49, 3-8
- Bhagwat, S., Thamankar, R., & Schumann, F. O. (2005). Evidence for superparamagnetism in ultrathin Fe and Fe_xMn 1- x films on Cu (100). *Journal of magnetism and magnetic materials*, 290, 216-218
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R. P., Hoffmann, E., & Dopp, E. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol*, 6, 8977-6
- Bhunia, S. K., Saha, A., Maity, A. R., Ray, S. C., & Jana, N. R. (2013). Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes. *Scientific reports*, 3
- Binz, P. A., Müller, M., Hoogland, C., Zimmermann, C., Pasquarello, C., Corthals, G., Sanchez, J. Ch., Hochstrasser, D. F., & Appel, R. D. (2004). The molecular scanner: concept and developments. *Current opinion in biotechnology*, 15, 17-23
- Bouccara, S., Fragola, A., Giovanelli, E., Sitbon, G., Lequeux, N., Pons, T., & Loriette, V. (2014). Time-gated cell imaging using long lifetime near-infrared-emitting quantum dots for autofluorescence rejection. *Journal of biomedical optics*, 19, 051208-051208
- Boyoglu, C., He, Q., Willing, G., Boyoglu-Barnum, S., Dennis, V. A., Pillai, S., & Singh, S. R. (2013). Microscopic studies of various sizes of gold nanoparticles and their cellular localizations. *International Scholarly Research Notices*, 2013
- Bulte, J. W., & Kraitchman, D. L. (2004). Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in Biomedicine*, 17, 484-499
- Cao, L., Wang, X., Mezziani, M. J., Lu, F., Wang, H., Luo, P. G., Lin, Y., Harruff, B. A., Veca, L. M., Murray, D., Xie, S. Y., & Sun, Y. P. (2007). Carbon dots for multiphoton bioimaging. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 11318-11319
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A., & Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to

quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 2050-2055

Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44

Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., & Wyatt, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1, 325-327

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17, 1195-1214

Dahan, M., Laurence, T., Pinaud, F., Chemla, D. S., Alivisatos, A. P., Sauer, M., & Weiss, S. (2001). Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots. *Optics letters*, 26, 825-827

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., & Milzani, A. (2007) S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 883-898

Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass spectrometry reviews*, 24, 55-99

Davis, W., Ronai, Z. E., & Tew, K. D. (2001). Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296, 1-6

Derfus, A. M., Chan, W. C., & Bhatia, S. N. (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano letters*, 4, 11-18

Dhas, T. S., Kumar, V. G., Karthick, V., Govindaraju, K., & Narayana, T. S. (2014). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Sargassum swartzii* and its cytotoxicity effect on HeLa cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 133, 102-106

Di Sia, P. (2013). Looking at the Schrödinger Equation For Nanotechnology. *System*, 2

Dong, Y., Chen, C., Zheng, X., Gao, L., Cui, Z., Yang, H., Guo, Ch., Chi, Y., & Li, Ch. M. (2012). One-step and high yield simultaneous preparation of single-and multi-layer graphene quantum dots from CX-72 carbon black. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 8764-8766

Duguet, E., Vasseur, S., Mornet, S., & Devoisselle, J. M. (2006). Magnetic nanoparticles and their applications in medicine

Durán, N., Marcato, P. D., De Souza, G. I., Alves, O. L., & Esposito, E. (2007). Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of biomedical nanotechnology*, 3, 203-208

Elias, A., & Tsourkas, A. (2009). Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *ASH Education Program Book*, 2009, 720-726

- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current opinion in cell biology*, 10, 248-253
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247
- Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O., & Van Veldhoven, P. P. (2013). Aging, age-related diseases and peroxisomes. In *Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism*. Springer Netherlands
- Fröhlich, E., Kueznik, T., Samberger, C., Roblegg, E., Wrighton, C., & Pieber, T. R. (2010). Size-dependent effects of nanoparticles on the activity of cytochrome P450 isoenzymes. *Toxicology and applied pharmacology*, 242, 326-332
- Gamaley, I. A., & Klyubin, I. V. (1999). Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *International review of cytology*, 188, 203-255
- Gao, X. (2013). Molecular Imaging with Multifunctional Nanoparticles. *Clinical chemistry*, 59, 1532-1533
- Gao, X., Cui, Y., Levenson, R. M., Chung, L. W., & Nie, S. (2004). In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology*, 22, 969-976
- Gao, X., Chan, W. C., & Nie, S. (2002). Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding. *Journal of biomedical optics*, 7, 532-537
- Geim, A. K., & Novoselov, K. S. (2007). The rise of graphene. *Nature materials*, 6, 183-191
- Gélis, C., Girard, S., Mavon, A., Delverdier, M., Paillous, N., & Vicendo, P. (2003). Assessment of the skin photoprotective capacities of an organo-mineral broad-spectrum sunblock on two ex vivo skin models. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 19, 242-253
- Ghosh, M., Chakraborty, A., & Mukherjee, A. (2013). Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1097-1110
- Gliga, A. R., Skoglund, S., Wallinder, I. O., Fadeel, B., & Karlsson, H. L. (2014). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol*, 11
- Goncalves, D. M., Chiasson, S., & Girard, D. (2010). Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 24, 1002-1008
- Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T., & Rotello, V. M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry*, 15, 897-900
- Green, M., & Howman, E. (2005). Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking. *Chem. Commun.*, 121-123

- Greulich, C., Kittler, S., Epple, M., Muhr, G., & Köller, M. (2009). Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbeck's Archives of Surgery*, 394, 495-502
- Groll, A. H., Shah, P. M., Mentzel, C., Schneider, M., Just-Nuebling, G., & Huebner, K. (1996). Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *Journal of infection*, 33, 23-32
- Haase, A., Tentschert, J., Jungnickel, H., Graf, P., Manton, A., Draude, F., Plendl, J., Goetz, M. E., Galla, S., Mašič, A., Thuenemann, A. F., Taubert, A., Arlinghaus, H. F., & Luch, A. (2011). Toxicity of silver nanoparticles in human macrophages: uptake, intracellular distribution and cellular responses. In *Journal of Physics: Conference Series* Vol. 304, p. 012030
- Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *The FASEB journal*, 1, 358-364
- Han, G., Ghosh, P., & Rotello, V. M. (2007). Functionalized gold nanoparticles for drug delivery. *Nanomedicine*, 1, 113-123
- Hartsel, S., & Bolard, J. (1996). Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends in pharmacological sciences*, 17, 445-449
- Hasan, W., Stender, C. L., Lee, M. H., Nehl, C. L., & Lee, J. (2009). Tailoring the structure of nanopyrramids for optimal heat generation. *Nano letters*, 9, 1555-1558
- Havrdova, M. (2012). In vitro study of mesenchymal stem cells labeled with magnetic nanoparticles. Olomouc, Česká Republika: Univerzita Palackého
- Heinrich, U., Fuhst, R., Rittinghausen, S., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Koch, W., & Levsen, K. (1995). Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicology*, 7, 533-556
- Held, P. (2012). An introduction to reactive oxygen species. Measurement of ROS in cells. White Paper. BioTek Instruments, Winooski
- Ho, Y. S., Liou, H. B., Lin, J. K., Jeng, J. H., Pan, M. H., Lin, Y. P., Guo, H. R., Ho, S. Y., Lee, Ch. Ch., & Wang, Y. J. (2002). Lipid peroxidation and cell death mechanisms in pulmonary epithelial cells induced by peroxynitrite and nitric oxide. *Archives of toxicology*, 76, 484-493
- Hogg, N., & Kalyanaraman, B. (1998). Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation. *Free radical research*, 28, 593-600
- Hong, H., Cao, H., & Wang, Y. (2007). Formation and genotoxicity of a guanine–cytosine intrastrand cross-link lesion in vivo. *Nucleic acids research*, 35, 7118-7127
- Hoshino, A., Hanaki, K. I., Suzuki, K., & Yamamoto, K. (2004). Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body. *Biochemical and biophysical research communications*, 314, 46-53
- Huang, X., Zhang, F., Zhu, L., Choi, K. Y., Guo, N., Guo, J., Tackett, N., Anilkumar, P., Liu, G., Quan, Q., Choi, H. S., Niu, G., Sun, Y. P., Lee, S., & Chen, X. (2013). Effect of

injection routes on the biodistribution, clearance, and tumor uptake of carbon dots. *ACS nano*, 7, 5684-5693

Huo, S., Jin, S., Ma, X., Xue, X., Yang, K., Kumar, A., Wang, P. C., Zhang, J., Hu, Z., & Liang, X. J. (2014). Ultrasmall gold nanoparticles as carriers for nucleus-based gene therapy due to size-dependent nuclear entry. *ACS nano*, 8, 5852-5862

Huo, Y., Qiu, W. Y., Pan, Q., Yao, Y. F., Xing, K., & Lou, M. F. (2009). Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators in epidermal growth factor (EGF)-stimulated corneal epithelial cell proliferation, adhesion, migration, and wound healing. *Experimental eye research*, 89, 876-886

Hussain, S. M., Braydich-Stolle, L. K., Schrand, A. M., Murdock, R. C., Yu, K. O., Mattie, D. M., Schlager, J. J., & Terrones, M. (2009). Toxicity evaluation for safe use of nanomaterials: recent achievements and technical challenges. *Advanced Materials*, 21, 1549-1559

Chae, Y. J., Pham, C. H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., & Gu, M. B. (2009). Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 94, 320-327

Chan, W. C., & Nie, S. (1998). Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281, 2016-2018

Chandra, S., Das, P., Bag, S., Laha, D., & Pramanik, P. (2011). Synthesis, functionalization and bioimaging applications of highly fluorescent carbon nanoparticles. *Nanoscale*, 3, 1533-1540

Chatterjee, K., Sarkar, S., Rao, K. J., & Paria, S. (2014). Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Advances in colloid and interface science*, 209, 8-39

Chen, H., Wang, Y., Wang, Y., Dong, S., & Wang, E. (2006). One-step preparation and characterization of PDDA-protected gold nanoparticles. *Polymer*, 47, 763-766

Chen, N., He, Y., Su, Y., Li, X., Huang, Q., Wang, H., Zhang, X., Tai, R., & Fan, C. (2012). The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials*, 33, 1238-1244

Chong, Y., Ma, Y., Shen, H., Tu, X., Zhou, X., Xu, J., Dai, J., Fan, S., & Zhang, Z. (2014). The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. *Biomaterials*, 35, 5041-5048

Jena, N. R., & Mishra, P. C. (2012). Formation of ring-opened and rearranged products of guanine: mechanisms and biological significance. *Free Radical Biology and Medicine*, 53, 81-94

Jin, C. Y., Zhu, B. S., Wang, X. F., & Lu, Q. H. (2008). Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical research in toxicology*, 21, 1871-1877

Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical reviews in toxicology*, 40, 328-346

- Jones, D. P., Eklöw, L., Thor, H., & Orrenius, S. (1981). Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Archives of biochemistry and biophysics*, 210, 505-516
- Jugan, M. L., Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Sauvaigo, S., Douki, T., & Carriere, M. (2012). Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*, 6, 501-513
- Ju-Nam, Y., & Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the total environment*, 400, 396-414
- Kabay, S. C., Ozden, H., Guven, G., Ustuner, M. C., Degirmenci, I., Olgun, E. G., & Unal, N. (2009). Protective effects of vitamin E on central nervous system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical & Investigative Medicine*, 32, 314-321
- Kaida, T., Kobayashi, K., Adachi, M., & Suzuki, F. (2003). Optical characteristics of titanium oxide interference film and the film laminated with oxides and their applications for cosmetics. *Journal of cosmetic science*, 55, 219-220
- Karabanovas, V., Zitkus, Z., Kuciauskas, D., Rotomskis, R., & Valius, M. (2014). Surface properties of quantum dots define their cellular endocytic routes, mitogenic stimulation and suppression of cell migration. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10, 775-786
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Moller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical research in toxicology*, 21, 1726-1732
- Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., & Möller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology letters*, 188, 112-118
- Kattumuri, V., Katti, K., Bhaskaran, S., Boote, E. J., Casteel, S. W., Fent, G. M., Robertson, D. J., Chandrasekhar, M., Kannan, R., & Katti, K. V. (2007). Gum Arabic as a Phytochemical Construct for the Stabilization of Gold Nanoparticles: In Vivo Pharmacokinetics and X-ray-Contrast-Imaging Studies. *Small*, 3, 333-341
- Kawata, K., Osawa, M., & Okabe, S. (2009). In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental science & technology*, 43, 6046-6051
- Kelner, M. J., & Bagnell, R. (1990). Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector. Explanation for variations in paraquat resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 10872-10875
- Kenneth, N. (2011). Toward quantitatively fluorescent carbon-based “quantum” dots. *Nanoscale*, 3, 2023-2027
- Kim, K. J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals*, 22, 235-242

- Kim, S., Choi, J. E., Choi, J., Chung, K. H., Park, K., Yi, J., & Ryu, D. Y. (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in vitro*, 23, 1076-1084
- Kirchner, C., Liedl, T., Kudera, S., Pellegrino, T., Muñoz Javier, A., Gaub, H. E., Stölzle, S., Fertig, N., & Parak, W. J. (2005). Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano letters*, 5, 331-338
- Kirkland, J. B. (1991). Lipid peroxidation, protein thiol oxidation and DNA damage in hydrogen peroxide-induced injury to endothelial cells: role of activation of poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1092, 319-325
- Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., & Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH Kinetics and stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 13908-13914
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., & Decordier, I. (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology letters*, 140, 63-74
- Labet, V., Morell, C., Grand, A., Cadet, J., Cimino, P., & Barone, V. (2008). Formation of cross-linked adducts between guanine and thymine mediated by hydroxyl radical and one-electron oxidation: a theoretical study. *Organic & biomolecular chemistry*, 6, 3300-3305
- Lacoste, T. D., Michalet, X., Pinaud, F., Chemla, D. S., Alivisatos, A. P., & Weiss, S. (2000). Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 9461-9466
- Lai, J. C., Lai, M. B., Jandhyam, S., Dukhande, V. V., Bhushan, A., Daniels, C. K., & Leung, S. W. (2008). Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *International journal of nanomedicine*, 3, 533
- Lambeth, J. D. (2007). Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 332-347
- Law, W. C., Yong, K. T., Roy, I., Xu, G., Ding, H., Bergey, E. J., Zeng, H., & Prasad, P. N. (2008). Optically and magnetically doped organically modified silica nanoparticles as efficient magnetically guided biomarkers for two-photon imaging of live cancer cells†. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112, 7972-7977
- Leatherdale, C. A., Woo, W. K., Mikulec, F. V., & Bawendi, M. G. (2002). On the absorption cross section of CdSe nanocrystal quantum dots. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106, 7619-7622
- Leroueil, P. R., Berry, S. A., Duthie, K., Han, G., Rotello, V. M., McNerny, D. Q., Baker, J. R., Orr, B. G., & Holl, M. M. (2008). Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano letters*, 8, 420-424
- Lin, W., Huang, Y. W., Zhou, X. D., & Ma, Y. (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 217, 252-259

- Liu, G., Swierczewska, M., Lee, S., & Chen, X. (2010). Functional nanoparticles for molecular imaging guided gene delivery. *Nano Today*, 5, 524-539
- Liu, H., Ye, T., & Mao, C. (2007). Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot. *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 6473-6475
- Liu, R., Wu, D., Feng, X., & Müllen, K. (2010). Nitrogen-Doped Ordered Mesoporous Graphitic Arrays with High Electrocatalytic Activity for Oxygen Reduction. *Angewandte Chemie*, 122, 2619-2623
- Liu, S., & Tang, Z. (2010). Nanoparticle assemblies for biological and chemical sensing. *Journal of Materials chemistry*, 20, 24-35
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, 80, 780-787
- Liu, Y., Zhao, Y., & Zhang, Y. (2014). One-step green synthesized fluorescent carbon nanodots from bamboo leaves for copper (II) ion detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 196, 647-652
- Lovrić, J., Bazzi, H. S., Cuie, Y., Fortin, G. R., Winnik, F. M., & Maysinger, D. (2005). Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *Journal of Molecular Medicine*, 83, 377-38
- Lovrić, J., Cho, S. J., Winnik, F. M., & Maysinger, D. (2005). Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chemistry & biology*, 12, 1227-1234
- Luo, P. G., Sahu, S., Yang, S. T., Sonkar, S. K., Wang, J., Wang, H., LeCroy, G. E., & Sun, Y. P. (2013). Carbon “quantum” dots for optical bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 2116-2127
- Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M. A., & Hosseinkhani, M. (2011). Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell “vision” versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS nano*, 5, 7263-7276
- Male, K. B., Lachance, B., Hrapovic, S., Sunahara, G., & Luong, J. H. (2008). Assessment of cytotoxicity of quantum dots and gold nanoparticles using cell-based impedance spectroscopy. *Analytical chemistry*, 80, 5487-5493
- Markovic, Z. M., Ristic, B. Z., Arsikin, K. M., Klisic, D. G., Harhaji-Trajkovic, L. M., Todorovic-Markovic, B. M., Kepic, D. P., Kravic-Stevovic, T. K., Jovanovic, S. P., Milenkovic, M. M., Milivojevic, D. D., Bumbasirevic, V. Z., Dramicanin, M. D., & Trajkovic, V. S. (2012). Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. *Biomaterials*, 33, 7084-7092
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16, 577-586
- McFarland, A. D., & Van Duyne, R. P. (2003). Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *Nano letters*, 3, 1057-1062

- Meng, J., Fan, J., Galiana, G., Branca, R. T., Clasen, P. L., Ma, S., Zhou, J., Leuschner, C., Kumar, C. S. S. R., Hormes, J., Otiti, T., Beye, A. C., Harmer, M. P., Kiely, C. J., Warren, W., Haataja, M. P., & Soboyejo, W. O. (2009). LHRH-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for breast cancer targeting and contrast enhancement in MRI. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 1467-1479
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 243, 5753-5760
- Miyawaki, A. (2003). Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. *Developmental cell*, 4, 295-305
- Møller, P., Jacobsen, N. R., Folkmann, J. K., Danielsen, P. H., Mikkelsen, L., Hemmingsen, J. G., Vesterdal, L. K., Forchhammer, L., Wallin, H., & Loft, S. (2009). Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free radical research*, 44, 1-46
- Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F., & Duguet, E. (2004). Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *Journal of Materials Chemistry*, 14, 2161-2175
- Murphy, C. J. (2002). Peer reviewed: optical sensing with quantum dots. *Analytical Chemistry*, 74, 520-A
- Murphy, C. J., Gole, A. M., Hunyadi, S. E., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A., Kinard, B. E., & Hankins, P. (2008). Chemical sensing and imaging with metallic nanorods. *Chemical Communications*, 544-557
- Murphy, M. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J*, 417, 1-13
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., & Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*, 8, 543-557
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N., (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 622-627
- Nurunnabi, M., Khatun, Z., Huh, K. M., Park, S. Y., Lee, D. Y., Cho, K. J., & Lee, Y. K. (2013). In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots. *ACS nano*, 7, 6858-6867
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H., & Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre toxicology*, 2, 8
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 73, 1712-1720
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U., & Jahnen-Dechent, W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*, 5, 2067-2076

- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., & Jahnen-Dechent, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3, 1941-1949
- Pant, H. R., Pant, B., Sharma, R. K., Amarjargal, A., Kim, H. J., Park, C. H., Parka, Ch. H., Tijing, L. D., & Kim, C. S. (2013). Antibacterial and photocatalytic properties of Ag/TiO₂/ZnO nano-flowers prepared by facile one-pot hydrothermal process. *Ceramics International*, 39, 1503-1510
- Panyala, N. R., Peña-Méndez, E. M., & Josef, H. (2009). Gold and nano-gold in medicine: overview, toxicology and perspectives
- Park, E. J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., & Park, K. (2010). Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro*, 24, 872-878
- Park, H. S., Lee, S. H., Park, D., Lee, J. S., Ryu, S. H., Lee, W. J., Rhee, S. G., & Bae, Y. S. (2004). Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, β Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H₂O₂. *Molecular and cellular biology*, 24, 4384-4394
- Perrier, S., Hau, J., Gasparutto, D., Cadet, J., Favier, A., & Ravanat, J. L. (2006). Characterization of lysine-guanine cross-links upon one-electron oxidation of a guanine-containing oligonucleotide in the presence of a trilycine peptide. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 5703-5710
- Petters, C., & Dringen, R. (2015). Accumulation of iron oxide nanoparticles by cultured primary neurons. *Neurochemistry international*, 81, 1-9
- Pinaud, F., King, D., Moore, H. P., & Weiss, S. (2004). Bioactivation and cell targeting of semiconductor CdSe/ZnS nanocrystals with phytochelatin-related peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 6115-6123
- Potara, M., Baia, M., Farcau, C., & Astilean, S. (2012). Chitosan-coated anisotropic silver nanoparticles as a SERS substrate for single-molecule detection. *Nanotechnology*, 23, 055501
- Prinz, G. A. (1998). Magnetoelectronics. *Science*, 282, 1660-1663
- Ray, S. C., Saha, A., Jana, N. R., & Sarkar, R. (2009). Fluorescent carbon nanoparticles: synthesis, characterization, and bioimaging application. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113, 18546-18551
- Roiter, Y., Ornatska, M., Rammohan, A. R., Balakrishnan, J., Heine, D. R., & Minko, S. (2009). Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces. *Langmuir*, 25, 6287-6299
- Rouch, D. A., Lee, B. T., & Morby, A. P., (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of industrial microbiology*, 14, 132-141
- Roy, S., Das, D., Chakravorty, D., & Agrawal, D. C. (1993). Magnetic properties of glass-metal nanocomposites prepared by the sol-gel route and hot pressing. *Journal of applied physics*, 74, 4746-4749

- Ruch, W., Cooper, P. H., & Baggiolini, M. (1983). Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. *Journal of immunological methods*, 63, 347-357
- Sakly, N., Said, A. H., & Ouada, H. B. (2014). Humidity-sensing properties of ZnO QDs coated QCM: Optimization, modeling and kinetic investigations. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 27, 130-139
- Sakuma, S., Abe, M., Kohda, T., & Fujimoto, Y. (2015). Hydrogen peroxide generated by xanthine/xanthine oxidase system represses the proliferation of colorectal cancer cell line Caco-2. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 56, 15-19
- Sanders, S. A., Eisenthal, R., & Harrison, R. (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. *European Journal of Biochemistry*, 245(3), 541-548.
- Sanchez, V. C., Jachak, A., Hurt, R. H., & Kane, A. B. (2011). Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chemical research in toxicology*, 25, 15-34
- Sczepanski, J. T., Wong, R. S., McKnight, J. N., Bowman, G. D., & Greenberg, M. M. (2010). Rapid DNA–protein cross-linking and strand scission by an abasic site in a nucleosome core particle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 22475-22480
- Seleverstov, O., Zahirnyk, O., Zscharnack, M., Bulavina, L., Nowicki, M., Heinrich, J. M., Yezhelyev, M., Emmrich, F., O'Regan, R., & Bader, A. (2006). Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation. *Nano letters*, 6, 2826-2832
- Shaal, L. A., Müller, R. H., & Keck, C. M. (2010). Preserving hesperetin nanosuspensions for dermal application. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, 86-92
- Shen, J., Zhu, Y., Yang, X., & Li, C. (2012). Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. *Chemical Communications*, 48, 3686-3699
- Shrivastava, K., & Wu, H. F. (2008). Modified silver nanoparticle as a hydrophobic affinity probe for analysis of peptides and proteins in biological samples by using liquid-liquid microextraction coupled to AP-MALDI-ion trap and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 80, 2583-2589
- Shukla, R. K., Sharma, V., Pandey, A. K., Singh, S., Sultana, S., & Dhawan, A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in Vitro*, 25, 231-241
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, 21, 10644-10654
- Schellhorn, H. E. (1995). Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 131, 113-119

- Schröck, E., Du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M. A., Ning, Y., Ledbetter, D. H., Bar-Am, I., Soenksen, D., Garini, Y., & Ried, T. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273(5274), 494-497.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82, 291-295
- Skalická, Z. F., Zölzer, F., Beránek, L., & Racek, J. (2012). Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117, 111-114
- Soenen, S. J., Himmelreich, U., Nuytten, N., & De Cuyper, M. (2011). Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*, 32, 195-205
- Soenen, S. J., Hodenius, M., & De Cuyper, M. (2009). Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine. *Nanomedicine*, 4, 177-191
- Stroh, A., Zimmer, C., Gutzeit, C., Jakstadt, M., Marschinke, F., Jung, T., Pilgrim, H., & Grune, T. (2004). Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 976-984
- Su, Y., Hu, M., Fan, C., He, Y., Li, Q., Li, W., Lang, L. H., Shen, P., & Huang, Q. (2010). The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties. *Biomaterials*, 31, 4829-4834
- Sukhanova, A., Devy, J., Venteo, L., Kaplan, H., Artemyev, M., Oleinikov, V., Klinov, D., Pluot, M., Cohen, J. H. M., & Nabiev, I. (2004). Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Analytical biochemistry*, 324, 60-67
- Sun, X., Liu, Z., Welsher, K., Robinson, J. T., Goodwin, A., Zaric, S., & Dai, H. (2008). Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano research*, 1, 203-212
- Sun, Y. P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K. S., Pathak, P., Mezziani, M. J., Harruff, B. A., Wang, X., Wang, H., Luo, P. G., Yang, H., Kose, M. E., Chen, B., Veca, L. M., & Xie, S. Y. (2006). Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 7756-7757
- Suominen, T., Raittila, J., Salminen, T., Schlesier, K., Lindén, J., & Paturi, P. (2007). Magnetic properties of fine SFMO particles: Superparamagnetism. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 309, 278-284
- Tang, J., Kong, B., Wu, H., Xu, M., Wang, Y., Wang, Y., Zhao, D., & Zheng, G. (2013). Carbon nanodots featuring efficient FRET for real-time monitoring of drug delivery and two-photon imaging. *Advanced Materials*, 25, 6569-6574
- Tao, H., Yang, K., Ma, Z., Wan, J., Zhang, Y., Kang, Z., & Liu, Z. (2012). In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite. *Small*, 8, 281-290

- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G., & Sheehan, D. (2010). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 100, 178-186
- Thanh, N. T. (Ed.). (2012). *Magnetic nanoparticles: from fabrication to clinical applications*. CRC Press
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, L1005-L1028
- Tripathi, A., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M., & Mukherjee, A. (2009). Antibacterial applications of silver nanoparticles synthesized by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. *Journal of Biomedical nanotechnology*, 5, 93-98
- Tsoli, M., Kuhn, H., Brandau, W., Esche, H., & Schmid, G. (2005). Cellular uptake and toxicity of Au₅₅ clusters. *Small*, 1, 841-844
- Tucek, J. (2008). *Magnetism of nanoparticles of iron oxides and double perovskite of Sr₂FeRuO₆ type*. Olomouc, Česká Republika: Univerzita Palackého
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C*, 27, 120-139
- Verma, A., Uzun, O., Hu, Y., Hu, Y., Han, H. S., Watson, N., Chen, S., Irvine, D. J., & Stellacci, F. (2008). Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nature materials*, 7, 588-595
- Voura, E. B., Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., & Simon, S. M. (2004). Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nature medicine*, 10, 993-998
- Wang, G., Chang, Y., Wang, L., Wei, Z., Kang, J., Sang, L., Dong, X., Chen, G., Wang, H., & Qi, M. (2013). Preparation and characterization of PVPI-coated Fe₃O₄ nanoparticles as an MRI contrast agent. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 340, 57-60
- Wang, J. J., Sanderson, B. J., & Wang, H. (2007). Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628, 99-106
- Wang, X., Cao, L., Lu, F., Mezziani, M. J., Li, H., Qi, G., Zhou, B., Harruff, B. A., Kermarrec, F., & Sun, Y. P. (2009). Photoinduced electron transfers with carbon dots. *Chem. Commun.*, 3774-3776
- Wang, Y., Anilkumar, P., Cao, L., Liu, J. H., Luo, P. G., Tackett, K. N., Sahu, S., Wang, P., Wang, X., & Sun, Y. P. (2011). Carbon dots of different composition and surface functionalization: cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging. *Experimental Biology and Medicine*, 236, 1231-1238
- Wardman, P. (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free radical biology and medicine*, 43, 995-1022

- Warheit, D. B., Sayes, C. M., Reed, K. L., & Swain, K. A. (2008). Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacology & therapeutics*, 120, 35-42
- Wellman, B. J., Howard III, M. A., Dacey, R. G., Grady, M. S., Ritter, R. C., & Gilles, G. T. (1998). Magnetically guided interventional medicine. In *BiOS'98 International Biomedical Optics Symposium* pp. 15-25
- Whaley, S. R., English, D. S., Hu, E. L., Barbara, P. F., & Belcher, A. M. (2000). Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature*, 405, 665-668
- Wilhelm, C., Lavialle, F., P echoux, C., Tatischeff, I., & Gazeau, F. (2008). Intracellular trafficking of magnetic nanoparticles to design multifunctional biovesicles. *Small*, 4, 577-582
- Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P., Ge, N., Peale, F., & Bruchez, M. P. (2003). Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology*, 21, 41-46
- Xiao, Y., & Barker, P. E. (2004). Semiconductor nanocrystal probes for human metaphase chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 32, e28-e28
- Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J. F., & Willner, I. (2003). "Plugging into enzymes": Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science*, 299, 1877-1881
- Xu, Y. H., Bai, J., & Wang, J. P. (2007). High-magnetic-moment multifunctional nanoparticles for nanomedicine applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311, 131-134
- Yan, M., Zhang, Y., Xu, K., Fu, T., Qin, H., & Zheng, X. (2011). An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicology*, 282, 94-103
- Yang, S. T., Wang, X., Wang, H., Lu, F., Luo, P. G., Cao, L., Mezzani, M. J., Liu, J. H., Liu, Y., Chen, M., Huang, Y., & Sun, Y. P. (2009). Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113, 18110-18114
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, 111, 5944-5972
- Yu, J., Zhang, L., Cheng, B., & Su, Y. (2007). Hydrothermal preparation and photocatalytic activity of hierarchically sponge-like macro-/mesoporous titania. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111, 10582-10589
- Yuan, X., Liu, Z., Guo, Z., Ji, Y., Jin, M., & Wang, X. (2014). Cellular distribution and cytotoxicity of graphene quantum dots with different functional groups. *Nanoscale research letters*, 9, 1-9
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 337-349

- Zhang, M., Bai, L., Shang, W., Xie, W., Ma, H., Fu, Y., Fang, D., Sun, H., Louzhen, F., Han, M., Liu, Ch., & Yang, S. (2012). Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 7461-7467
- Zhang, Q., Zhu, L., Feng, H., Ang, S., Chau, F. S., & Liu, W. T. (2006). Microbial detection in microfluidic devices through dual staining of quantum dots-labeled immunoassay and RNA hybridization. *Analytica chimica acta*, 556, 171-177
- Zhang, W., Lin, K., Sun, X., Dong, Q., Huang, C., Wang, H., Guo, M., & Cui, X. (2012). Toxicological effect of MPA-CdSe QDs exposure on zebrafish embryo and larvae. *Chemosphere*, 89, 52-59
- Zhang, X. D., Wu, D., Shen, X., Liu, P. X., Yang, N., Zhao, B., Zhang, B., Sun, Y. M., Zhang, L. A., & Fan, F. Y. (2011). Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6, 2071
- Zhao, J., Chen, G., Zhu, L., & Li, G. (2011). Graphene quantum dots-based platform for the fabrication of electrochemical biosensors. *Electrochemistry Communications*, 13, 31-33
- Zhou, K., Zhu, Y., Yang, X., & Li, C. (2010). Electrocatalytic Oxidation of Glucose by the Glucose Oxidase Immobilized in Graphene-Au-Nafion Biocomposite. *Electroanalysis*, 22, 259-264
- Zhou, K., Zhu, Y., Yang, X., & Li, C. (2010). One-pot preparation of graphene/Fe₃O₄ composites by a solvothermal reaction. *New Journal of Chemistry*, 34, 2950-2955
- Zhou, K., Zhu, Y., Yang, X., Jiang, X., & Li, C. (2011). Preparation of graphene-TiO₂ composites with enhanced photocatalytic activity. *New Journal of Chemistry*, 35, 353-359
- Zhou, K., Zhu, Y., Yang, X., Luo, J., Li, C., & Luan, S. (2010). A novel hydrogen peroxide biosensor based on Au-graphene-HRP-chitosan biocomposites. *Electrochimica Acta*, 55, 3055-3060
- Zhou, L., Lin, Y., Huang, Z., Ren, J., & Qu, X. (2012). Carbon nanodots as fluorescence probes for rapid, sensitive, and label-free detection of Hg²⁺ and biothiols in complex matrices. *Chem. Commun.*, 48, 1147-1149
- Zhu, L., Ang, S., & Liu, W. T. (2004). Quantum dots as a novel immunofluorescent detection system for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. *Applied and environmental microbiology*, 70, 597-598

Seznam použitých zkratk:

Označení nanočástic

Ag NPs	nanočástice stříbra
TiO ₂ NPs	nanočástice oxidu titaničitého
Au NPs	nanočástice zlata
IONPs	nanočástice oxidů železa
SPION	superparamagnetické nanočástice oxidů železa
QDs	kvantové tečky
C-dots, CDs	uhlíkové tečky
GDs	grafenové tečky
GFNs	grafenové nanolisty

Buněčné linie a kmeny zvířecích modelů

THP-1	lidské monocyty
BEAS-2B	buňky lidského plicního epitelu
A549	buňky lidského plicního karcinomu
HeLa	buňky lidského cervikálního karcinomu
Sk-Mel-28	buňky lidského kožního melanomu
L929	buňky myšího fibrosarkomu
J774A1	buňky myších makrofágů
MSTO-211H	buňky lidských fibroblastů
BE-2-C	buňky lidského neuroblastomu
HMC	buňky lidských srdečních myocytů
HEK293	buňky lidských embryonálních ledvin
MCF-7	buňky lidské rakoviny prsu
HT-29	buňky lidského karcinomu tlustého střeva
HepG2	buňky lidského karcinomu jater

RBC	červené krvinky
CD1	kmen myši
Balb/c	kmen myši
NSCs	neurální kmenové buňky
PPCs	pankreatické kmenové buňky
CSCs	srdeční kmenové buňky
C6	buňky potkaních gliových fibroblastů

Ostatní použité zkratky

ROS	reaktivní kyslíkové radikály/reaktivní kyslíkové formy
GSH	glutathion
TRX	thioredoxin
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NOX	NADPH oxidáza
PMRS	redoxní systém plazmatické membrány
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
NF- κ B, HSF1	transkripční faktory
SOD	superoxid dismutáza
GPx	glutathion peroxidáza
AB	alamar blue
LDH	laktát dehydrogenáza
SERS	ramanova spektroskopie
LSPR	lokalizovaná povrchová plazmonová rezonance
PLA	poly(lactic acid)
PEG	polyethylen glykol
DMSA	kyselina meso-2,3-dimerkaptojantarová

MPA	kyselina merkaptoproionová
In vitro	pokusy ve zkumavkách
In vivo	pokusy na zvířecích modelech
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
MRI	zobrazení magnetickou rezonancí
WST-1	4-[3-(4-Idophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate
8OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosin
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
H2DCFDA-AM	acetomethylový ester 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetátu