

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI



Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální fyziky

Magisterská práce

Cytotoxicita uhlíkových nanomateriálů

Autor: Bc. Lucie Hubáčková

Vedoucí práce: Mgr. Milan Vůjtek, Ph.D.

Studijní obor: Nanotechnologie

Forma studia: Prezenční

Rok: 2014

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Lucie Hubáčková

Název práce: Cytotoxicita uhlíkových nanomateriálů

Typ práce: magisterská

Pracoviště: Katedra experimentální fyziky

Vedoucí práce: Mgr. Milan Vůjtek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Počet stran: 69

Počet příloh: 7

Jazyk: český

Abstrakt: Tato práce byla zaměřena na testování cytotoxicity kvantových uhlíkových teček, a to zejména viability a oxidačního stresu za použití speciálních kitů. Pro testy byly použity uhlíkové kvantové tečky Quaternized Carbon Dots (QCDs) a Gallate – derived carbon dots (GU5). Cytotoxicita byla měřena na myších fibroblastech NIH3T3. Buněčné reakce fibroblastů s uhlíkovými kvantovými tečkami byly sledovány optickou mikroskopií. Výsledky testu viability naznačují, že GU5 jsou méně toxické než QCDs.

Klíčová slova: MTT, ROS, uhlíkové kvantové tečky, cytotoxicita

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Lucie Hubáčková

Title: Cytotoxicity of carbon nanomaterials

Type of thesis: master

Department: Department of Experimental Physics

Supervisor: Mgr. Milan Vůjtek, Ph.D.

Year of presentation: 2014

Number of pages: 69

Number of appendices: 7

Language: Czech

Abstract: My thesis is focused on cytotoxicity of quantum carbon dots, especially viability and oxygen stress, both with the help of special kits. During the test we used carbon quantum dots Quaternized Carbon Dots (QCDs) and Gallate – derived carbon dots (GU5). Cytotoxicity was tested on murine fibroblasts NIH3T3. Interaction between fibroblast and carbon quantum dots were monitoring by optical microscopy. Results of viability test suggest minor toxicity of GU5 in comparison with QCDs.

Keywords: MTT, ROS, carbon quantum dots, cytotoxicity

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Milana Vůjtky, Ph.D., Mgr. Markéty Havrdové, Ing. Kateřiny Tománkové, Ph.D., a že jsem použila zdrojů, které cituji a uvádím v seznamu použitých zdrojů.

V Olomouci dne.....

.....

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat zejména paní Mgr. Markétě Havrdové za vedení a pomoc při zpracování této diplomové práce. Další poděkování patří paní Ing. Kateřině Tománkové, Ph.D., především za trpělivost při vedení v praktické části. Poděkovat bych chtěla také panu Mgr. Milanovi Vůjtkovi, Ph.D., za cenné rady a připomínky při zpracování práce.

V neposlední řadě děkuji paní Mgr. Kateřině Holé z RCPTM a panu Athanasiosovi B. Bourlinosovi z řecké Univerzity v Ioannině za poskytnutí syntetizovaných uhlíkových teček.

Obsah

Úvod	7
1 Teoretická část	8
1.1 Nanomateriály.....	8
1.1.1 Použití nanomateriálů	8
1.1.2 Výroba nanomateriálů	8
1.2 Uhlíkové nanomateriály	8
1.2.1 Fulleren	9
1.2.2 Grafen.....	10
1.2.3 Nanotrubice	13
1.2.4 Kvantové tečky.....	20
1.2.5 Uhlíkové kvantové tečky.....	25
1.3 Buňka.....	26
1.3.1 Stavba buňky	26
1.3.2 Buněčná reprodukce	27
1.3.3 Buněčná smrt	27
1.3.4 Pronikání nanočástic do buňky	29
1.4 Toxicita	30
1.4.1 ROS.....	30
1.4.2 Měření toxicity in vitro.....	31
1.4.3 Toxicita grafenu.....	34
1.4.4 Toxicita uhlíkových nanotrubic	35
1.4.5 Toxicita kvantových teček (QD-CdSe a QCD)	37
2 Praktická část	41
2.1 Popis experimentálního vybavení.....	42
2.2 Příprava vzorku na měření	43
3 Výsledky a diskuze.....	46
Závěr.....	55
Seznam použitých zdrojů	56
Přílohy	63

Úvod

Nanomateriály mají alespoň jeden ze tří rozměrů menší než 100 nm a mají jiné vlastnosti než jejich objemové materiály. Díky těmto odlišným vlastnostem se můžeme setkat u nanomateriálů s mnoha zajímavými aplikacemi. Mohou být využity v průmyslu, ve fyzice, v chemii a v medicíně. V medicíně se nanomateriály mohou uplatnit pro transport léčiv, jako biosenzory, tkáňové podpory nebo jako zobrazovací kontrastní látky. Proto je toxicita nanomateriálů v současné době velice zkoumané téma. Nanomateriály tvořené z uhlíku se zdají být více biokompatibilní než nanomateriály vyrobené z těžkých kovů.

Cílem práce bylo teoretické sepsání fyzikálních vlastností uhlíkových nanomateriálů, které mají vysoký potenciál pro využití v bioaplikacích, sledování buněčných reakcí na nově syntetizované uhlíkové nanomateriály pomocí mikroskopie. A dále pak pokročilejší testování cytotoxicity – viability (životnosti) a oxidačního stresu pomocí speciálních kitů a jejich vyhodnocení.

Cytotoxicita byla měřena na myších fibroblastech (buněčné linii NIH3T3). Toxicita byla testována na dvou vzorcích uhlíkových kvantových teček, které byly syntetizované jiným způsobem. Uhlíkové tečky GU5 byly syntetizované podle článku [60]. Přibližný rozměr GU5 (Gallate – derived carbon dots) je 7 nm. Uhlíkové tečky QCDs (Quaternized Carbon Dots) syntetizované podle článku [61] měly velikost 4-9 nm.

1 Teoretická část

1.1 Nanomateriály

Nanomateriály jsou prostorové útvary, které mají alespoň jeden z rozměrů menší než 100 nm. Materiály, které mají pouze jeden rozměr menší než 100 nm, jsou ve formě tenkých filmů. Kvantové dráty nebo uhlíkové nanotrubičky jsou materiály, které mají nanometrovou velikost ve dvou rozměrech. Mezi materiály, které jsou nanometrově omezeny ve všech třech dimenzích, patří koloidy a kvantové tečky. Tyto materiály mohou mít rozdílné vlastnosti od svých objemových protějšků. Mezi odlišné vlastnosti nanomateriálů můžeme zařadit kvantové jevy a větší plochu povrchu na jednotku hmotnosti, které mají za následek změnu fyzikálních vlastností – mechanických, optických, elektrických a magnetických.

1.1.1 Použití nanomateriálů

Nanomateriály – nanotrubičky, kvantové tečky, fullereny, grafen, nanovlákná, nanočástice, jsou používány například v elektronice jako záznamová média, displeje, v chemii jako katalyzátory a samočisticí povrchy. Dále se nanomateriály používají v čištění odpadních vod, jako izolační materiály, v palivových článcích nebo na výrobu antibakteriálních oděvů. Zajímavé využití našly tyto materiály v medicíně. Zde se využívají jako kontrastní látky, pro transport léčiv, pro své antibakteriální účinky. Překvapivé uplatnění nanomateriálů nacházíme také v tkáňovém inženýrství. [1]

1.1.2 Výroba nanomateriálů

Nanomateriály se vyskytují v přírodě např. při vulkanické činnosti nebo při lesních požárech. Vytvářejí se i při antropogenní činnosti a to jako nežádoucí produkty při spalování benzínu a nafty ve spalovacích motorech a při kouření cigaret. Nanomateriály mohou být vyrobeny také synteticky. [2]

1.2 Uhlíkové nanomateriály

Základním stavebním prvkem uhlíkových nanomateriálů, jako jsou nanotrubičky, grafen, fulleren a kvantové tečky, je uhlík. Jedná se o chemický prvek, který řadíme mezi nekovy. Jako pevná krystalická látka se uhlík vyskytuje v několika formách.

V přírodně se uhlík vyskytuje ve formě diamantu a grafitu. Diamant krystalizuje v kubické soustavě, nejčastěji v osmistěnech. Jeho krystaly jsou buď bezbarvé a průhledné anebo různě zbarvené. Dobře lámou světlo a mají hustotu $3,51 \text{ g/cm}^3$. Na každém atomu uhlíku jsou kovalentně navázány další čtyři atomy. Struktura diamantu a velká pevnost vazeb způsobuje mimořádnou tvrdost (nejtvrdší přírodní látka, 10. člen Mohsovy stupnice tvrdosti), vysokou teplotu tání ($3500 \text{ }^\circ\text{C}$) a nízkou chemickou reaktivitu. Diamant je elektricky nevodivý. Grafit neboli tuha má vrstevnatou strukturu. Krystaly tuhy jsou měkké, šupinaté a snadno štípatelné podél vrstev. Elektronové systémy delokalizovaných π -orbitalů, což má za následek černé zbarvení a kovový lesk. Atomy uhlíku jsou uspořádány méně těsně než v diamantu. Tuha se vyskytuje v hexagonální a ortorombické soustavě. Grafit je velice měkký materiál (0,5-1. člen na Mohsově stupnici tvrdosti). [3]

1.2.1 Fulleren

Fulleren byl objeven v roce 1996 (David Jones) a byl pojmenován podle Richarda Buckminstera Fullerena. Jsou to sférické molekuly, skládající se z dvanácti pětičlenných a různého počtu šestičlenných uhlíkových cyklů. Zatím nejstabilnější a nejvíce používaný je fulleren C_{60} (Obr. 1). Jedná se o nejmenší známý fulleren, ve kterém pětičlenné kruhy navzájem nesdílejí žádný atom. Nejméně stabilní je C_{20} . [4] Fulleren je odolný vůči některým vnějším fyzikálním jevům a dokonce může být supravodivý. Fulleren se připravuje pyrolýzou. [5]

Structure



Obr. 1 Fulleren C_{60} [13]

1.2.2 Grafen

Geim a kol. v roce 2004 poprvé připravili jednotlivou vrstvu grafenu pomocí mechanického odlupování malých částí z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu. Grafen je dvoudimenzionální plát těsně sbalené mřížky ve tvaru medové plástve. [40] Je to materiál složený z jedné nebo dvou vrstev atomů uhlíku, které jsou uspořádány do pravidelné struktury šestiúhelníků vazbami sp^2 . [6] Grafen má mnoho jedinečných vlastností a to mechanických, elektrických, termických a optických. Dále má velký povrch a vyznačuje se biokompatibilitou. [39] Jednoatomová vrstva bez příměsí vykazuje vysokou elektrickou vodivost, dvouatomová se chová podobně jako polovodiče. Grafen je nejtenčí a současně nejpevnější materiál. [6]

1.2.2.1 Struktura a druhy grafenu

C–C vazba v rovině grafenu je velice silná. Avšak mezivrstvy jsou vázány slabými van der Waalsovými silami. Tyto síly způsobují, že je materiál měkčí než diamant. V silné C–C vazbě aromatické struktury se vyskytují volné π elektrony. Planární struktura grafenu umožňuje účastnit se mnoha reakcí jako jsou „click“ reakce, cykloadice a vsunuté karbidové reakce. Transformace sp^2 struktury na sp^3 uspořádání vedou k vytvoření topologických defektů nebo jako jsou pentagon, heptagon, vakance, praskliny a nečistoty.

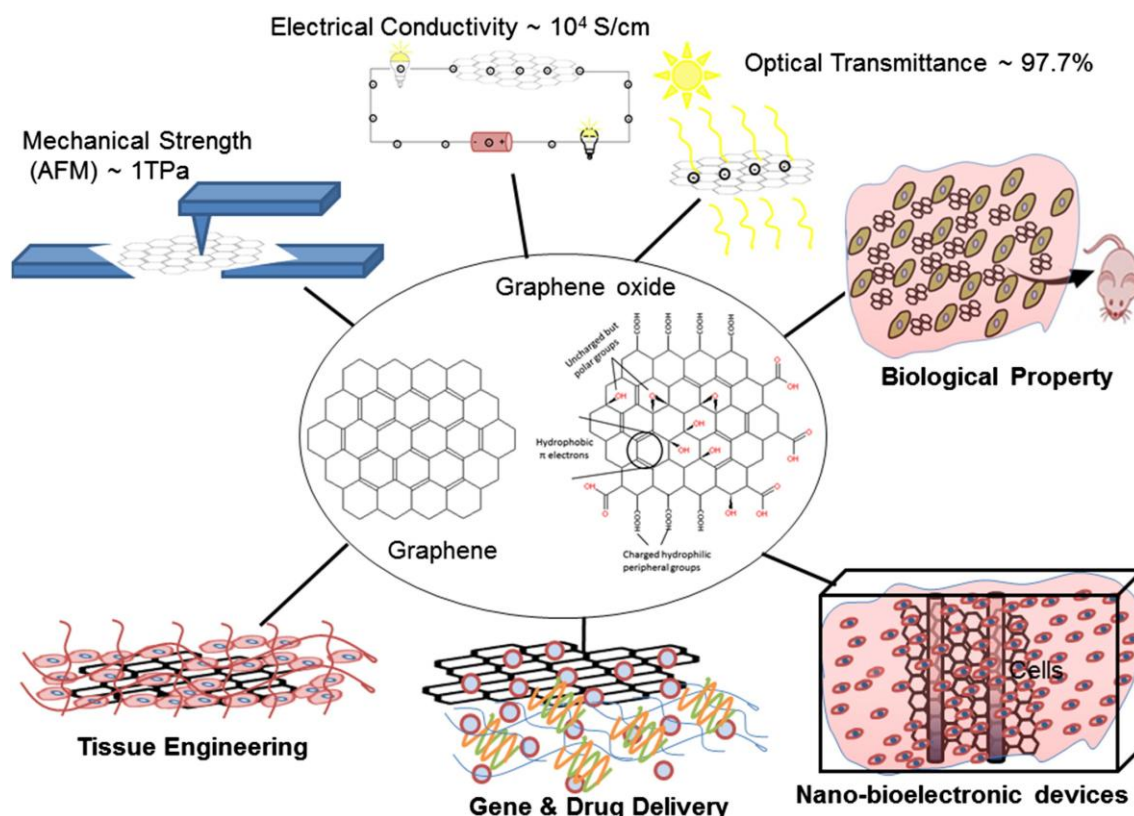
Rodina grafenových materiálů je klasifikována počtem vrstev plátů nebo jejich chemickou modifikací (Obr. 2). Mohou to být např. jednovrstevný, dvouvrstevný nebo multivrstevný grafen, grafenový oxid a redukovaný grafenový oxid. Jednovrstevný grafen si představujeme jako izolovanou vrstvu uhlíkových atomů, dohromady vázanou v rovinné 2D struktuře.

Grafenová vrstva může mít různé strukturní uspořádání a to cikcak – zigzag, židlička – armchair a chirální tvar (chiral). Chemická reaktivita geometricky napínaných oblastí a zigzag hrany grafenu se zdají být lepší než nezátížené oblasti a nebo armchair hrany, díky snadnosti přemístění elektronů z vyšší roviny aromatického kruhu.

Grafen oxid je vysoce oxidovaná forma chemicky modifikovaného grafenu. Skládá se z jednovrstevného grafenového plátu s karboxylovou kyselinou, epoxidovými a

hydroxylovými skupinami. Karboxylové skupiny (na okraji grafenu) poskytují koloidní stabilitu a negativní povrchový náboj, závislý na pH. Epoxidové a hydroxylové skupiny jsou nenabity, ale polarita dovolí přítomnost slabým interakcím, hydrogenovému vázání a dalším povrchovým reakcím. Základní rovina grafenu také obsahuje volné povrchové π elektrony, které jsou hydrofobní a schopné π - π interakcí (např. pro léky) a nekovalentní funkcionalizace.

Redukovaný grafen oxid by mohl být používán hlavně pro elektrickou vodivost a optickou absorpci. [41]



Obr. 2 Schéma různých aplikací grafenu [41]

1.2.2.2 Vlastnosti grafenu

Grafen je unikátní materiál s neobyčejnými vlastnostmi mechanickými, elektrickými, optickými, fyzikálněchemickými, jejichž využití nalezneme např. v biomedicíně.

Čistý grafen je hydrofobní. Jednotlivá vrstva grafenu má vysokou termální a elektrickou vodivost díky malému množství defektů v krystalové mřížce. Tepelná vodivost je cca 5200 W/mK a je podstatně vyšší než u grafen oxidu (cca 2 000 W/mK).

Jeho elektrická vodivost je 10^4 S/cm, vodivost grafenu pak 10^{-1} S/cm, při pokojové teplotě.

Jednotlivá vrstva grafenu ukázala propustnost 97,7 % světla. Rekombinace páru elektron-díra přispívá k fotoluminiscenci grafenu. Napětí nutné ke zlomení jednotlivých bezdefektních vrstev grafenu je 130 GPa, což je přibližně 200krát více než u oceli, to dělá grafen nejpevnějším materiálem. Youngův modul grafenu je 1 TPa, u grafenu se pohybuje v rozmezí 0,15-0,35 TPa. [41]

1.2.2.3 Syntéza

Grafen může být syntetizovaný různými metodami. Jedna z možností výroby grafenu je metoda opakovaného mechanického odlupování. K syntéze grafenu se používá zejména chemická depozice par (CVD) na termálně žíhaném listu mědi/niklu, dále extrémně kontrolovaného růstu na karbido-křemíkovém substrátu pomocí chemické depozice par (CVD), termální žíhání rutheniových jednotlivých krystalů obsahující uhlík. [39, 40]. Jednotlivé vrstvy bezdefektního grafenu jsou těžko syntetizovatelné ve velkém objemu. Díky vysoce reaktivnímu povrchu je grafen velmi těžko rozpustný v roztoku a také v plynové fázi. [41] Vědci ve studii [39] uvádějí výrobu multifunkčního grafenu kovalentní modifikací s polyakrylovou kyselinou (PAA) a fluoresceinem o-methacrylat (FMA) pomocí ultrazvuku.

1.2.2.4 Použití grafenu v medicíně

Grafen by se mohl uplatnit v mnoha biomedicínských aplikacích, jako jsou transport léčiv, transport genů, bio-zobrazování a tkáňové inženýrství.

Ve studii [39] se usilovalo o četnější využití grafenu a grafenového oxidu jako fluorescenční značky pro intrabuněčné zobrazení. Např. grafen oxid-polyethylen glykol (PEG) zvýšil vlastní fotoluminiscenci a je možné ho využít pro biomedicínské aplikace, jako jsou buněčné zobrazení, lékový transport a foto-termální terapie.

Konjugace nanočástic oxidů železa s grafenem dává super paramagnetické vlastnosti a mohl by být také užít k transportu léčiv. Grafen oxid s oxidy železa a funkcionalizovaným PEG, s doxorubicinem byl úspěšně užít pro cílovou donášku léčiv a biozobrazovací aplikace.

Pro cílenou donášku k jádru buňky je důležité, aby lékový nosič unikl před endosomální částí a uvolnil lék v cytosolické části. Kim a kol. využili blízké infračervené záření (NIR) a vysoce intracelulární hladiny glutathionu (GSH) pro intracelulární cytosolickou dopravu doxorubicinu. Buňky léčené redukováným grafen oxidem funkcionalizovaným s PEG a polyethylenimem (BPEI) byly vystaveny NIR k rozrušení a následnému uvolnění doxorubicinu. [41]

Grafenové materiály byly konjugovány s mnoha biopolymery, jako jsou např. želatina a chitosan, pro funkcionalizované agenty transportu léčiv. Grafen-želatina ukázala, že by mohla naložit vyšší množství léčiv díky velkému povrchu a relativně vyšší π interakci.

Grafen by mohl být využit pro regenerativní a tkáňové inženýrství, jako zpevňující materiál v hydrogelech, biodegradabilních filmech a v dalších tkáňových podpůrných nosičích. [41]

1.2.3 Nanotrubice

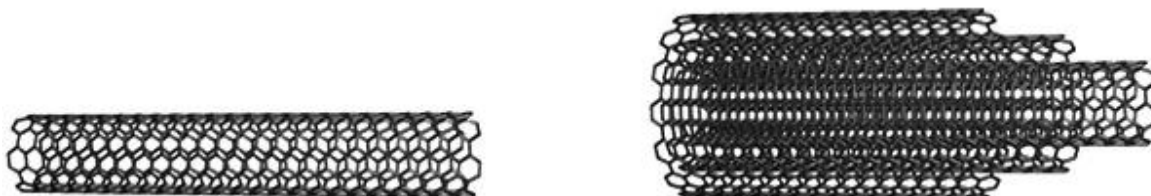
Nanotrubice jsou „válcovité fullereny“ a patří mezi nejčastěji používané stavební prvky nanomateriálů.

Nanotrubice objevil v roce 1991 Sumio Iijima. Tento nanomateriál je zajímavý pro svůj tvar, velikost a pro své fyzikální a chemické vlastnosti. Nanotrubice se skládá z grafitových vrstev, zabalených do válce o průměru od 2 nm do 100 nm, uhlíky jsou vázány do tvaru šestiúhelníku (Obr. 3). Chemické vazby jsou především sp^2 a jsou podobné vazbám grafitu. Jednotlivé nanotrubice jsou vzájemně vázány van der Waalsovými silami pomocí π vazeb. Vykazují mimořádnou pevnost a mají unikátní elektrické vlastnosti. Jsou velmi účinnými vodiči tepla, mají velký poměr mezi délkou a průměrem. Nanotrubice nalézají velké uplatnění v elektronice, medicíně, strojírenství, optice a v dalších oborech. Nanotrubice se uplatňují pro ploché displeje, vodivé plasty, super kompozitní vlákna, supravodiče a baterie. [12, 14, 17]

1.2.3.1 Druhy uhlíkových nanotrubic

Nanotrubice mohou být jednostěnné (SWNT), dvoustěnné (DWNT) nebo vícestěnné (MWNT) (Obr. 3). Nanotrubice mají tři možné struktury, jedna z nich je cikcak – zigzag, další je židlička – armchair a poslední je chirální tvar (chiral). [12]

MWNT se skládají z několika vrstev, které jsou od sebe vzdáleny 0,34 nm a mají průměr v rozsahu 10-100 nm. Jsou vhodné pro průmyslovou výrobu a mají lepší odolnost vůči chemikáliím. Zvyšováním počtu stěn nanotrubic získává trubice jiné vlastnosti. [7] SWNT mají průměr od 0,4 nm do 2 nm. [15]



Obr. 3 Nanotrubic SWNT a MWNT [14]

Při nedostatku katalyzátoru se nanotrubic uzavírá ve tvaru fullerenu. Hemisféra fullerenu se skládá z pentagonů a hexagonů. Pentagony na konci nanotrubic zlepšují chemickou reaktivitu.

Jelikož strukturu nanotrubic tvoří hemisféra, nevyskytuje se zde pouze sp^2 hybridizace nýbrž i hybridizace sp^3 . Tato hybridizace má za následek vyšší reaktivitu než u grafenu. [8]

1.2.3.2 Vlastnosti uhlíkových nanotrubic

Nanotrubic jsou využívány zejména pro své obdivuhodné mechanické, fyzikální a chemické vlastnosti.

Nanotrubic jsou velice pevné, jejich namáhání v tahu je 230-725 GPa a jsou považovány za nejpevnější materiál. [9, 10]

MWNT vykazují výrazné teleskopické vlastnosti. Vnitřní nanotrubic, tzv. jádro, je při pohybu téměř bez tření. Pokud chceme zlepšit mechanické vlastnosti, nastavíme uhlíkovou trubici do směru namáhání. Jakmile množství poruch ve struktuře ubývá, zlepšují se mechanické vlastnosti nanotrubic. Pevnost vazby nanotrubic je nepřímo úměrná délce uhlíkové nanotrubic. Čím je uhlíková trubice delší, tím můžeme nalézt více poruch ve struktuře nanotrubic. [13]

Nanotrubic mohou přenášet velkou proudovou hustotu. Její hodnoty se pohybují okolo 10^9 - 10^{10} A/cm². Tato proudová hustota je tisíckrát větší než u mědi. Odpor nanotrubic je velmi malý a téměř nezávisí na délce nanotrubic. Elektrická vodivost

závisí na struktuře nanotrubic. Uhlíkové nanotrubice, které se vyznačují malým průměrem, mohou být buď polovodiče, nebo kovy. Kovové nanotrubice mají strukturu židličkovou (chirální úhel = 30°). Jako polovodiče se chovají asi dvě třetiny nanotrubic [12]. Jejich termální vodivost u SWNT je cca 3 500 W/mK a u MWNT 3 000 W/mK. [41]

Uhlíkové nanotrubice jsou pro svou zvýšenou křivost chemicky více reaktivní. Čím je průměr trubice menší, tím je větší reaktivita. Nejpříhodnější jsou šestiúhelníky v grafitové vrstvě pro svou energeticky nejvhodnější reaktivitu. Změna hustoty elektronů uvnitř a venku zakřivené roviny způsobí zakřivení grafitové roviny a tím vytlačení π elektronů. Více chemických reakcí je způsobeno větší hustotou elektronů. To vyvolává odštěpení elektronu. [11]

1.2.3.3 Syntéza uhlíkových nanotrubic

Současné technologie umožňují vyrábět nanotrubice průmyslově. Uhlíkové nanotrubice mohou být připravovány různými metodami. Mezi nejpoužívanější způsoby pro jejich výrobu patří následující metody přípravy: *v elektrickém oblouku, laserová ablace a metoda CVD (chemical vapor deposition)*. Některé z těchto procesů probíhají v ochranné atmosféře plynu nebo ve vakuu.

Elektrický oblouk

Nanotrubičky byly vytvořeny v elektrickém oblouku z uhlíkových sazí v grafitové elektrodě poprvé v roce 1991. Původně byla tato metoda určena k produkci fullerenu. Pro elektrický oblouk se používá proud 50-100 A. K první velkovýrobě uhlíkových nanotrubiček došlo v roce 1992. Vzhledem k tomu, že nanotrubičky byly objeveny za použití této techniky, patřila tato metoda mezi první nejpoužívanější metody pro syntézu nanotrubiček.

Tuto metodu použili Ebbesen a Ajayan. Oblouk je vytvořen stejnosměrným proudem, mezi dvěma grafitovými elektrodami vznikne plasma za pomoci uhlíkových par, inertního plynu a katalytického plynu. [20] Válec obsahuje dva ventily. První odsává vzduch, vytváří vakuum. Druhý ventil plní válec inertním plynem. Jako inertní plyn se používá argon nebo helium o tlaku 0,007 až 0,05 MPa. Uhlík je obsažen v záporné elektrodě, odkud se sublimuje při vysoké výstupní teplotě. Nanotrubičky vyrobené

pomocí obloukového výboje jsou dlouhé, rovné a jsou na obou koncích uzavřené. [18, 19, 14] Výtěžek této metody je pouze 30 hmotnostních procent a vytváří jak SWNT, tak MWNT s délkou až 50 mikrometrů. Iijima v roce 1993 zjistil, že jakmile je na katodě kovový katalyzátor (např. kobalt, železo nebo nikl) ve směsi s grafitovým práškem, má to za následek vznik SWNT. [20] Tyto nanotrubičky obsahují nepříliš vad. Touto metodou mohou vznikat i jiné produkty a to saze, fullereny a uhlíková vlákna. [21]

Laserová ablace

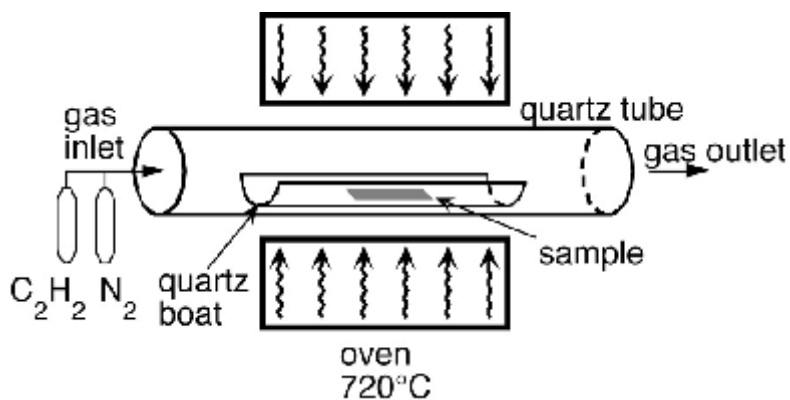
Tento proces byl vyvinut na Rice Univerzitě v Houstonu (USA). Zpočátku – v době objevu uhlíkových nanotubic – se používalo tryskání kovů pomocí laseru na výrobu různých kovových molekul. Později nahradili kov grafitem a vytvořili MWNT. Ve stejném roce použili kompozit z grafitu a kovových částic katalyzátoru. Metoda laserové ablace má výtěžek 70 %. Touto metodou se vyrábí především SWNT. [21, 14]

Zařízení se skládá z pece, křemenné trubice s oknem, uhlíkového terče s katalyzátorem, vodou chlazeného kolektoru produktů a systému inertní atmosféry. V procesu laserové ablace se z paprsku pulzního laseru, který dopadá na terč, za vysoké teploty (1200 °C) reaktoru, vypařuje grafit, zatímco inertní plyn – nejčastěji argon – je vpuštěn do komory. Odpařující se uhlík kondenzuje na chladnějším povrchu reaktoru. Nanotrubice jsou unášeny plynem a poté se zachytí na kolektoru mimo pec. Pokud je plazma generována silným elektrickým polem během procesu růstu, pak bude následovat růst nanotubic ve směru elektrického pole. Jakmile nastavíme geometrii reaktoru, je možné syntetizovat uhlíkové nanotrubičky vertikálně. Bez použití plazmy jsou nanotrubičky náhodně uspořádané. Nejlepší výtěžek pro výrobu SWNT byl ze směsi kobaltu a niklu. Při použití této metody vznikají velmi dokonalé trubice s průměrem okolo 20 nm. [22, 18, 14]

Chemická depozice par (CVD)

Metoda CVD je v současnosti nejvíce používanou metodou pro růst nanotubic. CVD je používána zejména pro jednoduchost a pro výrobu většího množství poměrně čistých nanotubic.

Růst nanotubic probíhá v tzv. peci při teplotě 500-1200 °C. Do pece (Obr. 4) se vhání směs chemicky reaktivních plynů jako je např. CH₄, C₂H₂, zemního plynu a vodíku. Pro lepší reakci uhlíku s katalyzátorem se přidává MgO nebo Al₂O₃. [20]



Obr. 4 Schéma pece metody CVD [20]

Pro metodu CVD je potřeba podklad s vrstvou kovových částic katalyzátorů, nejčastěji niklu, kobaltu, železa nebo jejich kombinace. Pro dosažení nejlepších výsledků je potřeba určit nejlepší kombinaci mezi několika faktory – reakční dobou, teplotou, složením plynu, typem a velikostí katalytických částic, rychlostí průtoku plynu. Pro výrobu MWNT mezi 600 °C až 800 °C se obvykle acetylen používá jako zdroj atomů uhlíku. [23] Průměry nanotubic, které jsou pěstovány, závisí na velikosti kovových částic. Nanotubičky rostou v místech kovového katalyzátoru, plyn obsahující uhlík se rozkládá na povrchu částice katalyzátoru a vznikající karbid je transportován k okraji částice, kde vytváří nanotrubice. Tento mechanismus se dosud studuje. Katalyzátor může, v závislosti na adhezi mezi katalyzátorem a částicí podkladu, zůstat na koncích rostoucí nanotubičky, nebo může zůstat na základně nanotubičky. Problém v této syntéze je odstranění katalyzátoru. Katalyzátor se odstraňuje pomocí HCl nebo NaOH. Odstranění kyselinou může poškodit původní strukturu uhlíkových nanotubic. Nanotrubice mají mnoho strukturních poruch. Poruchy lze odstranit při vysoké teplotě (2500 °C). Při výrobě nanotubic vznikají i jiné produkty např. saze. [20] Metoda CVD se ukazuje jako nejslibnější pro průmyslovou výrobu, pro její cenu a schopnost růstu nanotubic přímo na požadovaný podklad.

1.2.3.4 Použití nanotrubic v medicíně

Nanotrubičky se používají pro transport léčiv, jako biosenzory a tkáňové podpory nebo jako zobrazovací kontrastní látky, které se podávají orálně nebo intravenózně. Nanotrubičky by se mohly uplatnit jako přenašeče látek pro cílenou léčbu a pro detekci rakoviny. Nanotrubičky jsou přitahovány k rakovinotvorným buňkám a tímto způsobem by mohly dodávat látky přímo do rakovinotvorných buněk. [9, 13]

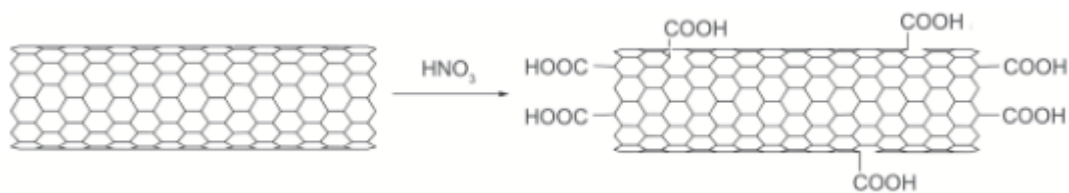
Nanotrubičky se mohou využít pro cílený transport léčiv, kde je potřebné množství léku dopraveno k požadovanému místu, například k nádoru. Tímto by se mohly minimalizovat vedlejší účinky léků na ostatní tkáň. Uhlíkové nanotrubičky jsou schopné prostupovat skrz buněčné membrány a tím donést léčivo. Lék je na uhlíkové nanotrubičky připojen pomocí kovalentní nebo nekovalentní vazby. Buď vstupuje do buňky samotný lék, nebo nanotrubičky i s lékem. Po dopravení léku na místo se oddělí léčivo od nanotrubičky v intracelulárním prostředí. [17]

Částice se do organismu mohou dostat především vdechnutím. Nanotrubičky mají nanometrové rozměry a díky tomu se mohou snadněji dostat až do plic. Po vstupu do plic se nanotrubičky transportují až do hlavní nervové soustavy, lymfatického systému a krve. Dále se dostávají do ostatních orgánů, jako jsou slezina, srdce a játra. Schopnost nanomateriálu pohybovat se v těle, záleží na chemické reaktivitě, na povrchové charakteristice a schopnosti se vázat na proteiny. [14]

Předpokládá se, že uhlíkové nanotrubičky zvyšují regeneraci tkání. Při infarktu je srdce zbaveno kyslíku a to zabíjí svalové a nervové buňky. Tkáň se nemůže sama regenerovat. Tkáňoví inženýři po celém světě hledají způsoby, jak obnovovat a opravovat poškozené tkáň. Vědci laboratorně vytvořili uhlíkové nanotrubičky, které napodobují přirozené tkáň a mohou regenerovat buňky. Podle výzkumu Brown University jsou nanotrubičky schopné regenerovat tkáň. Tyto uhlíkové nanotrubičky jsou obsaženy ve vodivé náplasti. Náplast vede elektřinu a napodobuje drsný povrch přirozené tkáň. Čím více nanotrubiček se přidá, tím více buněk kolem ní je schopno se regenerovat. [16]

Uhlíkové nanotrubičky mohou být vhodnými kandidáty pro regeneraci kostí a nervů. Nanotrubičky mohou být použity jako kostry pro nukleaci a růst hydroxyapatitu, díky svým mechanickým vlastnostem a své délce, která dosahuje 100-300 nm. Uhlíkové

nanomateriály jsou uzavřeny do trojitě šroubovice kolagenních fibrilů. Čisté uhlíkové nanotrubičky nemají žádné vlastnosti, které podpoří růst kostí. Proto se uhlíkové nanotrubičky funkcionalizují skupinami, které přitahují vápenaté kationty. Například může být použita PABS (polyaminobenzeno sulfonová kyselina). Výsledky ukazují, že použitím PABS se zvýšila mineralizace mezi 7 až 14 dny. Uhlíkové nanotrubičky mohou být tedy použity jako podporující materiály pro stavbu kostí.



Obr. 5 Kovalentní funkcionalizace nanotrubičky [67]

Výborné elektrické a mechanické vlastnosti umožňují využít uhlíkové nanotrubičky v neurální regeneraci. Pro neurální regeneraci je potřeba podpora, která není pouze elektricky vodivá, ale zároveň podporuje neuronový růst. Nanotrubičky, které se použijí pro růst neuronů, musejí být funkcionalizované (Obr. 5), a to obalením bioaktivní molekuly, např. 4-HNE (aldehyd 4-hydroxynonenal). Při použití MWCNT, která je obalená 4-HNE, byl podpořen růst neuronů. Když se MWCNT nefunkcionalizují, vyrostou pouze jeden až dva neurony. Sotvaže se MWCNT obalí 4-HNE, vyrostou na ni 4 až 6 neuronů. [17]

Nanotrubičky mají velký potenciál jako biosenzory. Nanotrubičky mohou být spojeny s biomolekulou. Její elektrické a vodivé vlastnosti umožňují citlivější detekci biomolekul v reálném čase. Díky miniaturnímu spojení s mikrofluidními zařízeními se může monitorovat více biomolekul současně. To by mohlo umožnit rychlejší stanovení diagnózy nemoci, než posílat vzorky do laboratoře. Nanotrubičky mohou detekovat elektrochemické signály od biomolekul (například detekce redoxní reakce). Jedna z výhod je, že elektrony z reakce jsou přesně spojeny s nanotrubicí a to zvyšuje citlivost. Uhlíkové nanotrubičky detekují různé druhy proteinů, vázání protilátek a DNA hybridizaci. [23]

1.2.4 Kvantové tečky

Kvantové tečky jsou fluorescenční polovodičové nanokrystaly s unikátními fotofyzikálními vlastnostmi. Kvantová tečka může být složena z prvků ze skupiny II-IV, III-V, například CdTe nebo InP. Rozsah průměru kvantové tečky je od 2 do 10 nm. Díky těmto malým velikostem mají kvantové tečky jiné vlastnosti na rozdíl od svých objemových polovodičových materiálových protějšků. [24]

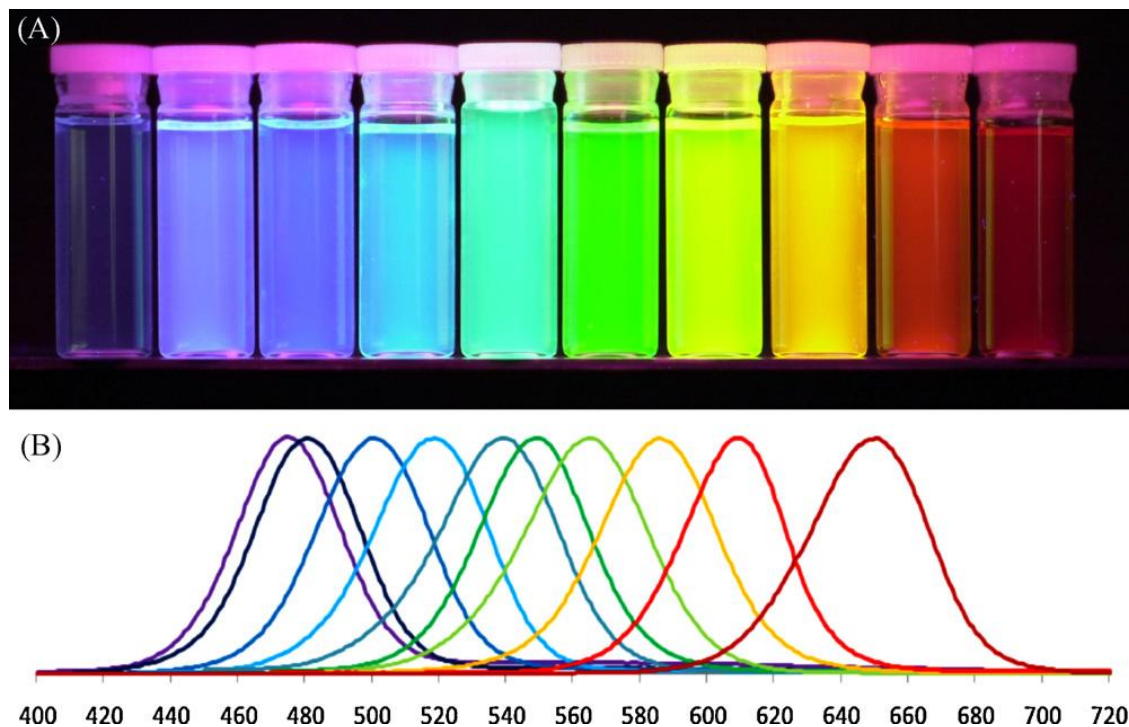
1.2.4.1 Struktura

Kvantové tečky se skládají z jádra, skořápky a obalu. Struktura kvantových teček je všeobecně vytvořena z jádra, které je složeno z anorganického polovodičového materiálu (například CdTe, CdSe) a z anorganické skořápky z polovodičového materiálu s odlišnými pásovými mezerami (například ZnS). Jádro se skořápkou je obaleno vodou rozpustným organickým povlakem, ke kterému může být připojena biomolekula. Výběr skořápky a obalu je důležitý, protože skořápka stabilizuje jádro nanokrystalu a také mění fotofyzikální vlastnosti. Obal poskytuje vlastnosti, které dovolují jeho použití v různých aplikacích jako je rozpustnost ve vodném médiu a poskytuje reaktivní skupiny pro vaznost biomolekul. Holé nanokrystalové jádro nemůže být využito bez obalu a skořápky, protože je vysoce reaktivní a toxické. Jádro je také nestabilní a degraduje. Nepravidelnosti jádra vedou k emisnímu blikání. Překryv jádra skořápkou způsobí pasivaci toxických iontů. Skořápka není dostatečná k ochraně jádra v biologických rozpouštědlech, a proto je potřeba vodě rozpustný obal, který zajistí rozpustnost v biologickém médiu. Skořápka se může skládat z fosfolipidových micel, merkaptoacetické kyseliny, dihydrolipoické kyseliny nebo amfibických polymerů. Na obal se mohou konjugovat protilátky nebo nukleonové kyseliny. [24]

1.2.4.2 Vlastnosti

Tečky využívají kvantově omezených efektů. V jádře nanokrystalu vznikají páry elektron – díra. Kvantové tečky jsou vysoce fotostabilní se širokým absorpčním spektrem a úzkým symetrickým emisním spektrem. Jejich emisní barvy závisí na jejich velikosti, chemickém složení a chemickém složení povrchu. Barva může být laditelná od ultrafialové přes viditelnou až k blízké infračervené vlnové délce. Jejich unikátní optické vlastnosti překonaly nedostatky tradičních barviv a slibují být další generací

fluoroforů – látek, které absorbují fotony světla v jednotlivých vlnových délkách a pak znovu vyzařují fotony v rozdílných vlnových délkách. [24]

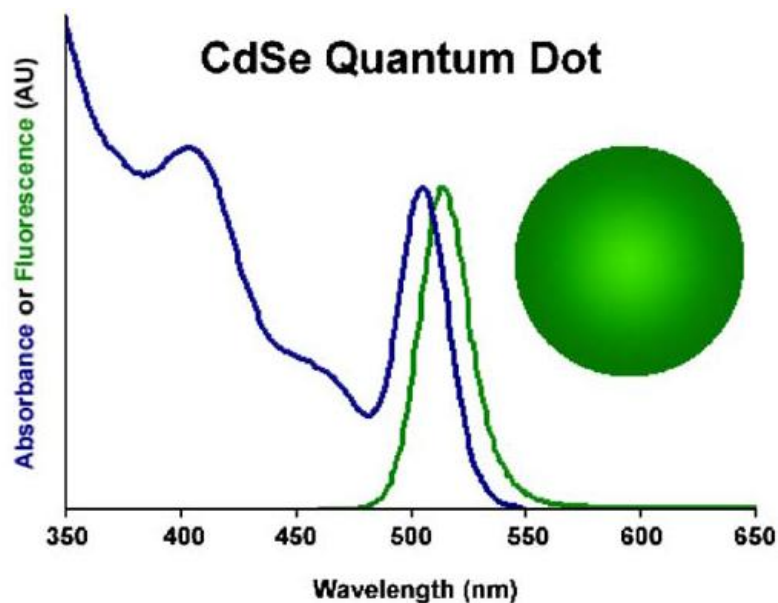


Obr. 6 Emise QD a jejich vlnová délka [66]

Kvantové tečky jsou složeny z polovodičových materiálů, obsahujících pásy dovolených energetických hladin, oddělené pásovými mezerami (tzv. zakázanými pásy). Elektronů obsazující hladiny pod zakázaným pásem se označují jako valenční, elektrony na hladinách nad zakázaným pásem označujeme jako vodivostní. Na energetické hladině mohou být pouze dva elektrony. K přeskočení z valenčního do vodivostního pásu potřebují elektrony získat energii, aby překročily zakázaný pás energií. Tato energie může být získána pomocí tepla nebo elektrickým napětím. Jakmile elektrony přeskočí přes zakázaný pás, zanechají za nimi pozitivně nabitou částici – díru. Pár elektron – díra se nazývá exciton. Elektron ve valenčním pásu zůstává pouze dočasně, než „spadne“ zpět. Jakmile elektron padá zpět do valenčního pásu, emituje elektromagnetické záření s rozdílnou vlnovou délkou (Obr. 6, 7). Když se objemový polovodičový materiál blíží velikosti excitonu, je tento nanokrystal nazván kvantová

tečka. Kvantová tečka je kvantově omezená tzn., že má diskrétní hladiny. Změna chemického povrchu může způsobit změnu v zakázaném pásu.

Další jedinečnou optickou vlastností je nastavitelnost absorpčního a emisního vzoru. Emise může být laditelná od UV k blízkému infračervenému spektru tak, že malé tečky vyzáří v modré oblasti a větší tečky v červené oblasti. [24]



Obr. 7 Absorbce a fluorescence CdSe kvantové tečky [26]

1.2.4.3 Syntéza

Murray a kolektiv uvedli koloidní syntézu kvantových teček. Použili organické médium a organometalické částice. Tento postup ukázal vysoký stupeň monodisperzity a dobrou schopnost krystalizovat, kvantové tečky byly téměř bez strukturních defektů. Bohužel kvantový zisk byl pouze 10 %. Způsobovaly to defekty na částicovém povrchu a nízká povrchová pasivace zapříčinila nízký fluorescenční zisk. To vedlo vědce k tomu, aby zlepšovali povrchovou kvalitu. První úspěšná cesta zahrnovala povrchovou pasivaci pomocí usazení anorganické skořápky z polovodičového materiálu se širokou pásovou mezerou. Tyto struktury dosahují zvýšení fluorescenčního zisku. Tato metoda se provádí pyrolickými reakcemi při různě vysokých teplotách. Velmi důležitá je kombinace kovových a organometalických surovin s chalkogenovým prekurzorem (například S, Se, Te příměsí) v koordinačním rozpouštědle. Vysoká kvalita kvantových teček může být získána užitím vhodného rozpouštědla (například tri-n-octylposfátový

oxid – TOPO), které je stabilní při vysokých teplotách a zabraňuje agregaci nanočástic. Růst teček je monitorován. [27]

Kvantové tečky se vyrábějí např. organickou a vodní syntézou. U vodní syntézy se mohou použít mikrovlny. [25]

Organická syntéza

Organické syntézy patří mezi nejčastější metody syntézy kvantových teček. V Bawendi skupině použili dimethyl kadmium jako Cd prekurzor a trioctyl fosfát a trioctylfosfátový oxid jako povrchové činidlo. Protože dimethyl kadmium je vysoce toxické, drahé a nestabilní při pokojové teplotě a výbušné při vysokých teplotách, další skupina vědců použila jako Cd prekurzor CdO. Tato metoda byla jednoduchá a reprodukovatelná. Kvantové tečky vyrobené pomocí organické syntézy nejsou ve vodě rozpustné, tudíž nejsou vhodné pro biologickou aplikaci. [25]

Vodní syntéza

Tato metoda produkuje vodou rozpustné kvantové tečky. Tyto kvantové tečky se syntetizují za použití reakce mezi Cd solí a NaHTe nebo NaHSe s užitím thiolových komponentů jako povrchového činidla. Kvantové tečky vyrobené ve vodní fázi nemají dobrou schopnost krystalizovat. Další nevýhoda je, že tato metoda má nízký kvantový zisk. Výhody této metody jsou jednoduchost, levnost, jednoznačně snadná reprodukovatelnost. [25]

Vodní syntéza za pomoci mikrovln je nová metoda, kterou popsal Ren a spolupracovníci. Je založena na mikrovlnném ozáření s měnitelnou teplotou. To vytváří rychlou produkci kvantových teček s velikostně naladitelnou emisí od zelené k blízké infračervené oblasti. Reakce spočívá mezi Cd^{2+} a NaHTe roztokem. Výhoda této metody je nízká toxicita, dobrá reprodukovatelnost, rozpustnost ve vodě a tím biologická kompatibilita a nízká cena. [26]

1.2.4.4 Použití kvantových teček v medicíně

Jakmile je kvantová tečka opatřena obalem rozpustným ve vodě, může se použít pro biologické aplikace.

Kvantové tečky mohou nahradit fluorescenční barviva jako je alexaflour 488 nebo rhodamine 6G, které se používají pro zobrazení biologických objektů. Kvantové tečky se využívají, protože mají jisté vlastnosti, jako jsou blikání a zjasnění. K zjasnění dojde, když kvantové tečky rychle mění emitovaný a neemitovaný stav. To může někdy způsobit problém v jedno-molekule nebo ve stopování. Zjasnění je zvyšováno intenzitou fluorescence kvantových teček při excitaci.

Kvantové tečky se v biomedicíně užívají jako fluorescenční biologické označení pro buněčné zobrazení. Jejich velká povrchová plocha dovoluje se vázat k cíleným molekulám a tato vlastnost s kombinací nanorozměrů může být užita v diagnóze léčeni nemocí na buněčné úrovni. Kvantové tečky se mohou použít pro zobrazení *in vitro* a *in vivo*. *In vitro* zobrazení zahrnuje živé buněčné zobrazení. Kvantové tečky by mohly být použity jako biologické označení pro buněčné proteiny a struktury, různé molekuly, protilátky a fluorescence v místě hybridizační techniky pro DNA a RNA mapování.

Kvantové tečky mohou být ideální sondy pro *in vivo* zobrazení díky jejich výborné fotoluminiscenci a fotostabilitě při vystavení laserovému ozáření. Kvantové tečky s povrchovým obalem polyetylen glykolu jsou stabilní. Obal, který bude zcela netoxický a zároveň nezmění vlastnosti kvantové tečky, zůstává prozatím nenalezený. Delší vlnové délky rozšířené v blízké infračervené oblasti mohou být užity k excitaci kvantových teček v infračerveném zobrazení, aby mohly být pozorovány struktury hluboko v biologické tkáni. Jedna ze zajímavých aplikací je zobrazení kvantovými tečkami v NIR při biopsii lymfatických uzlin.

V roce 1998 byla ukázána první aplikace kvantových teček jako biologické značení myších fibroblastů. Červené kvantové tečky byly upraveny, aby označily buněčnou kostru, zelené kvantové tečky byly určeny, aby rozpoznaly buněčné jádro. Značení může také sledovat, jak kvantové tečky vstupují do buňky a jak změni mechanismus buňky. [27]

Kvantové tečky mohou být využity jako dodávka léků k určenému místu. Léky mohou být cíleně dopraveny k tumoru pomocí zvýšené propustnosti a zadržovacího efektu a to může být aplikováno u rakovinotvorných buněk.

Fototerapie je přijatá pro rakovinovou terapii pro různé orgány, jako jsou kůže, ústa, prsy, plíce a jícen. Kvantové tečky by mohly být užity ke zvýšení citlivosti fototerapie.

Kvantové tečky také mohou sloužit pro detekci různých bakterií a toxinů jako je cholera toxin. [25]

Fluorescenční imunotesty odhalují navázání fluoroforových nálepek protilátky k analytické molekule, která je přilepena k substrátu. Po krátké inkubační době jsou protilátky odplaveny a je ukázáno množství protilátek. Kvantové tečky jsou schopné detekovat několik značek současně a to za použití jednoduchého světelného zdroje. Nepřetržité sledování v reálném čase je umožněno díky stabilitě kvantových teček. Vědci se snaží vytvořit kvantové tečky, které by mohly přepínat na on/off. FRET nepožadují prostorovou reorganizaci páru donor-akceptor, aby vyvolal přepínání. To může vést k intenzivním a pevným sensorům. [27]

1.2.5 Uhlíkové kvantové tečky

Uhlíkové kvantové tečky (CQDs) jsou fluorescenční uhlíkové nanočástice. Jejich rozměr je menší než 10 nm. Jsou biokompatibilní a jsou ve vodě rozpustné. Uhlíkové kvantové tečky mají unikátní fotoelektrické vlastnosti. CQDs mají podobné vlastnosti jako polovodičové kvantové tečky, ale jsou mnohem více biokompatibilní. [28] CQDs jsou tvořeny uhlíkovým jádrem a povrchem modifikovaným karbonylovými a karboxylovými skupinami nebo polymery. [33]

Davoren a kol. ve své práci uvádějí výrobu uhlíkových kvantových teček elektrochemickou syntézou za použití dvou elektrod. Vysoce čistá grafitová tyč o průřezu $0,6 \text{ cm}^2$ sloužila jako pracovní elektroda paralelně s další elektrodou grafitovou tyčí, která byla ve vzdálenosti 2 cm. Elektrolyt se skládal z 5 ml vody, 4 ml 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluorborátu ([BMIm] [BF₄]) a 4 ml 1-butyl-3-ethylimidazolium hexafluorofosfátu ([BMIm] [PF₆]). Byl použit statický potenciál 15 V, na dvě elektrody pomocí stejnosměrného zdroje napájení po dobu 6 hodin. Při použití této směsi je vyroben žluto hnědý prášek. Uhlíkové tečky po ozáření fluoreskují jasně modrou barvou. [28]

Uhlíkové tečky se používají pro biozobrazování, biochemické a chemické analýzy a jako přístroje vyzařující bílé světlo. [28]

1.3 Buňka

Třídění všech živých organismů je určováno podle jádra. Organismy, jejichž buňky obsahují jádro, se nazývají eukaryotní (z řeckých slov eu = opravdu, karyon = jádro). U prokaryotních (pro = před) organismů buňky jádro nemají. [56]

1.3.1 Stavba buňky

Snad nejdůležitější organelou v eukaryotické buňce je jádro, které je obaleno dvěma soustřednými membránami. Jádro obsahuje velmi dlouhé polymery molekul DNA. Nosičem DNA jsou chromozomy. V jádře je malé jadérko. V jadérku dochází ke spojení částí různých chromozomů a k přepisování ribosomální RNA a sestavení podjednotky ribosomů.

Mitochondrie jsou ve všech aerobních eukaryotických buňkách (Obr. 8) a generují energii pro buňku. energii získávají z oxidace molekul potravy (např. cukrů), produkují palivo adenosintrifosfát (ATP), který slouží pro práci většiny buněčných aktivit. Mitochondrie při své činnosti spotřebovávají kyslík a uvolňují oxid uhličitý. Tento proces je nazýván respirace (dýchání).

Endoplazmatické retikulum je nepravidelný labyrint buněčných prostorů. Tento labyrint je uzavřený membránou. V endoplazmatickém retikulu vniká většina složek buněčné membrány i materiálů určených pro export z buňky.

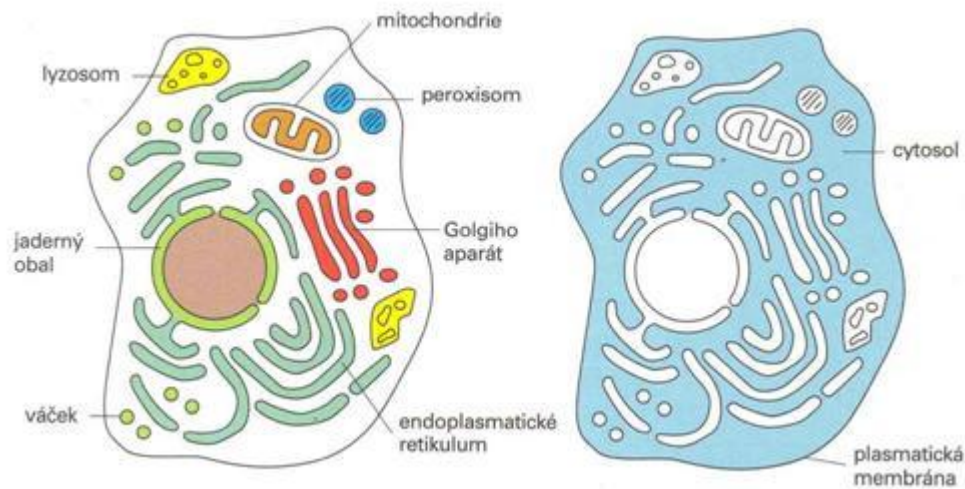
Golgiho aparát přijímá a často mění molekuly vyrobené v endoplazmatickém retikulu. Poté je směřuje do okolí buňky a dalších částí. Golgiho systém připomíná stohy zploštělých membránových váčků.

Lyzozomy jsou malé nepravidelné organely. Slouží k vnitrobuněčnému trávení. Uvolňují živiny z potravy a odbourávají nežádoucí molekuly pro recyklaci nebo vyloučení.

Peroxisomy jsou malé membránou ohraničené váčky. V peroxisomu dochází pomocí enzymů k odbourávání nebezpečného peroxidu vodíku.

Vnitřek buňky vyplňuje cytosol. Je to koncentrovaný vodný gel molekul. Cytosol je místem mnoha chemických reakcí a proto je důležitý pro existenci buňky. Dochází zde

k prvnímu odbourávání molekul potravy a syntéze proteinů. Cytosol udržuje pohromadě plasmatická membrána. Je to tzv. obal živé buňky. [56]



Obr. 8 Eukaryotní buňka [56]

1.3.2 Buněčná reprodukce

Rozmnožování buněk se označuje jako mitóza (nepřímé dělení). [58] Pro rozdělení na téměř stejné dceřiné buňky je potřeba zdvojení genetického materiálu a ostatních funkčních kapacit buňky. Jaderné dělení neboli mitóza je rozdělení DNA na dvě identické sady, poté následuje buněčné dělení neboli cytokinéza. [57]

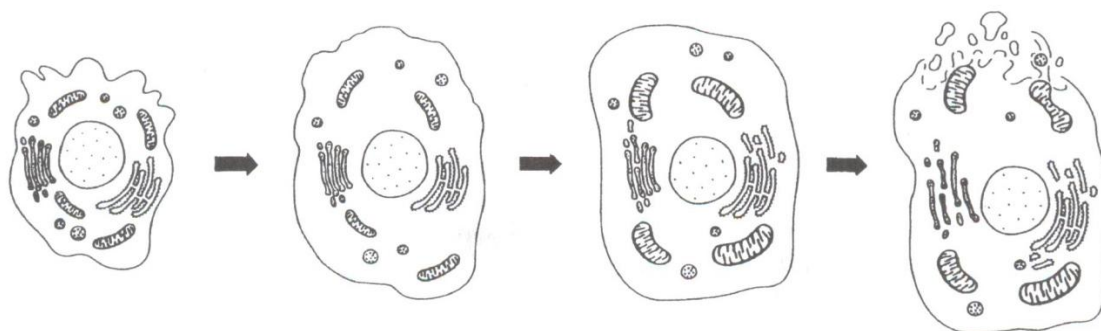
Mitóza probíhá ve čtyřech fázích: profázi, metafázi, anafázi a telofázi. V profázi se chromozomy zkracují a zesilují. Blána jadérka se rozpouští a vytvoří se dělicí vřeténko. V metafázi se seřadí chromozomy svými centromerami do centrální roviny buňky. V anafázi se chromozomy v místě centromery podélně rozdělí a chromatiny jsou zkracovány a přitahovány k opačným koncům buňky. V telofázi dělicí vřeténko zaniká a chromozomy se protahují. Okolo chromozomu se vytváří jaderná membrána a začínají se okolo něho vyskytovat jadérka. Uprostřed buňky se vytváří membrána, která následně rozdělí mateřskou buňku na dvě dceřiné. [58]

1.3.3 Buněčná smrt

Příčinou buněčné smrti bývá její nevratné poškození. Tato nefyziologická smrt se označuje jako nekróza (Obr. 9). Nekróza vzniká nevratným poškozením buňky díky

vystavení extrémním podmínkám, jako jsou vysoká teplota, radioaktivní záření, toxické látky atd. Hlavním rysem nekrózy je ztráta funkce a integrity plazmatické membrány. DNA je téměř celou dobu nekrózy nedotčena. V závěrečné fázi dochází k prasknutí plazmatické membrány a vylití buněčného obsahu do okolí. Nekróza se týká větší skupiny poškozených buněk a je často doprovázena zánětlivou reakcí. [59]

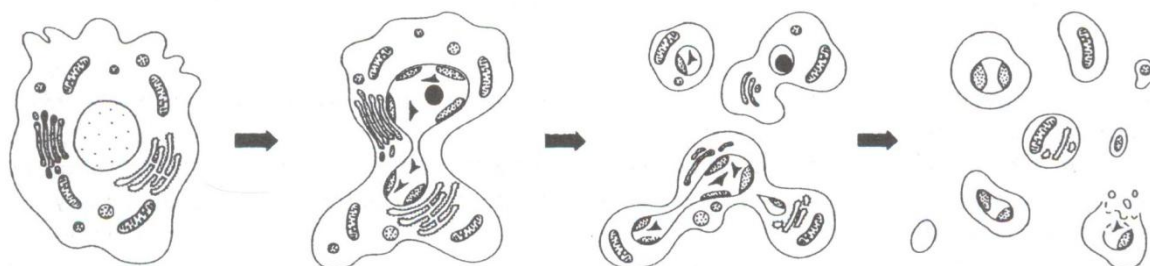
NEKRÓZA



Obr. 9 Buněčná smrt – nekróza [59]

Buňka může vykonat fyziologickou smrt. Buněčná smrt je výsledkem potřeb pro eliminaci příslušné buňky. Tato smrt se u obratlovců nazývá apoptóza (Obr. 10). Apoptózu můžeme chápat jako určitý typ programované buněčné smrti s určitými znaky. U apoptózy dochází k degradaci DNA a plazmatická membrána zůstává intaktní. Apoptická buňka se zmenšuje. Mitochondrie se tvarově nemění, ale ztrácí svou funkci. V jádře dochází ke kondenzaci chromatinu u vnitřní jaderné membrány. Na závěr vznikají vezikuly s cytoplazmou, orgány s jaderným materiálem ohraničené plazmatickou membránou. Apoptóza se týká pouze jednotlivých buněk a není doprovázena zánětlivou reakcí. [59]

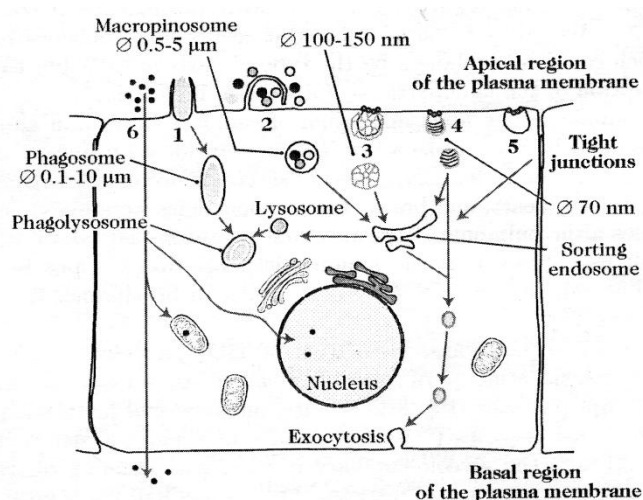
APOPTÓZA



Obr. 10 Buněčná smrt – apoptóza [59]

1.3.4 Pronikání nanočástic do buňky

Průnik částic do a skrz buňku závisí především na cytoplazmatické membráně buňky (Obr. 11). Membrána reguluje a udržuje látky vně i uvnitř a rozhoduje o tom, v jakém množství budou přijaty a vyloučeny. Makromolekuly a nanočástice mohou být zachyceny ve vnějším prostředí buňky pomocí endocytózy. Nanočástice je obalena a vložena do vezikuly (váček) z cytoplazmatické membrány. Endocytóza se skládá ze dvou mechanismů: pinocytózy a fagocytózy.



Obr. 11 Typy internalizace buňkami: 1. Fagocytóza zprostředkovaná receptory a vedoucí k tvorbě fagozomu, 2. Makropinocytóza, 3. Endocytóza závislá na proteinu klatrinu, 4. Kalveoly zprostředkovaná endocytóza, 5. Endocytóza nezávislá na proteinu klatrinu a na kalveolech [2]

Fagocytózu zprostředkovávají fagocyty např. makrofágy, monocyty a polynukleární neutrofil. Fagocyty slouží k ochraně před patogeny. Během fagocytózy jsou bakterie, buněčný odpad a velké částice pozorovány uvnitř fagozomu. Fagozóm má průměr v rozsahu 0,1-10 μm . Fagozóm zničí patogeny pomocí enzymů, oxidantů, proteáz, hydroláz. Látky, které jsou odolné vůči degradaci, zůstávají ve fagozomu. Jakmile je částice velká, nedokáže ji cytoplazmatická membrána zcela uzavřít a vzniká tzv. frustrovaný fagozóm. Tento frustrovaný fagozóm spouští chronickou zánětlivou reakci. U alveolárních makrofágů v dýchacím systému studie ukazují, že účinnost fagocytózy je slabší a může docházet k nepohlčení částic fagozómem a následné usazení v alveolárním epitelu.

Pinocytóza je neustále probíhající proces příjmu tekutin, roztoků a výjimečně i plynů. Pinocytózou vznikají velmi malé váčky oproti fagocytóze. [2]

1.4 Toxicita

Nanočástice se nevyhnutelně stávají více používané v různých oblastech. Lidské tělo je tedy vystaveno nanočásticím a je potřeba se zaměřit na výzkum nanotoxicity. Je potřeba nejdříve získat informace o toxicitě nanočástic na buněčné úrovni – *in vitro*.

Nanočástice jsou široce využívány v konzumních produktech a mohou se dostat do těla inhalací, kožním kontaktem, trávicím traktem nebo injekcí. Když jsou nanočástice uloženy v orgánech, mohou způsobit modifikaci fysochemických vlastností a způsobovat nepříznivé biologické reakce. Na druhou stranu je využití nanočástic v biomedicínských aplikacích velice zajímavé. [31]

1.4.1 ROS

Volné radikály a vysoce reaktivní druhy jsou známy jako reaktivní kyslíkové druhy (ROS). Jsou vytvořené z kyslíkových molekul vzniklých buněčným dýcháním. ROS tvoří kyslíkové radikály, jako superoxidový aniont a hydroxylový radikál a další jiné reaktivní kyslíkové neradikálové druhy (peroxid vodíku, ozón, kyslík). Tyto chemické druhy mohou být vyrobeny z vnitřních a vnějších zdrojů. Vnitřní zdroje zahrnují zánět, mitochondrie, cytochromový metabolismus, mikrosomy, peroxysomy. Znečišťovatelé prostředí (např. cigaretový kouř) jsou dobře známy jako vnější zdroje ROS, které vytvářejí řetězovou reakci ROS produktů v buňkách.

Kyslíkové volné radikály obsahují nepárové volné elektrony, proto reagují v mikrosekundách na krátkou vzdálenost (nanometry) s blízkou molekulou. ROS je fyziologicky vyroben v normálních dávkách během metabolického procesu nebo během ozáření. ROS jsou důležité vedlejší produkty z mitochondriálního dýchání, které zahrnuje katalyzované elektronové transportní reakce. ROS je také tvořeno během reakce s kovovým katalyzátorem. Fagocyty podstupují správný oxidativní stres, který je umístěn ve fagozomech. Nadměrné množství ROS může hrát roli v řetězové reakci jedovatého cyklu a navíc podporuje sekreci biologicky důležitých molekul. Oxidativní

poškození se akumuluje během života a předpokládá se, že to může hrát klíčovou roli ve vývoji rakoviny, Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby. [32]

1.4.2 Měření toxicity *in vitro*

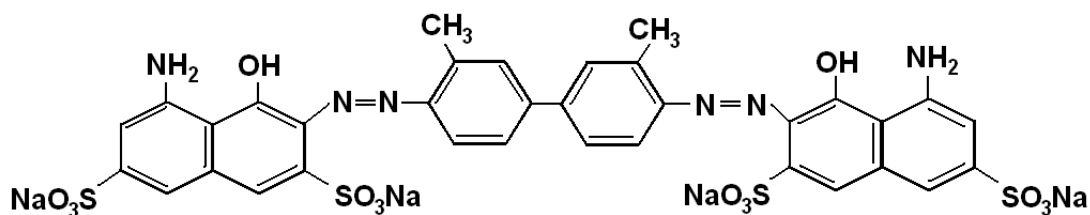
Toxicita nanomateriálů se nejprve testuje na buňkách (*in vitro*) a poté na zvířatech (*in vivo*). Ne testování toxicity *in vitro* se používají např. trypanová modř, MTT, MTS, XTT, MTS, FDA, fluorescenční sondy a další.

1.4.2.1 Trypanová modř

Pro optické zjištění množství poškozených buněk se používá trypanová modř. Trypanová modř je sodná sůl toluidin-diazo-diamino-naftoldisulfonové kyseliny (Obr. 12). Tato metoda byla vyvinuta pro použití v oblasti klinické hematologie a v roce 1950 byla adaptována pro studium buněčných kultur. Barvivo neproniká do živých buněk, ale pouze modře obarví buňky s poškozenou membránou a mrtvé buňky. Životnost je počítána jako poměr počtu živých buněk k celkovému počtu všech buněk. [42]

Nevýhodou této metody je hodnocení statisticky malého počtu buněk (např. hodnocení v 10 zorných polí). Další nevýhodou je ovlivnění toxicity látkou samotnou. Toxicita se musí měřit do 5 min po přidání chemikálie, v opačném případě se poškodí zdravé buňky. [43]

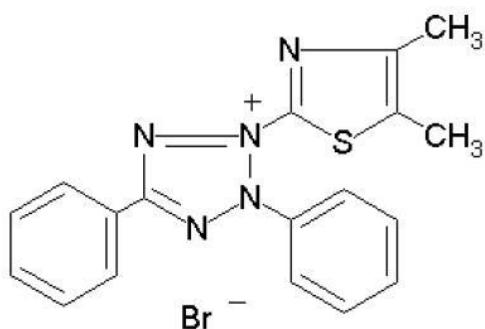
Výhoda této metody je jednoduché a rychlé hodnocení výsledku. Při metodě barvení buněk trypanovou modří se používá světelný mikroskop. [44]



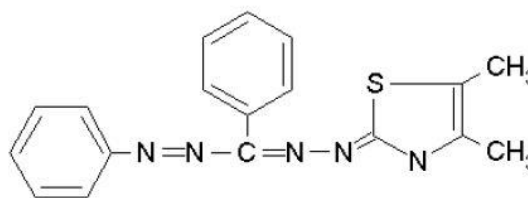
Obr. 12 Trypanová modř [42]

1.4.2.2 MTT

Nejběžnější metoda pro měření cytotoxicity používá MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-fenyl tetrazolium bromid). Testem se měří buněčná aktivita, provádí se ve tmě, protože MTT je látka citlivá na světlo [47, 48, 49]. Zakládá se na redukcí žlutého MTT na nerozpustný, fialový formazan (Obr. 13, 14). Tato reakce je způsobena mitochondriálními enzymy živých buněk. Čím více je živých buněk, tím více je roztok fialově zbarvený. Zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce od 500 nm do 600 nm. Tato metoda je materiálově i časově efektivní. [50]



Obr. 13 Oxidovaná forma MTT [42]



Obr. 14 MTT formazan [42]

1.4.2.3 MTS

Další metoda měření cytotoxicity je s využitím MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). MTS je vodou rozpustná a tím překonává nevýhody metody MTT, např. rozpustnost krystalů před spektrofotometrickým měřením. Tato metoda může být použita pro různé buněčné populace. [45] MTS testy jsou založeny na přeměně tetrazolinové soli na obarvený vodou rozpustný formazanový produkt pomocí mitochondriální aktivity živých buněk. Množství formazanu vzniklých pomocí dehydrogenázních enzymů je přímo úměrné počtu živých buněk v kultuře. Živé buňky mohou být měřeny při vlnové délce 492 nm. [46]

1.4.2.4 XTT

XTT detekuje buněčnou metabolickou aktivitu. Je podobný MTT testu cytotoxicity. XTT je 3-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate. Žlutá tetrazonová sůl je přeměněna dehydrogenázovým enzymem

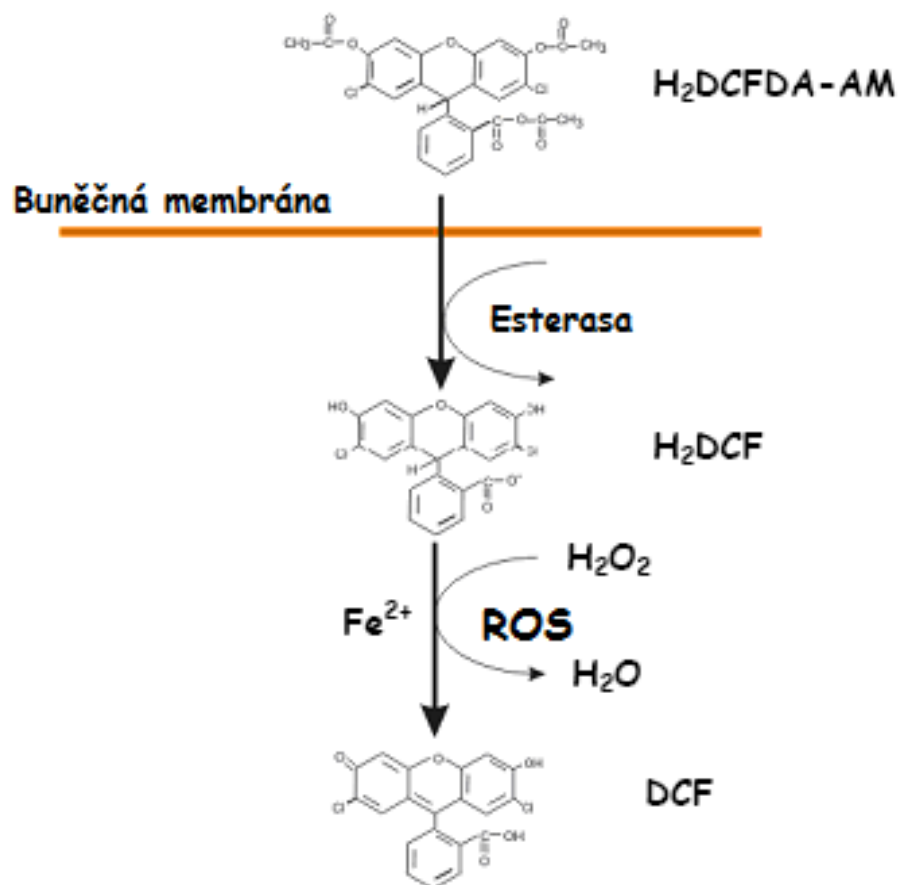
živých buněk na formazanové krystalky. Absorpce je měřena při 450 nm pomocí spektrofotometru. [51, 52]

1.4.2.5 FDA

FDA je acetylový derivát zeleného fluorescenčního barviva fluoresceinu. Díky acetylovým skupinám barvivo nefluoreskuje a je schopné difundovat skrz fosfolipidovou dvojvrstvu. FDA je přítomna v cytoplazmě. [53]

1.4.2.6 Měření toxicity in vitro pomocí fluorescenční sondy

Pro detekci ROS (reaktivní kyslíkové druhy) se používají fluorescenční sondy, např. CM-H₂DCFDA [5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát] nebo H₂DCFDA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát) nebo H₂DCFDA-AM (acetomethylový ester). Tyto sondy jsou citlivé na zvýšenou produkci peroxidu vodíku (H₂O₂) nebo radikálu hydroxidu (HO·), peroxyly (ROO·), oxidu dusnatého (NO·) a oxidu dusičitého (NOO·) a procházejí skrz buněčnou membránu. U uvedených sond dochází reakcemi k vytvoření fluorescenčního DCF (2,7-dichlorodihydrofluorescein). Jako příklad je popsána přeměna acetomethylového esteru (H₂DCFDAAM) na DCF (2,7-dihydrofluorescein).



Obr. 15 Přeměna acetomethylového esteru (H₂DCFDAAM) na DCF (2,7-dihydrofluorescein) [62]

Esterázy jsou lyzozomální enzymy, které hydrolyzují estery nižších mastných kyselin. Jsou přítomné v endoplazmatickém retikulu. [65] Esterázy H₂DCFDA se přeměňují na H₂DCF, které se oxiduje pomocí ROS (H₂O₂, HO[•], ROO[•], NO, NOO[•]) na fluorescenční 2,7-dihydrofluorescein DCF (Obr. 15). DCF je excitováno při 498 nm a emituje při 522 nm. DCF umožňuje lokalizaci a případně i kvantifikaci ROS. [63, 64]

1.4.3 Toxicita grafenu

Toxikologické testy ukázaly, že multifunkční grafen (MFG vyrobený z grafen oxidu a ferocenu) lze považovat za netoxický, při tom nevytváří žádné podstatné množství ROS ani apoptózy v HeLa buňkách. MTT byl použit jako cytotoxický test. Byly použity tyto koncentrace: 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml. U koncentrace 80 µg/ml viabilita klesla pod 60 %. *In vitro* buněčné zobrazení

multifunkčního grafenu na HeLa buňkách dalo excelentní lokalizaci v oblasti lysozomu. *In vivo* studie dokázaly, že MFG byl biokompatibilní k Dániu pruhovanému. [39]

Použitím MTT testu bylo vyhodnoceno, že grafen není toxický pro HeLa a PANC-1 buňky. PANC-1 jsou lidské pankreatické karcinomní buňky. Viabilita HeLa buněk s grafenem při inkubaci 4 hod byla dokonce zvýšena proti 24 hod inkubaci. Fluorescentní mikroskopie ukázala, že ROS produkce byla zvýšena v PANC-1 buňkách. Toxicita ukázala, že velice závisí na typu buněk a proteinovém zdroji. [40]

Testy prováděné skupinou Horváth a kol. ukazují, že celkové výsledky při použití grafen oxidu dávají střední akutní cytotoxickou reakci na epitelních a makrofágových buňkách. Grafen oxid byl ukázán pouze ve fagozomech, nezpůsobuje žádné zřejmé nepříznivé změny v buněčné morfologii a ultrastruktuře. Testy byly prováděny na lidských epitelních buňkách A549 a na myších peritoneálních makrofágových buňkách RAW 264,7. Při koncentraci 0,125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ byla viabilita nad 80 %. [54]

Toxicita byla zkoumána na prsních rakovinotvorných buňkách MDA-MB-231. Viabilita byla určena MTT testem. GCP (grafen-uhlík pasta) zlepšují buněčnou viabilitu a snížení ROS produkci, když GCP substrát obsahuje nízké koncentrace grafenu (1-2,5 hmotnostní %). Naopak vyšší grafenové koncentrace vedou ke zvýšení toxicity a chudšímu buněčnému růstu. GCP substrát s nízkým obsahem grafenu je více biokompatibilní než CP (uhlíková pasta) substrát. GCP by mohl být užit jako elektrochemická elektroda pro buněčnou analýzu. [55]

1.4.4 Toxicita uhlíkových nanotrubic

SWNT mají nízkou akutní toxicitu po působení 24 hodin na buňky A549. Větší toxicita byla zaznamenána při absenci séra, které jako nosič zabraňuje aglomeraci nanotrubic. Tento trend nebyl zaznamenán při expozici křemíkem. SWNT reagovaly s barvivou při cytotoxickém měření, proto se použila jiná spektroskopická technika pro pozdější objevení těchto interakcí. Po 24 hodinách expozice nebyly zaznamenány SWNT uvnitř buněk, ale tvarové změny v buňkách. Byla zaznamenána lamelová tělíska ukládající surfaktant. Lamelární tělíska v buňce skladují surfaktant (lipidová vrstva zabraňující splasknutí buněk v alveolu) a jsou obrannou reakcí plicních buněk na SWNT. [29]

DNA poškození a poškození jádérka je způsobené uhlíkovými nanotrubicemi (CNT) a grafitovými nanovláknými (GNF) v lidských průduškových epitelálních buňkách. Genotoxicita je způsobena vláknitou strukturou CNT s možným příspěvkem kovových katalyzátorů (CNT Co a Mo a Fe u GNF). U obou materiálů bylo vidět poškození DNA, závislé na dávkování. Efekt byl více znatelný při delším časovém působení. Při jadérové zkoušce nebyl dávkově závislý efekt zaznamenán. Pozitivní výsledky byly získány v dávkách, které nebyly toxické k buňkám. Zvyšování dávky materiálu stěžovalo mikroskopickou analýzu jádérka. [30]

SWNT jsou označeny jako vysoce toxické ve vysokých koncentracích. Toxicita SWNT byla zkoumána na ledvinových buňkách lidského embrya. Toxicita byla sledována od 1 do 5 dní. Cui a kol. našli, že toxicita buněk je závislá na dávce a času vystavení. Čisté SWNT jsou cytotoxické, ale tento efekt by se dal zmírnit pomocí funkcionalizace povrchu SWNT. Kam a kol. odhalili nízkou toxicitu za použití carboxyl-, biotin-, a fluorescenčního obalu v buňkách HL60 po dobu 1 hodiny. Sayes a kol. sledovali cytotoxicitu ve vodě rozpustných SWNT na lidských kožních fibroblastech, s koncentrací 3-30 mg/ml po dobu 48 hodin. Buněčná smrt byla nejvyšší u nedotčené SWNT. Funkcionalizované SWNT obsahující více funkčních skupin měly za následek větší buněčnou životaschopnost. Vědci se snaží objasnit toxicitu SWNT, která je pravděpodobně spojená s jejich syntézou. Při syntéze se používají kovové katalyzátory, které mohou být samy o sobě toxické. Bylo sledováno, že katalyzátor obsahující železo v roztoku, způsobuje cytotoxicitu. Shedova a kol. ukázali dávkově a časově závislou cytotoxicitu na lidských epidermálních keratinocytech. Vyšší koncentrace a delší inkubační čas zvyšují oxidativní stres a ten redukuje glutathionové hladiny jaderné a mitochondriální změny. [13]

Svazky SWNT vyvolávají nepříznivé buněčné efekty. To může být způsobeno díky tuhosti a větší velikosti. Nanotrubičky mohou napodobovat efekty azbestových vláken.

Studie MWNT poskytly výsledky podobné těm se SWNT. Procento buněk s MWNT se zvýšilo z 59 % ve 24 hodinách na 84 % po 48 hodinách. Předpokládá se, že MWNT jsou toxické i při nedostatku katalytických částic. Moteiro-Riviere a kol. se domnívali, že toxicita je způsobena přilepením MWNT k buněčné membráně nebo proniknutím dovnitř buněk. MWNT byly viděny v cytoplazmě a blízko jádra. Různost povrchového obalu např. hydroxylové nebo karboxylové skupiny způsobuje menší toxicitu.

Zhodnotili, že MWNT byly netoxické, protože metabolická aktivita byla udržována nad 75 %.

Muller a kol. inkubovali peritonální makrofágy obsahující čisté MWNT a rozemleté MWNT v koncentracích 20-100 mg/ml po dobu 24 hodin. Zjistili, že MWNT měly schopnost indukovat dávkově závislou cytotoxicitu a zvýšení TNF- α , které je podobné azbestu. [13]

SWNT vstříknuté do krysí plíce, za 24 hod způsobily smrt v 15 % infikovaných krys. Výzkumníci uvedli cytotoxicitu SWNT, která indukovala plicní poškození myši. Při vstříknutí 0,5 mg SWNT do myši se aktivovaly makrofágy a vznikly různé zánětlivé odpovědi. Stoker a kol. odhadli zdravotní riziko z nanotrubic na lidském dýchacím systému při užití buněk bronchiálního epitelu a normálních lidských fibroblastech. Inkubovali vodní roztok s SWNT, mající průměrnou délku 500 nm a průměr méně než 10 nm. Výsledky ukázaly zvýšenou produkci oxidů dusíku a sníženou buněčnou životaschopnost po vystavení rozdílným koncentracím SWNT [14]

Funkcionalizované nanotrubičky poskytují větší biokompatibilitu s fyziologickým systémem a díky tomu se snižuje jejich toxicita. SWNT funkcionalizované s fenyl-SO₃H a SWNT s fenyl-(COOH)₂ jsou méně toxické. [13]

1.4.5 Toxicita kvantových teček (QD-CdSe a QCD)

Obavy z toxicity kvantových teček jsou oprávněné, protože jádro bývá složeno z toxických prvků. Sledování vstříknutých kvantových teček na kontrolní embrya ukázalo nové útvary. Kvantové tečky zůstávaly v buňkách, do kterých se vstříkovaly. Ballou a kol. sledovali uskladnění QD s povrchovým obalem v játrech, slezině a kostní dřeni myši. Všechny QD byly nalezeny uvnitř endosomu, hlavně v perifokulárních buňkách sleziny a viditelné znaky byly pozorovány pomocí elektronové mikroskopie. Dlouhodobé studie zkoumaly QDs na buňkách mPEG-750. QDs zůstávaly měsíc v plicích myši, lymfatických uzlinách a kostní dřeni. [13] Shiohara a kol. studovali cytotoxicitu MUA – obalené CdSe/ZnS QDs ve třech rozdílných buněčných liniích (Vero buňky, HeLa buňky a lidské hepatocyty). Po inkubaci buněk s kvantovými tečkami s koncentrací od 0-0,4 mg/ml po dobu 24 hodin byla nalezena závislost cytotoxicity na dávce. MUA je sloučenina, která byla v předcházející studii použita

pro vodné rozpuštění CdSe/ZnS kvantových teček. Tato studie ukázala, že MUA obal není vhodný, protože zvyšuje toxicitu kvantových teček. Kirchner a kol. našli PEG, který snižuje buněčnou toxicitu kvantových teček s křemíkovým obalem. Zhang a kol. sledovali velikostně závislou toxicitu na zelených, žlutých a červených kvantových tečkách, kdy koncentrace způsobuje 50% snížení MTT aktivity.

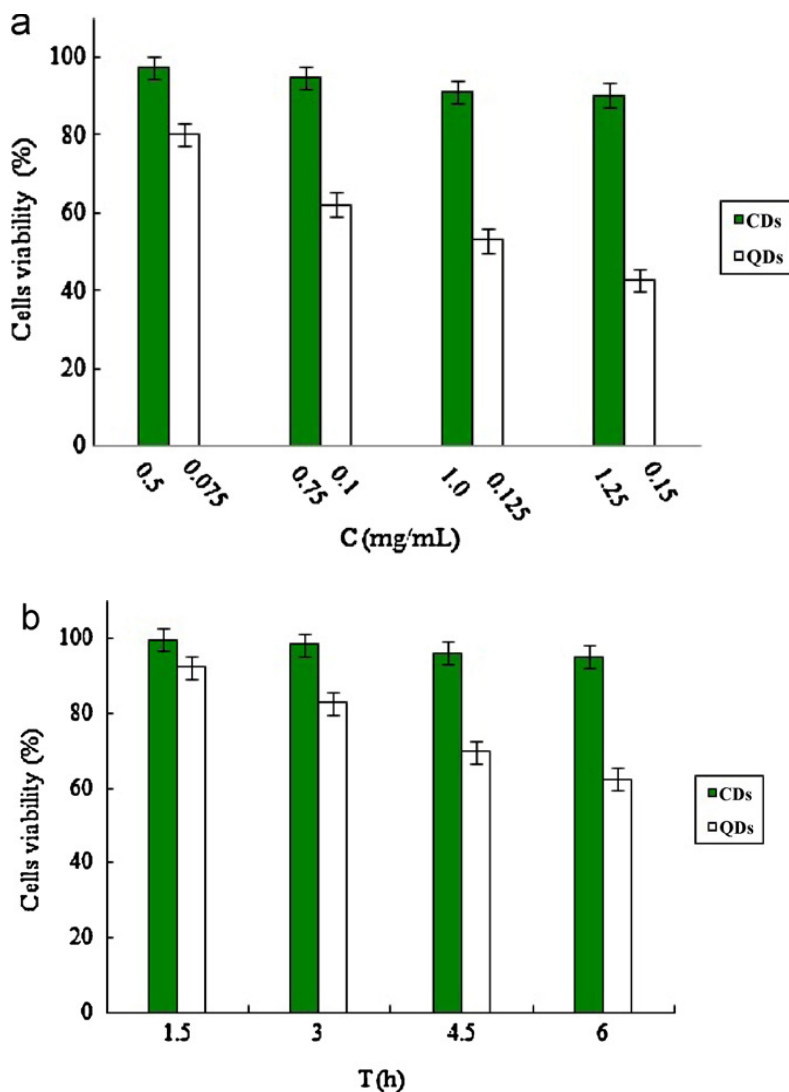
Studiem působení QD na bakterii *Escherichia coli* se ukazuje, že QD zpomalují růst bakterií. Čím jsou nanočástice menší, tím jsou pro bakterii více toxické. Pomocí metody ATR-FTIR byla zjištěna různá spektra v závislosti na koncentraci QD částic. Zelená při 543 nm, žlutá při 579 nm, červená při 647 nm. Výsledky ukazují, že vnější membrána buněk je změněna nebo poškozena QD, což umožňuje, aby QD vstoupily do buňky. Kadmnatý kationt (Cd^{2+}) je méně toxický než QD obsahující CdTe. Schopnost přežití bakterie a stupeň poškození jsou závislé na koncentraci QD. [31]

V další studii se zjišťovala interakce mezi lidskými buňkami – epidermálními keratinocyty a QD složenými z CdSe. Zkoumal se vliv na buňky při aplikaci tažného napětí. Základní schéma bylo při koncentraci 3nM QD a bylo aplikováno zatížení buněk v podélném směru po dobu 4 hodin. Poté byly buňky prozkoumány na životaschopnost a produkci cytokinů. Předpokládalo se, že 10% napětí zvýší příjem QD do buňky. Výsledky indikují, že přidané napětí zvyšuje produkci cytokinů, tím se zvýší příjem QD do buňky a to má vliv na životaschopnost buňky. Jakmile se nepoužije napětí, pronikání QD se nezvyšuje a tím se nezvýší QD toxicita (při stejné koncentraci). [32]

Toxicita byla zkoumaná na rakovinných prsních buňkách MCF-7. Uhlíkové kvantové tečky byly pasivovány $\text{PEG}_{1500\text{N}}$. V této studii je uhlík netoxický. A proto uhlíkové kvantové tečky mohou být považovány jako netoxické. [14]

Ye-Yun Zhang a kol. syntetizovali vodou rozpustné fluorescenční uhlíkové kvantové tečky (QCDs), které byly zkoumány na cytotoxicitu. Cytotoxicita QCDs byla vyšetřována na HeLa buňkách v různých koncentracích (0 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 48 hod a 72 hod. Nejnižší toxicita byla naměřena u koncentrace 400 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 72 hod. MTT test ukázal, že tato koncentrace má 90 % viabilitu a tedy testy MTT ukázaly, že QCDs mají nízkou toxicitu (viabilita téměř 100 %). [34]

Cytotoxicita DEG-CDs byla vyhodnocena pomocí MTT testu. Tyto QD byly získány mikrovlnným ozářením uhlíkového zdroje a reaktivním médiem diethylen glykolem (DEG). Viabilita byla zkoumána na C6 gliomových buňkách inkubovaných s DEG-CDs v různých koncentracích po dobu 24 hod. Cytotoxicita byla zanedbatelná až k 1 mg/ml. MTT testy ukázaly, že DEG-CDs dávají zanedbatelnou toxicitu. [35]



Obr. 16 Viabilita HeLa buněk inkubovaných s CDs a CdTe QDs s různou koncentrací po dobu 6 hod (a) a inkubovaných pro různé časy s koncentrací 0,75 mg/ml CDs a 0,1 mg/ml CdTe QDs (b) [36]

Baofu Han a kol. srovnávali cytotoxicitu CDs a CdTe QDs. CdTe QDs byly připraveny teplotně rozpustnou syntézou ve voda-glykolovém médiu a jako uhlíkový zdroj byla použita glukóza. CDs měly průměr okolo 7,5 nm. Toxicita byla zkoumána na HeLa buňkách po dobu 6 hod. Viabilita HeLa buněk se se zvyšující koncentrací CDs

(po 6 hod inkubaci) pouze mírně snížila. Naopak viabilita HeLa buněk se zvyšující koncentrací CdTe QDs byla rapidně snížena (Obr. 16 a, b). [36]

Uhlíkové tečky jsou biologicky kompatibilní a ukazují výborné optické vlastnosti pro zobrazovací aplikace. Excitační vlnová délka CDs byla 405 nm. Cytotoxicita CDs byla studována na lidském hepatobuněčném karcinomu. Toxicita byla testována CKK-8 po dobu 24 hod a 48 hod. Výsledky ukazují, že viabilita buněk závisí na koncentraci a inkubačním čase. Použity byly koncentrace 2 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 140 µg/ml, 200 µg/ml. Do koncentrace 140 µg/ml byla viabilita buněk téměř stejná, pohybující se do 80 %. U koncentrace 200 µg/ml po dobu 24 hod je viabilita buněk takřka 70 %. V inkubační době 48 hod klesla viabilita buněk téměř k 60 %. [37]

Uhlíkové tečky o velikosti 5-10 nm byly zkoumány na toxicitu. U těchto uhlíkových teček dosáhla maximální excitační vlnová délka 450 nm. Uhlíkové tečky by mohly být použity pro buněčné zobrazení. Toxicita byla měřena MTT testem na MDCK buňkách. CDs byly extrémně biokompatibilní vůči MDCK buňkám. Byly použity tyto koncentrace: 1 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2 µg/ml, 2,5 µg/ml, 3 µg/ml, 3,5 µg/ml, 4 µg/ml. Ve všech koncentracích byla viabilita buněk více než 80 %. V koncentraci 1 µg/ml nebyly zabity žádné buňky. Ve 4 µg/ml bylo nalezeno 80,32 % živých buněk. [38]

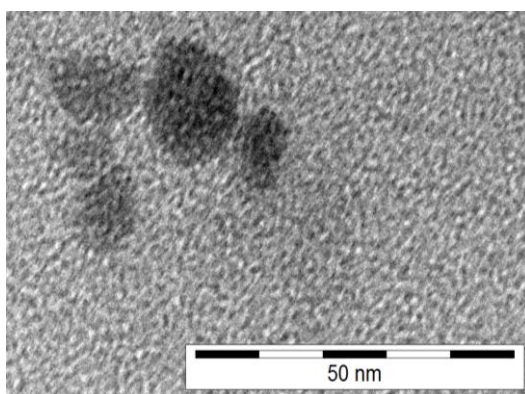
K syntéze vodě disperzibilních uhlíkových teček (CDs) byl použit jako uhlíkový zdroj roztok *Saccharum officinarum*. Tečky měly průměrnou velikost 3 nm a ukázaly jasnou modrou fluorescenci pod UV světlem ($\lambda = 365$ nm). Toxicita byla testována na bakteriích (*Escherichia coli*) a kvasinkách (*Saccharomyces cerevisiae*). Výsledky ukazují, že koncentrace 40 µg/ml CDs byla vhodná pro buněčné zobrazení jak bakterií, tak i kvasinek. [68]

2 Praktická část

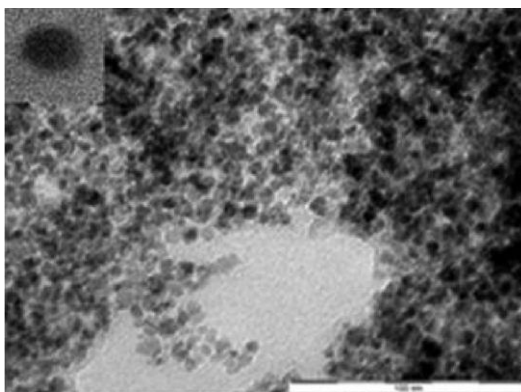
Praktická část práce byla zaměřena na toxicitu uhlíkových kvantových teček k buňkám. Buňky interagovaly se vzorkem 24 hod v běžných kultivačních podmínkách (37 °C a atmosféra obohacená o 5% CO₂), které zajišťoval CO₂ inkubátor. Cytotoxicita byla pozorována z hlediska změn v buněčné viabilitě (životnosti) a vzniku oxidačního stresu. Pokles viability buněk a stanovení toxické koncentrace (tzv. IC – 50) byly zjištěny MTT testem. Hladina volných kyslíkových radikálů (ROS – reactive oxygen species) byla detekována pomocí fluorescenční sondy interagující s ROS. Pomocí mikrodestičkového readeru Synergy HT (Biotek) se detekovaly hodnoty absorbance i fluorescence, které se následně přepočítaly na procentuální odchylky od kontrolních buněk – buněk bez nanomateriálu. Interakce buněk s uhlíkovými kvantovými tečkami (zkráceně C-dots) byly zobrazeny světelným mikroskopem s fluorescenčním módem.

Vzorky uhlíkových kvantových teček

Pro testování byly použity dva druhy uhlíkových kvantových teček. Každý vzorek kvantových teček byl syntetizován jiným způsobem. První uhlíkové tečky byly syntetizované vědeckou pracovnící RCPTM podle článku [60]. Jsou označeny jako GU5 (Gallate – derived carbon dots), jejich tvar a velikost jsou ukázány na Obr. 17. Druhý použitý vzorek (Obr. 18) QCDs (Quaternized Carbon Dots) byl dodán z řecké Univerzity v Ioannině a syntetizován Athanasios Bourlinosem podle článku [61].



Obr. 17 Uhlíkové kvantové tečky GU5 zobrazeny pomocí TEM, velikost ~ 7 nm [60]



Obr. 18 Uhlíkové kvantové tečky QCDs zobrazeny pomocí TEM v levém horním rohu (měřítko 100 nm), velikostní distribuce je 4-9 nm [61]

2.1 Popis experimentálního vybavení

Použité buňky

Cytotoxicita nanomateriálů byla měřena pod vedením Ing. Kateřiny Tománkové, Ph.D., na myších fibroblastech (buněčná linie NIH3T3). Tyto fibroblasty jsou standardně kultivovány pro měření cytotoxicity na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Buňky byly kultivovány v růstovém médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), které obsahovalo 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) a 1% antibiotik (penicilin/streptomycin). Každá jamka 96 jamkové mikrotitrační destičky obsahovala 10 000 buněk. Jednotlivé jamky se značily různou koncentrací vzorků ve sterilním prostředí (v laminárním boxu).

Použité chemikálie

MTT test

- DMSO – dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich)
- MTT – 3-(4,5-di methylthiazol-2-yl)-2,5-di-fenyl tetrazolium bromid (Sigma Aldrich)

Detekce ROS

- Fluorescenční sonda CM-H₂DCFDA – 5-(and-6)-chlomethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Invitrogen Co)

- Fosfátový pufr PBS (Phosphate Buffer Saline) – sloučenina NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, (příprava v laboratoři LF)

Použité přístroje

- CO₂ inkubátor vyhřátý na 37 °C s 5 % CO₂, s odchylkou 5 % (BioTek)
- Třepačka s kruhovým pohybem třepání (Heidolph Instruments)
- Ultrazvuková lázeň (Elma Ultrasonic)
- Světelný mikroskop Olympus IX81 vybavený CCD kamerou a Cell[®] softwarem (Olympus)
- Multi-detekční mikrodestičkový Synergy HT reader (Obr. 19). ROS: měření fluorescence – použité filtry: excitační 485/20 nm a emisní 540/25 nm; MTT: měření absorbance při 570 nm a 690 nm (BioTek)



Obr. 19 Synergy HT fluoro-reader

2.2 Příprava vzorku na měření

Vzorky obsahovaly vodu a uhlíkové tečky. Koncentrace GU5 a QCDs byla 4 mg/ml. Vzorky byly vloženy do ultrazvukové lázně (5 min) pro lepší oddělení částic a následně byla připravena jejich koncentrační řada: 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 125 µg/ml, 60 µg/ml, 30 µg/ml, 15 µg/ml, 7,5 µg/ml. Ředění jednotlivých koncentrací bylo počítáno podle následující rovnice:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

c_1 ...cílená koncentrace

V_1 ...potřebný objem

c_2 ... koncentrace zásobního roztoku

V_2 ... výsledný objem vzorku

Zde je konkrétní příklad, jak naředit zásobní roztok ($c_2 = 4 \text{ mg/ml}$) na koncentraci $1\ 000 \text{ }\mu\text{g/ml}$, když potřebujeme získat objem $450 \text{ }\mu\text{l}$:

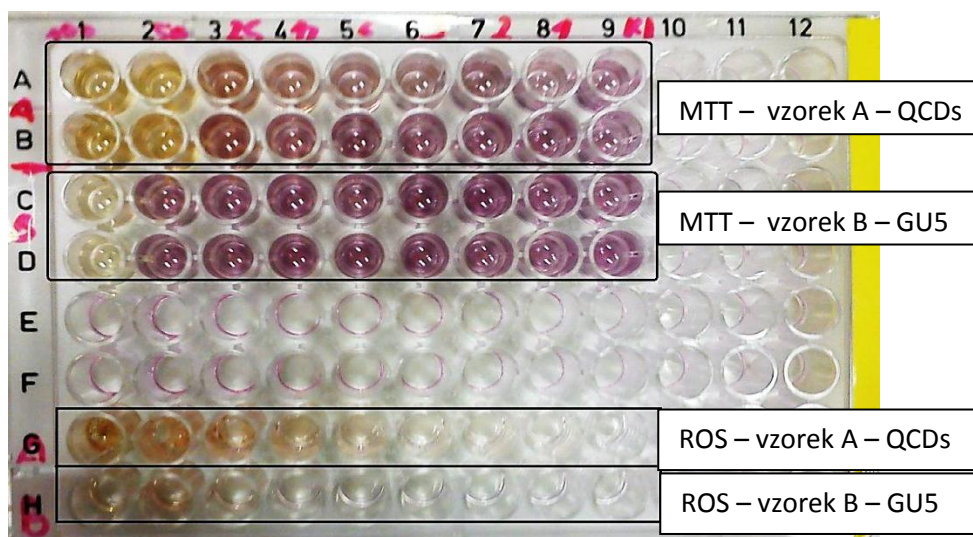
$$V_2 = \frac{c_1 \cdot V_1}{c_2} = \frac{1000 \cdot 450}{4000} = 112,5 \doteq 113 \text{ }\mu\text{l vzorku}$$

$$V_1 - V_2 = 450 - 113 = 337 \text{ }\mu\text{l média}$$

V objemu $450 \text{ }\mu\text{l}$ je tedy $113 \text{ }\mu\text{l}$ vzorku a $337 \text{ }\mu\text{l}$ média. Z obou zásobních roztoků (GU5 i QCDs) byl naředěn roztok o koncentraci $1000 \text{ }\mu\text{g/ml}$, který byl následně ředěn dvojkovou řadou (viz Tab. 1) a aplikován do jamek s buňkami. Podobné je to i pro měření ROS. Roztok o koncentraci $1000 \text{ }\mu\text{g/ml}$ obsahuje $57 \text{ }\mu\text{l}$ roztoku uhlíkových teček a $168 \text{ }\mu\text{l}$ PBS. Roztok byl ředěn analogicky viz Tab. 1, ale médium bylo nahrazeno PBS.

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$c \text{ [}\mu\text{g/ml]}$	1000	500	250	125	60	30	15	7,5	0
vzorek [μl]	100	50	25	12	6	3	2	1	0
médium [μl]	0	50	75	88	94	97	98	99	100

Tab. 1 Koncentrace a příslušné ředění vzorku na každou jamku; 9. sloupec je kontrolní – bez vzorku, pouze s buňkami



Obr. 20 Rozvržení mikrotitrační destičky pro měření ROS a MTT (fialové zbarvení je způsobeno redukcí formazanu metabolicky aktivními buňkami)

Z mikrotitrační destičky vyjmuté z inkubátoru bylo odstraněno médium (buňky zůstaly adherované na dně jamek). Do prázdných jamek bylo doplněno médium a vzorky podle Tab. 1. Do posledních dvou řádků, které byly určeny pro měření ROS, byl přidán místo média PBS (Obr. 20). Každá koncentrace byla opakována dvakrát, aby byla vyloučená chyba testu a časově nezávislé pokusy byly provedeny třikrát, pro objektivní zhodnocení cytotoxicity.

Detekce kinetické produkce ROS

Vznik ROS byl sledován ve dvou různých inkubačních dobách od aplikace nanomateriálů. Po naplnění jamek na 100 μ l bylo k jamkám s PBS přidáno 2 μ l sondy CM-H₂DCFDA. Tato sonda určuje následující reaktivní formy kyslíku: H₂O₂, HO⁻, HOCl, COO⁻. První pokus měřil kinetickou produkci ROS od okamžité aplikace C-dots po dobu 4 hod. Po 4 hodinách byla destička vyjmuta z přístroje a vložena zpět do CO₂ inkubátoru na 24 hod. Po této inkubaci s uhlíkovými tečkami byla opět změřena hladina ROS.

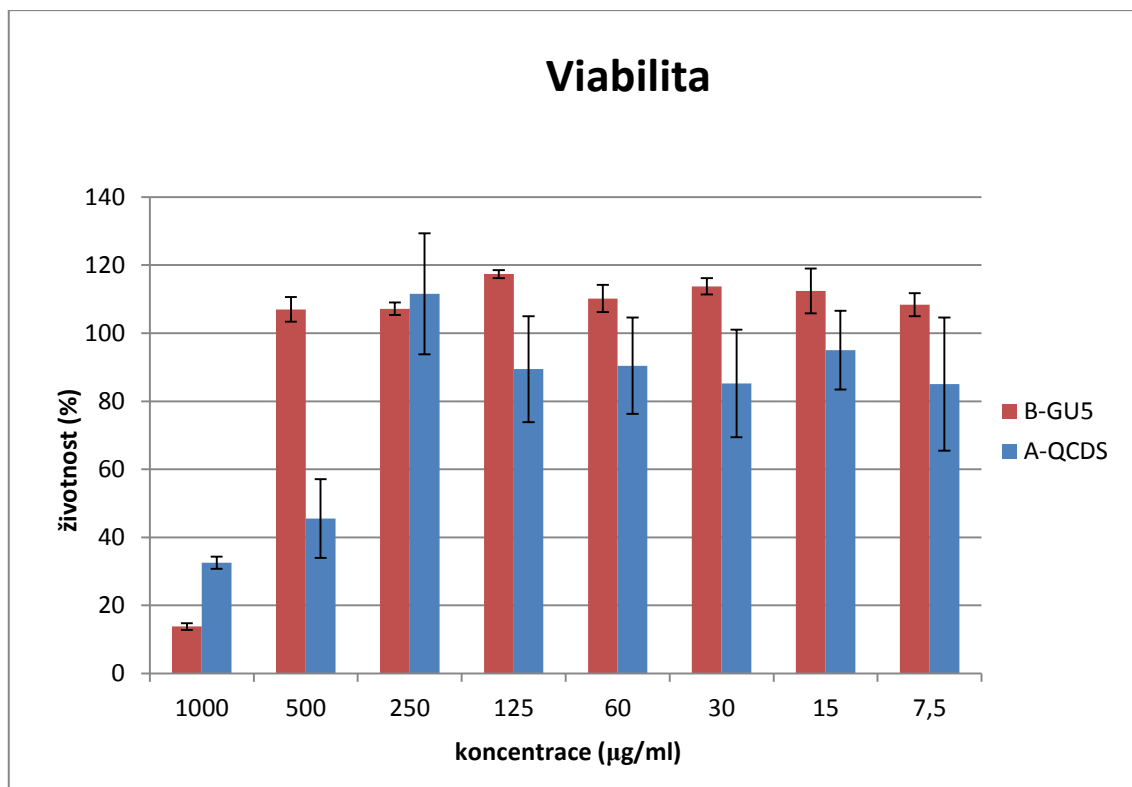
Test buněčné životnosti

Jamky, určené pro MTT test, byly po odstranění roztoku živného média DMEM se vzorkem, promyty fosfátovým puftrem (100 μ l). Do vyprázdněných jamek (do prvních 4 řádků Obr. 20) bylo přidáno 50 μ l 2 mM MTT roztoku. Než buňky začaly metabolizovat tuto tetrazoliovou sůl, byly vyfotografovány pod optickým mikroskopem ve fázovém kontrastu i fluorescenčním módu. Následně byla kultivační destička vložena zpět do CO₂ inkubátoru. Po 3 hod hodinách byl z destičky odstraněn nevyredukovaný roztok soli a do prázdných jamek bylo přidáno organické rozpouštědlo DMSO v množství 100 μ l. Vyredukované krystalky formazanu mění roztok na fialovou barvu. Pro dokonalé rozpuštění krystalků byla destička umístěna na 10 minut do třepačky a následně byla vložena do readeru, kde byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm a 690 nm. Absorbance buněk se lišila podle koncentrace rozpuštěného formazanu, která je přímo úměrná metabolické aktivitě buněk, tj. jejich životnosti. Z naměřených dat byla vypočtena viabilita buněk (v % ke kontrolní skupině) a hodnoty pro jednotlivé koncentrace nanomateriálu byly porovnány v grafu. Z měřených hodnot byla stanovena hodnota IC – 50 pomocí Phototox v. 2.0.

3 Výsledky a diskuze

Vyhodnocení buněčné životnosti (MTT) a ROS analýzy

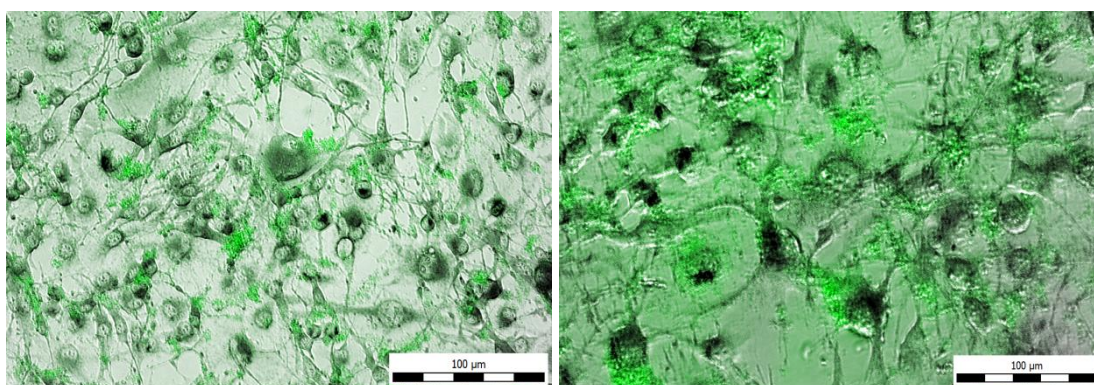
Viabilita buněk byla měřena po 24 hodinové inkubaci buněk se vzorky GU5 a QCDs. Vzorek GU5 vykazoval nižší cytotoxicitu vůči buněčné linii NIH3T3 – buňky byly viabilní i při koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ v porovnáním se vzorkem QCDs, u kterých nastala IC – 50 při 489,97 $\mu\text{g/ml}$. Průběh viability během testování buněk s GU5 uhlíkovými tečkami nevykazoval žádné výrazné odchylky od kontrolní skupiny až do koncentrace 1000 $\mu\text{g/ml}$. IC – 50 tohoto vzorku nastala při 867,71 $\mu\text{g/ml}$ (viz Tab. 2). Z grafu 1 je zřetelné, že koncentrace 500 $\mu\text{g/ml}$ je mezní koncentrací, při které buňky ještě žijí, je však několikanásobně vyšší, než je koncentrace nutná pro fluorescenční značení buněk [37, 38]. U vzorku QCDs bylo fluorescenční značení dostatečné už při koncentraci 7,5 $\mu\text{g/ml}$ (viz Obr. 21). Více snímků při vyšších koncentracích je k náhledu v příloze. Při koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ došlo k převrstvení buněk nanomateriálem, což mohlo ovlivnit MTT výsledky, jelikož tetrazoliová sůl nepronikla k buňkám, které pak nemohly sůl zmetabolizovat. Od této koncentrace mohly nastat falešně negativní výsledky, proto je důležité propojit testování viability nanomateriálů s mikroskopií. Tento jev byl pozorován u vzorku CQDs, viz Obr. 22.



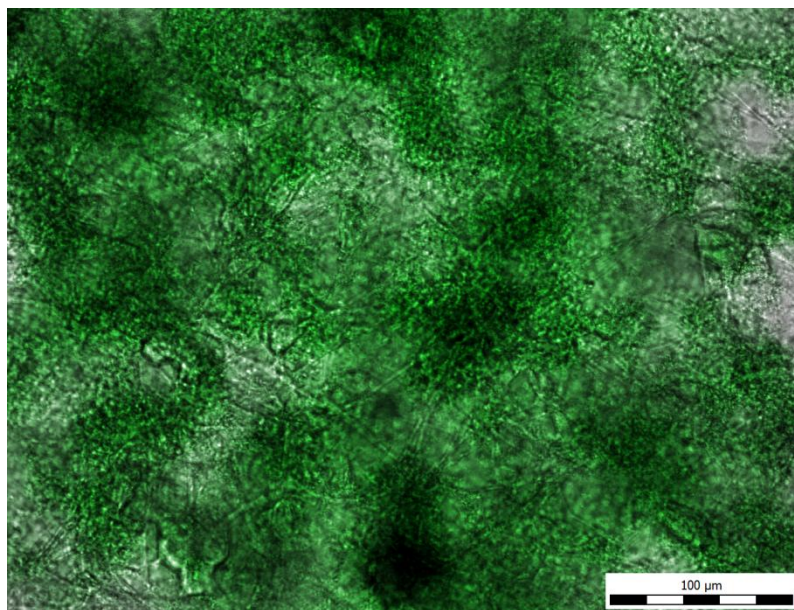
Graf 1. : Viabilita buněk po 24 hodinové inkubaci se vzorky QCDS a GU5; výsledky MTT testu

vzorek	IC – 50 (µg/ml)
GU5	876,71
QCDS	489,97

Tab. 2. IC – 50 (50 % inhibiční koncentrace)

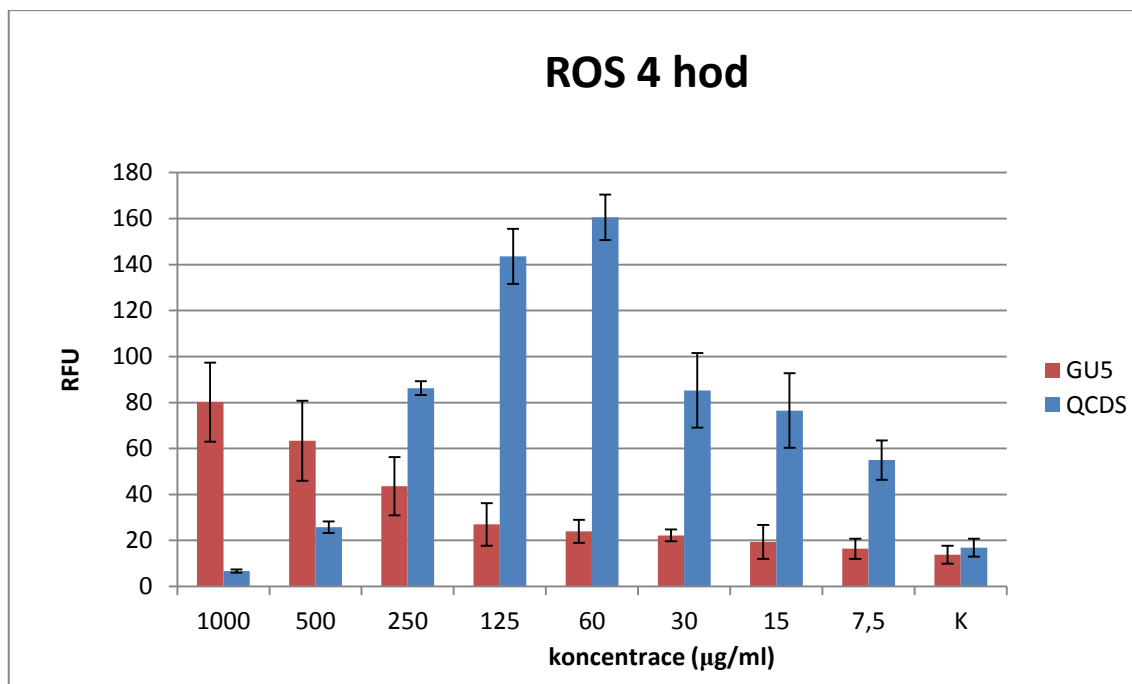


Obr. 21 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDS (7,5 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



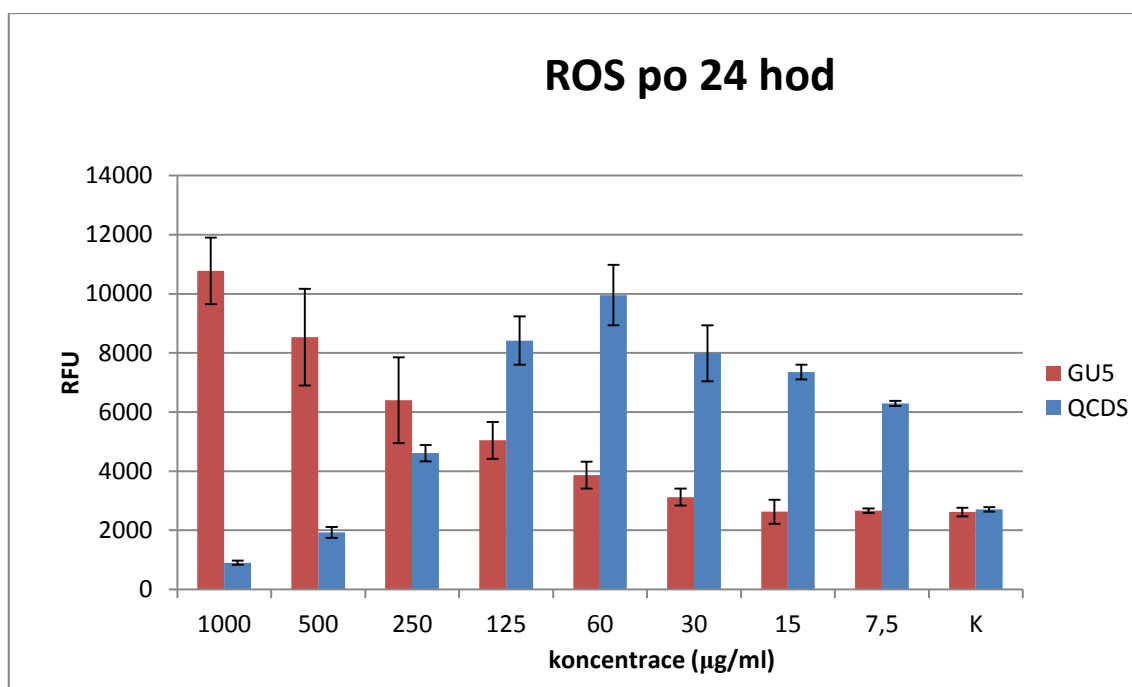
Obr. 22 Převrstvené buňky fluorescenčním nanomateriálem (QCDs o koncentraci 500 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81

Výsledky ROS analýzy, při které hladina kyslíkových radikálů stoupá se vzrůstající koncentrací vzorků, jsou znázorněny v grafu 2 a 3. U vzorku GU5 hodnoty stoupají až do koncentrace 1000 µg/ml. U vzorku QCDs je patrné, že od koncentrace 250 µg/ml dochází k úbytku buněk a tedy i množství metabolicky aktivních buněk schopných produkovat ROS.



Graf 2. : Kinetická produkce ROS měřená po dobu 4 hodin od přidání uhlíkových teček. K - kontrola (žádné uhlíkové tečky). RFU – relativní fluorescenční jednotky

Hladinu ROS v závislosti na různých koncentracích aplikovaného vzorku ($\mu\text{g/ml}$) znázorňuje graf 2. Měření množství ROS probíhalo od přidání vzorku k buňkám po dobu čtyř hodin. Nejvyšší množství ROS vzniklo se vzorkem QCDS při koncentraci $60 \mu\text{g/ml}$, následně hladina reaktivních forem kyslíku klesala se stoupající koncentrací. Tento pokles hladiny ROS mohl nastat z důvodu zániku buněk – nanomateriál interagoval s menším počtem živých buněk, a proto nevznikal oxidační stres (pokles ROS). Uhlíkové tečky GU5 interagovaly s buňkami až do nejvyšší koncentrace, proto hladina ROS rostla s rostoucí koncentrací.



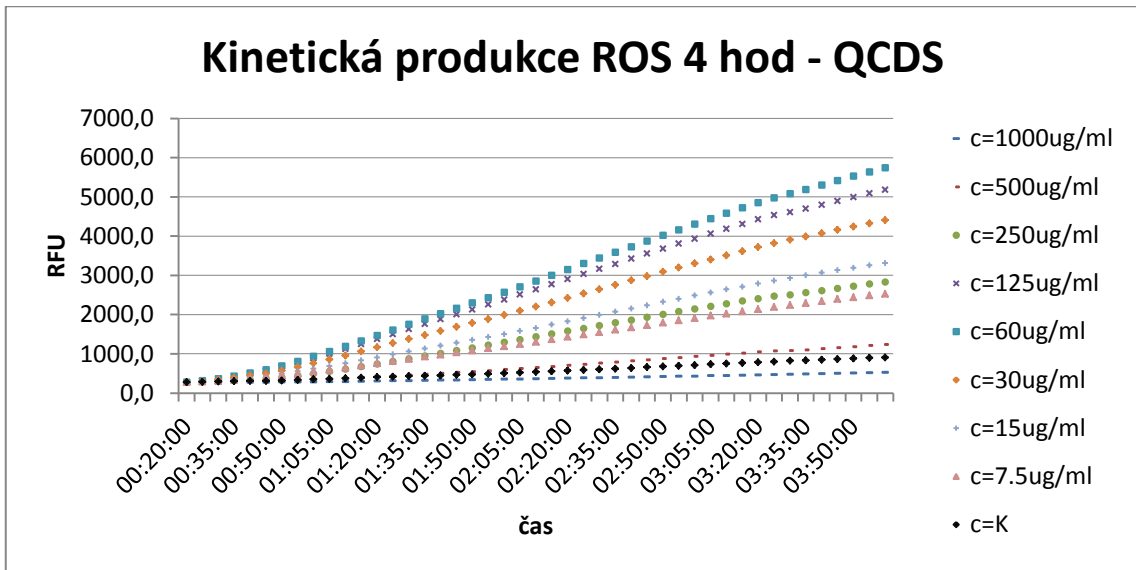
Graf 3. : Koncová produkce ROS po 24 hodinách od přidání nanomateriálu. K – kontrola (žádné uhlíkové tečky). RFU – relativní fluorescenční jednotky

Buňky byly s nanomateriály inkubovány 24 hodin a následně byla do jamek napipetována fluorescenční sonda detekující ROS. Inkubace sondy probíhala 20 minut. Vývoj ROSu se následně měřil po dobu 10 minut. Při porovnání grafu 2 a 3 je průběh hladin ROS stejný, avšak hodnoty RFU po 24 hod inkubaci byly značně vyšší (graf 3), než při měření ROS od první aplikace nanomateriálu (viz graf 2), kde se teprve ROS vyvíjel. Ze 4 hodinových měření kinetické produkce ROS (viz graf 2) byly získány následující hladiny ROS: QCDS 160 RFU (při koncentraci 60 µg/ml), GU5 80 RFU (při koncentraci 1000 µg/ml). Měření ROS po 24 hodinové inkubaci nanomateriálů (graf 3) demonstruje, že vzniklo vyšší množství reaktivních forem kyslíku při stejných koncentracích: QCDS 10 000 RFU (při koncentraci 60 µg/ml), GU5 11 000 RFU (při koncentraci 1000 µg/ml).

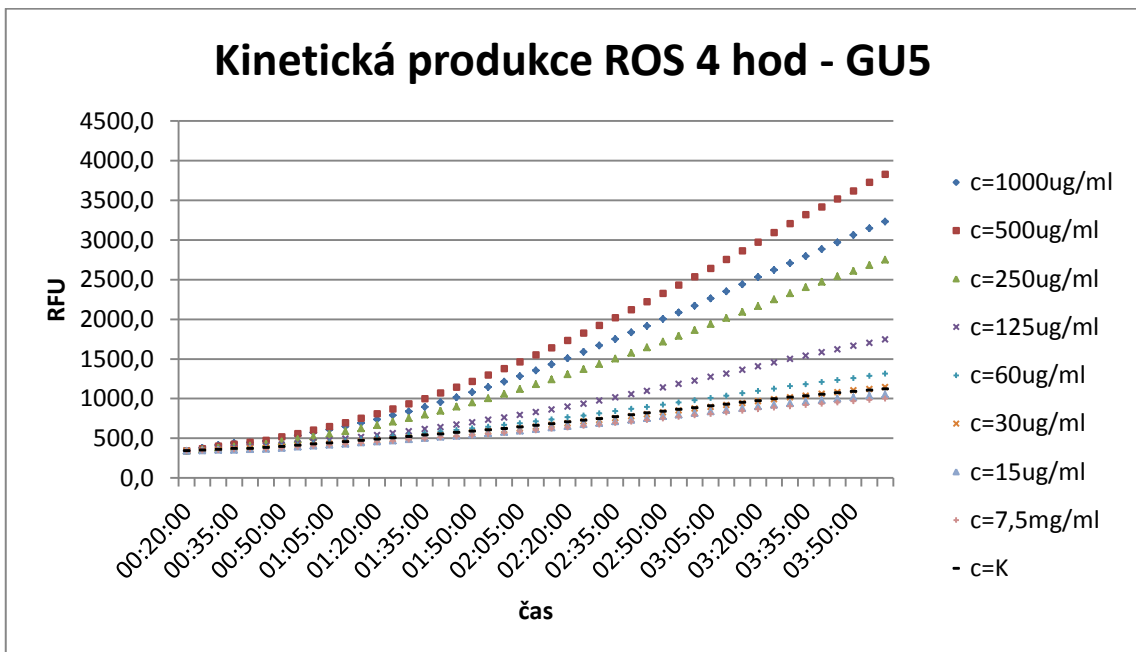
Měření ROS produkovaných buňkami po aplikaci QCDS (24 hodinová inkubace) ukázalo, že vzorky s koncentrací 1000 µg/ml a 500 µg/ml produkují méně volných radikálů ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 3).

Grafy 4 a 5 ukazují růst ROS u všech koncentrací. Koncentrace 1000 µg/ml v grafu 4 vykazuje lineární nárůst ROS. U grafu 5 je nejrychlejší nárůst RFU u koncentrace 500 µg/ml. Pro GU5 je míra poškození buněk vyšší u koncentrace 500 µg/ml než

u nejvyšší koncentrace 1000 $\mu\text{g/ml}$. Měření u QCDs a GU5 probíhalo v 15 minutových intervalech, v obou případech po dobu 4 hodin.

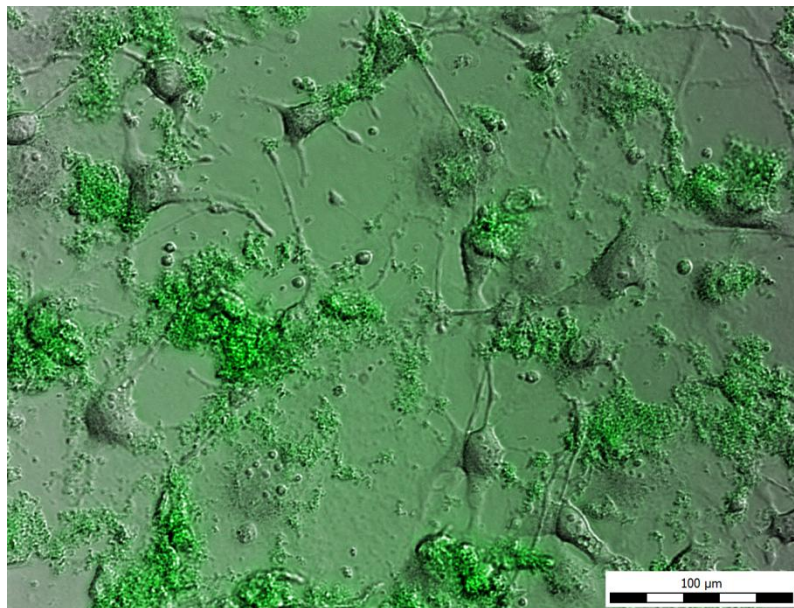


Graf. 4. : Kinetická produkce ROS QCDs po dobu 4 hod (RFU – relativní fluorescenční jednotky)

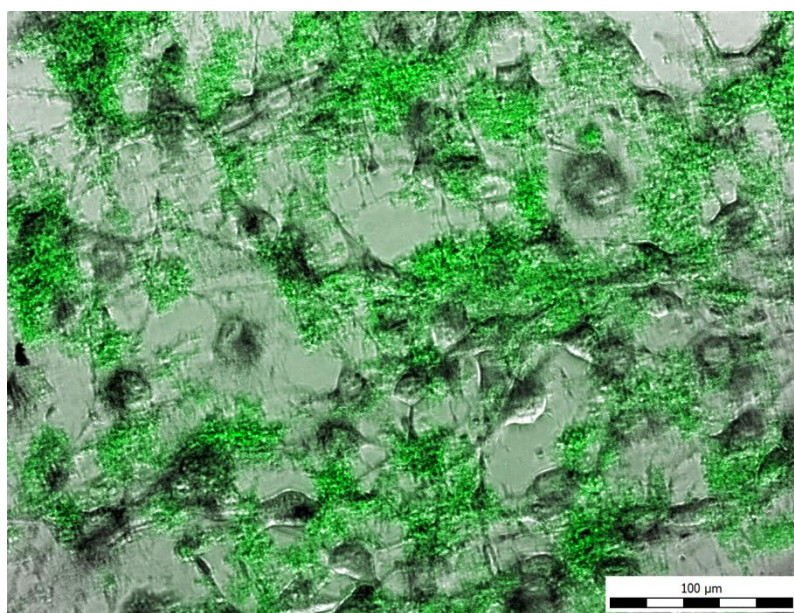


Graf. 5. : Kinetická produkce ROS GU5 po dobu 4 hod (RFU – relativní fluorescenční jednotky)

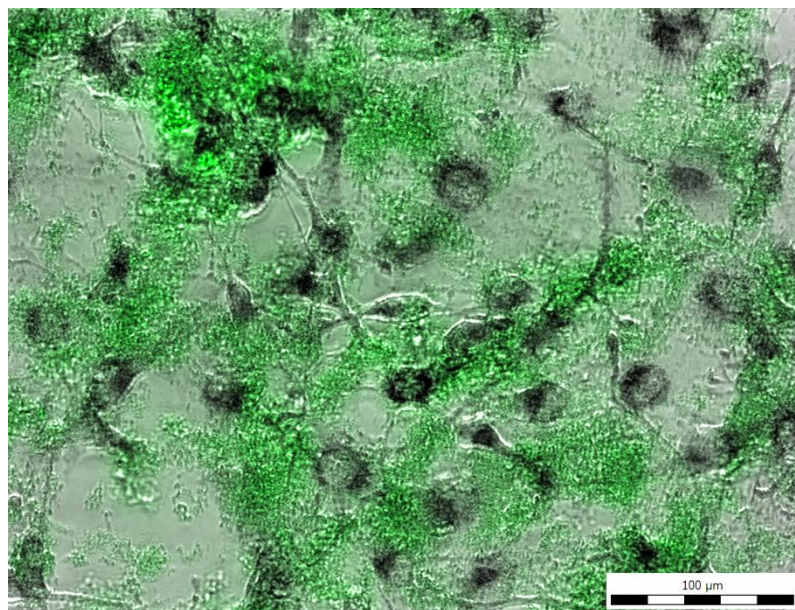
Fotografie buněk



Obr. 23 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (30 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81

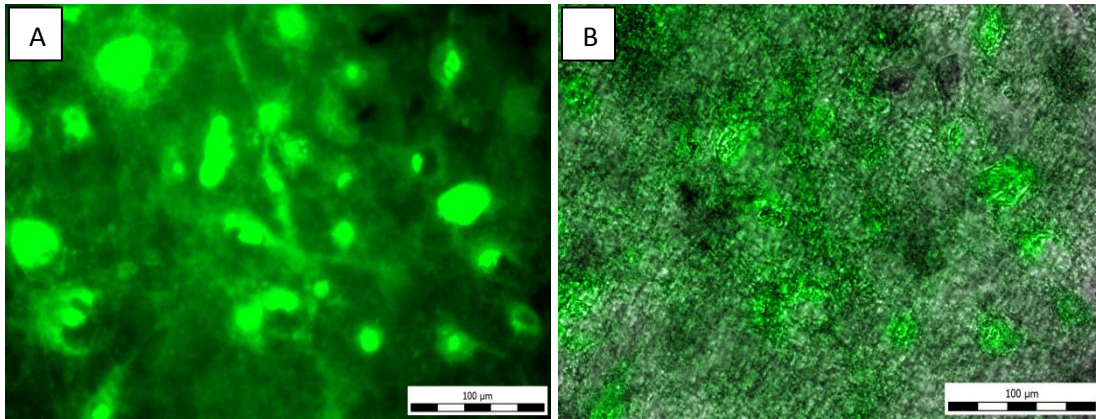


Obr. 24 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (60 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



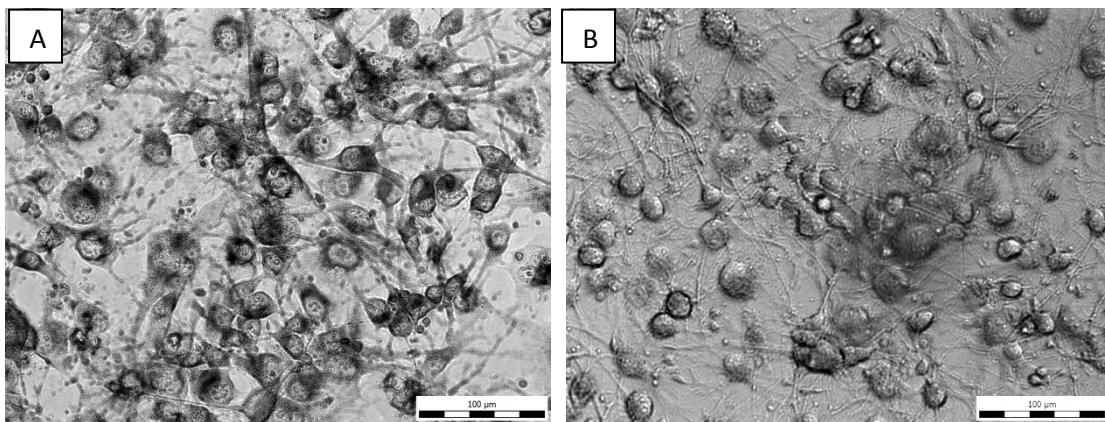
Obr. 25 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (125 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81

QCDs vykazuje nejvyšší hodnoty ROS u koncentrací 125 µg/ml, 60 µg/ml, 30 µg/ml. QCDs s koncentrací 125 µg/ml (Obr. 25) obsahuje vyšší počet teček ve srovnání s koncentrací 60 µg/ml (Obr. 24) a 30 µg/ml (Obr. 23). A přesto buňky produkují nejvyšší množství ROS u koncentrace 60 µg/ml. U ostatních koncentrací dochází k zániku buněk (snížení ROS). Uhlíkové tečky jsou přilepeny k membráně buňky (Obr. 23). U koncentrace 30 µg/ml je pozorováno menší množství buněk vzhledem ke koncentracím 125 µg/ml, 60 µg/ml. Uhlíkové tečky pronikají do buňky přes cytoplazmatickou membránu (Obr. 24).



Obr. 26 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (1000 µg/ml). A) fluorescenční mód, B) složený obraz (fluorescenční obraz + fázový kontrast). Zvětšení 200×; světelný mikroskop Olympus IX 81

QCDs s koncentrací 1000 µg/ml zeleně fluoreskují (Obr. 26). QCDs mají nejnižší hodnotu ROS při koncentraci 1000 µg/ml. Toto mohlo být způsobeno překryvem buněk tečkami.



Obr. 27 Buňky značené GU5. A) s koncentrací 7,5 µg/ml. B) s koncentrací 1000 µg/ml. Použitý objektiv 400×; použitý přístroj Olympus IX 81

Závěr

Toxicita uhlíkových teček byla zkoumaná na myších fibroblastech NIH3T3 pomocí MTT testu a měřením reaktivních forem kyslíku (ROS). Pro testy byly použity uhlíkové kvantové tečky Quaternized Carbon Dots (QCDs) a Gallate – derived carbon dots (GU5), které byly k buňkám přidány v koncentrační řadě 7,5-1000 $\mu\text{g/ml}$. Viabilita buněk byla změřena po 24 hodinové inkubaci se vzorky a byla stanovena IC – 50 obou vzorků: u QCDs IC – 50 nastala při koncentraci 489,97 $\mu\text{g/ml}$ a u GU5 při koncentraci 876,71 $\mu\text{g/ml}$.

Kinetická produkce ROS se měřila ihned po přidání uhlíkových teček a následně po 24 hodinách. Hladina ROS se po přidání vzorku GU5 k buňkám zvyšovala se vzrůstající koncentrací. Odlišný vývoj oxidačního stresu proběhl po přidání vzorku QCDs, kdy se hladina ROS zvyšovala pouze do koncentrace 60 $\mu\text{g/ml}$ a poté klesala nepřímo úměrně s aplikovanou koncentrací.

Z výsledků měření oxidačního stresu po 24 hodinách bylo pak průkazné, že během této doby se reaktivní formy kyslíku v buňkách hromadily a vznikaly se stejným průběhem jako při již zmíněném měření hladiny ROS od první aplikace nanomateriálu po dobu 4 hod.

Z testů cytotoxicity bylo zjištěno odlišné chování kladně nabitých uhlíkových teček QCDs, které způsobují oxidační stres již při nižších koncentracích a biokompatibilní chování vzorku GU5. Vyšší biokompatibilita vzorku GU5 byla potvrzena i výsledky MTT testu, kdy IC – 50 nastalo skoro při dvojnásobné koncentraci než u vzorku QCDs. Bohužel však nebylo možné buňky značené uhlíkovými tečkami GU5 zobrazit fluorescenční mikroskopií, protože při opakované hydrataci práškové formy vzorku došlo k jeho zhasnutí.

Aplikace uhlíkových kvantových teček je velice zajímavá zejména pro zobrazování živých tkání a to především pro stejnou fotostabilitu, jako mají kvantové tečky složené z těžkých kovů (např. Pb, Cd). Uhlíkové kvantové tečky se svými vlastnostmi (minimální toxicita a stabilní fluorescenční aktivita) řadí mezi slibné nanomateriály, které se využívají jako kontrastní látky a biosenzory a proto je důležité se zaměřit na jejich studie.

Seznam použitých zdrojů

- [1] POOLE, Charles P a Frank J OWENS. *Introduction to nanotechnology*. Hoboken: John Wiley, 2003, 388 s. ISBN 04-710-7935-9.
- [2] FILIPOVÁ, Zuzana, Jana KUKUTSCHOVÁ a Miroslav MAŠLÁŇ. *Rizika nanomateriálů*. 1. vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [3] GAŽO, Ján, Jiří KOHOUT, Miroslav SERÁTOR, Tibor ŠRAMKO a Miroslav ZIKMUND. *Všeobecná a anorganická chémia*. 3. vyd. Bratislava: Alfa, 1981, 804 s.
- [4] MORAVEC, Z. Kovové komplexy pentahaptofullerenů | Zdeněk Moravec. V [online]. Dostupné na internetu: <<http://z-moravec.net/chemie/chemie-aktuality/kovove-komplexy-pentahaptofullerenu/>>.
- [5] MICHNA PHD., Doc. Ing. Štefan. UNIVERZITY J.E.PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM. *Nanotechnologie a nanomateriály* [online]. [cit. 2013-05-27]. Dostupné z: <http://www.stefanmichna.com>
- [6] Grafen - materiál budoucnosti. V [online]. Dostupné na internetu: <<http://fyzmatik.pise.cz/122032-grafen-material-budoucnosti.htm>>
- [7] SATTLER, Klaus D. *Handbook of nanophysics*. Boca Raton: Taylor, 2011, s. 7-1. ISBN 9781420075465.
- [8] VALENTIN N. Popov. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures: Optical Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes Within a Nonorthogonal Tight-Binding Model*. Vol 13, 2005. 45 - 52 s. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix. France.
- [9] KOŠŤÁKOVÁ, Eva. Uhlíkové nanotrubičky: Rozdělení, struktura. [online]. Technická univerzita v Liberci, fakulta textilní, katedra netkaných textilií. [cit. 2011-12-18]. Dostupné z: http://www.ft.tul.cz/depart/knt/nanotex/2.prednaska%20_final%202010_na%20web.pdf
- [10] KOŠŤÁKOVÁ, Eva. Uhlíkové nanotrubičky: Syntéza – výroba, vlastnosti a uplatnění. [online]. Technická univerzita v Liberci, fakulta textilní, katedra netkaných textilií. [cit. 2011-12-08]. Dostupné z: http://www.ft.tul.cz/depart/knt/nanotex/3.prednaska_final%20na%20web.pdf
- [11] COLEMAN Jonathan N, Khan Umar. *Small but strong: A review of the mechanical properties of carbon nanotube–polymer composites*. Vol 44, 2006. 1624–1652 s. School of Physics, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland.
- [12] TARAPADA Roy. *Finite Element Modeling Of Multiwalled Carbon Nanotube: A Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of .* 2010. 29 s. National institute of technology Rourkela. India

- [13] LEWINSKI, Nastassja, Vicki COLVIN a Rebekah DREZEK. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small*. 2008-01-18, vol. 4, issue 1, s. 26-49. DOI: 10.1002/sml.200700595. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200700595> cytotoxicita of nanoparticles
- [14] KAYAT, Jitendra, Virendra GAJBHIYE, Rakesh Kumar TEKADE a Narendra Kumar JAIN. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes: a systematic report. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011, vol. 7, issue 1, s. 40-49. DOI: 10.1016/j.nano.2010.06.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963410001693> cytotoxicity of single walled carbon nanotubes
- [15] A Nanotube Patch to Help Heal the Heart - Technology Review. V *Technology Review* [online]. Dostupné na internetu: <<http://www.technologyreview.com/biomedicine/37610/>>.
- [16] TRAN, Phong A., Lijie ZHANG a Thomas J. WEBSTER. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, vol. 61, issue 12, s. 1097-1114. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X09002282>
- [17] O'CONNELL, M. J. *Carbon Nanotubes: Properties and Applications*. 1. vyd. London: CRC Press, 2006. ISBN 978-0-849-32748-3
- [18] TJONG, Sie Chin. *Carbon Nanotube Reinforced Composite*. 1. vyd. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. 242 s. ISBN 978-3-527-40892-4.
- [19] Nanotube production. V [online]. Dostupné na internetu: <<http://ipn2.epfl.ch/CHBU/NTproduction1.htm>>.
- [20] GUO, T. et al. Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. V *Chemical Physics Letters*. 1995. Vol. 243, no. 1-2, s. 49-54.
- [21] ANDO, Y. ZHAO, X. SUGAI, T. KUMAR, M. Growing carbon nanotubes. *Materials today*. October 2004. ISSN: 1369 7021.
- [22] BRONIKOWSKI, M. J. CVD growth of carbon nanotube bundle arrays. *Carbon*, 2006, vol. 44, no. 13, s. 2822-2832.
- [23] SATTLER, Klaus D. *Handbook of nanophysics*. Boca Raton: Taylor, 2011, s. 7-7, 7-8. ISBN 9781420075465.
- [24] SATTLER, Klaus D. *Handbook of nanophysics*. Boca Raton: Taylor, 2011, s. 1-2 - 1-7. ISBN 9781420075465.
- [25] LI, Liang, Huifeng QIAN a Jicun REN. Rapid synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals in the aqueous phase by microwave irradiation with controllable temperature. *Chemical Communications*. 2005, issue 4, s. 528-. DOI: 10.1039/B412686F. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b412686f>

- [26] BAILEY, Robert E., Andrew M. SMITH a Shuming NIE. Quantum dots in biology and medicine. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*. 2004, vol. 25, issue 1, s. 1-12. DOI: 10.1016/j.physe.2004.07.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386947704003443>
- [27] XU, Zhihua, Jiaguo YU a Gang LIU. Fabrication of carbon quantum dots and their application for efficient detecting Ru(bpy)₃²⁺ in the solution. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013, vol. 181, s. 209-214. DOI: 10.1016/j.snb.2013.01.043. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400513000592>
- [28] DAVOREN MARIA, a kol. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells, *Toxicology in Vitro*. Vol. 21, s.438–448
- [29] LINDBERG HANNA K., a kol. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro, *Toxicology Letter*. Vol.186,s.166–173
- [30] TING-TING FANG, a kol., Toxicity evaluation of CdTe quantum dots with different size on Escherichia coli, *Toxicology in Vitro*. Vol.26,s. 1233–1239
- [31] SATTLER, Klaus D. *Handbook of nanophysics*. Boca Raton: Taylor, 2011, s. 16-11. ISBN 9781420075465
- [32] SATTLER, Klaus D. *Handbook of nanophysics*. Boca Raton: Taylor, 2011, s. 16-3,16-4. ISBN 9781420075465
- [33] STIBOR, Ondřej. *ANALÝZA UHLÍKOVÝCH KVANTOVÝCH TEČEK POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ*. Olomouc, 2011. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce RNDr. Jan Petr, Ph.D. Dostupné z: http://theses.cz/id/ro59vu/Stibor_AnalyzaCdotsCELIF.pdf.
- [34] ZHANG, Ye-Yun, Ming WU, Yan-Qin WANG, Xi-Wen HE, Wen-You LI a Xi-Zeng FENG. A new hydrothermal refluxing route to strong fluorescent carbon dots and its application as fluorescent imaging agent. *Talanta*. 2013, vol. 117, s. 196-202. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.09.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914013007315>
- [35] LIU, Yi, Ning XIAO, Ningqiang GONG, Hao WANG, Xin SHI, Wei GU a Ling YE. One-step microwave-assisted polyol synthesis of green luminescent carbon dots as optical nanoprobe. *Carbon*. 2013, s. -. DOI: 10.1016/j.carbon.2013.10.086. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008622313010488>
- [36] HAN, Baofu, Wenxing WANG, Hongyan WU, Fang FANG, Naizhi WANG, Xiujuan ZHANG a Shukun XU. Polyethyleneimine modified fluorescent carbon dots and their application in cell labeling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.

2012, vol. 100, s. 209-214. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.05.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776512002925>

- [37] DONG, Wei, Yan DONG, Ying WANG, Shiqi ZHOU, Xin GE, Lili SUI a Jingwen WANG. Labeling of human hepatocellular carcinoma cells by hexamethylene diamine modified fluorescent carbon dots. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013, vol. 116, s. 209-213. DOI: 10.1016/j.saa.2013.07.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138614251300749X>
- [38] MEWADA, Ashmi, Sunil PANDEY, Sachin SHINDE, Neeraj MISHRA, Goldie OZA, Mukeshchand THAKUR, Maheshwar SHARON a Madhuri SHARON. Green synthesis of biocompatible carbon dots using aqueous extract of *Trapa bispinosa* peel. *Materials Science and Engineering: C*. 2013, vol. 33, issue 5, s. 2914-2917. DOI: 10.1016/j.msec.2013.03.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092849311300180X>
- [39] GOLLAVELLI, Ganesh a Yong-Chien LING. Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe. *Biomaterials*. 2012, vol. 33, issue 8, s. 2532-2545. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211014657>
- [40] MAO, Hongying, Wei CHEN, Sophie LAURENT, Coralie THIRIFAYS, Carmen BURTEA, Farhad REZAEI a Morteza MAHMOUDI. Hard corona composition and cellular toxicities of the graphene sheets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, vol. 109, s. 212-218. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.03.049. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776513002361>
- [41] GOENKA, Sumit, Vinayak SANT a Shilpa SANT. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 2014, vol. 173, s. 75-88. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.10.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836591300847X>
- [42] Základní techniky práce s tkáňovými kulturami. In: *Ústav lékařské biochemie: I. Lékařská fakulta UK* [online]. [cit. 2013-12-3]. Dostupné z: <http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>
- [43] ALTMAN, S. et al.: Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and fluorimetric Assay for Mammalian Cell Viability Determinations, *Biotechnology Progress*, 1993, 9, s. 671-674
- [44] KRUŽÍK P., J MOOS., R. VLČEK.: Analyzátory buněk a částic, *In vitro diagnostika*, 2006, 3, s. 4-5.

- [45] ROTTER, B.A. a Y.-N. OH. MTS/PMS colorimetric assay is unsuitable for measuring mitogenic responses in porcine blood lymphocytes. *Journal of Immunological Methods*. 1996, vol. 199, issue 2, s. 205-209. DOI: 10.1016/S0022-1759(96)00183-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175996001834>
- [46] MALICH, Gregor, Boban MARKOVIC a Chris WINDER. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*. 1997, vol. 124, issue 3, s. 179-192. DOI: 10.1016/S0300-483X(97)00151-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X97001510>
- [47] BERRIDGE, Michael V., Patries M. HERST a An S. TAN. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*. Amsterdam: Elsevier, 2005, vol. 11, s. 127. DOI: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387265605110047>
- [48] MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983, vol. 65, 1-2, s. 55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>
- [49] ANIARA. *Why should I use XTT instead of MTT* [online]. 4-2007. [cit. 2013-12-03]. Dostupné z: <http://www.aniara.com/pdf/literature/XTTvsMTT.pdf>
- [50] MTT test. In: *Laboratoř experimentální medicíny: Dětská klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci* [online]. [cit. 2013-12-3]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>
- [51] SIMON-DECKERS, A., B. GOUGET, M. MAYNE-L'HERMITE, N. HERLIN-BOIME, C. REYNAUD a M. CARRIÈRE. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*. Překlad John Bester. 2008, vol. 253, 1-3, s. 137-146. DOI: 10.1016/j.tox.2008.09.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X08004332>
- [52] ATTC. *XTT AND MTT CELL PROLIFERATION ASSAY KITS* [online]. 2010. vyd. [cit. 2013-10-29]. Dostupné z: http://www.atcc.org/~media/PDFs/XTT_MTT_Technical_Bulletin.ashx
- [53] BOYD, Vinc; CHOLEWA, Olivia Maria; PAPAS, Klearchos K. Limitations in the use of fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI) and cell permeable nucleic acid stains for viability measurements of isolated islets of Langerhans. *Current trends in biotechnology and pharmacy*, 2008, 2.2: 66
- [54] HORVÁTH, Lenke, Arnaud MAGREZ, Marko BURGHARD, Klaus KERN, László FORRÓ a Beat SCHWALLER. Evaluation of the toxicity of graphene derivatives on cells of the lung luminal surface. *Carbon*. 2013, vol. 64, s. 45-60.

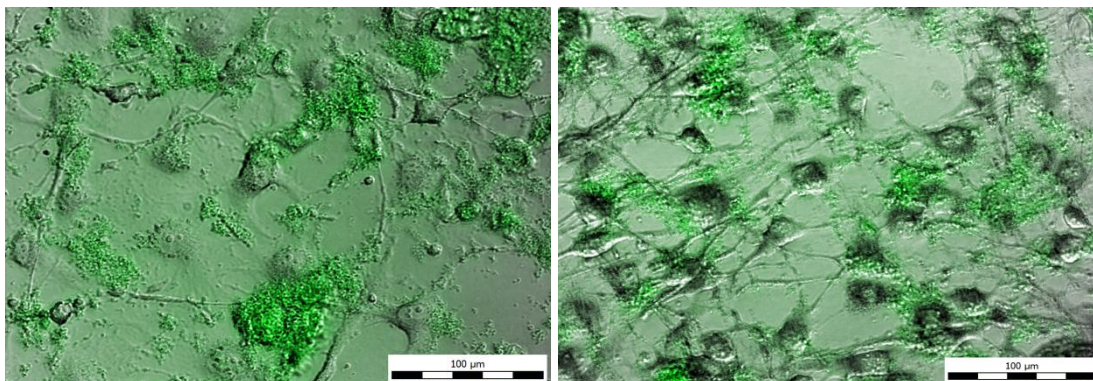
DOI: 10.1016/j.carbon.2013.07.005. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000862231300626X>

- [55] WAIWIJIT, U., W. KANDHAVIVORN, B. OONKHANOND, T. LOMAS, D. PHOKARATKUL, A. WISITSORAAT a A. TUANTRANONT. Cytotoxicity assessment of MDA-MB-231 breast cancer cells on screen-printed graphene-carbon paste substrate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, vol. 113, s. 190-197. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.09.008. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776513005754>
- [56] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 80-902906-2-0.
- [57] KOVÁŘ, Jan. *Buněčná proliferace a mechanismy její regulace I*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 64 s. ISBN 80-246-0704-2.
- [58] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 9. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007, 575 s., [92] s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-7182-213-4.
- [59] KOVÁŘ, Jan. *Buněčná proliferace a mechanismy její regulace II*. Praha: Karolinum, 2003, 74 s. ISBN 80-7184-804-2.
- [60] HOLA, Katerina, Athanasios B. BOURLINOS, Ondrej KOZAK, Karel BERKA, Karolina M. SISKOVA, Marketa HAVRDOVA, Jiri TUCEK, Klara SAFAROVA, Michal OTYEPKA, Emmanuel P. GIANNELIS a Radek ZBORIL. Photoluminescence effects of graphitic core size and surface functional groups in carbon dots: COO⁻ induced red-shift emission. *Carbon*. 2014, vol. 70, s. 279-286. DOI: 10.1016/j.carbon.2014.01.008. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000862231400030X>
- [61] BOURLINOS, Athanasios B., Radek ZBOŘIL, Jan PETR, Aristides BAKANDRITSOS, Marta KRYSMANN a Emmanuel P. GIANNELIS. Luminescent Surface Quaternized Carbon Dots. *Chemistry of Materials*. 2012-01-10, vol. 24, issue 1, s. 6-8. DOI: 10.1021/cm2026637. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm2026637>
- [62] ROS Detection Reagent: CM-H2DCFDA From Invitrogen. *Biocompare* [online]. [cit. 2013-12-16]. Dostupné z: <http://www.biocompare.com/Product-Reviews/40565-ROS-Detection-Reagent-CM-H2DCFDA-From-Invitrogen/>
- [63] O'MALLEY, Yunxia Q., Krzysztof J. RESZKA a Bradley E. BRITIGAN. Direct oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by pyocyanin and other redox-active compounds independent of reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004, vol. 36, issue 1, s. 90-100. DOI:

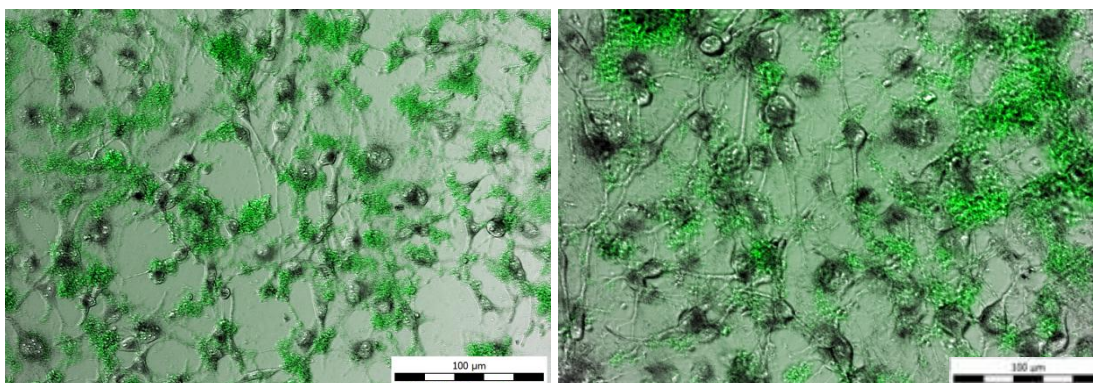
- 10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.021. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089158490300649X>
- [64] ÚLOHA 17: Stanovení koncentrace peroxidu vodíku fluorimetricky s činidlem Amplex Red. Stanovení aktivity enzymu xanthinoxidasy v purifikované formě a v buněčném extraktu. *Univerzita Pačého v Olomouci: Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie* [online]. 2013. vyd. [cit. 2013-12-15]. Dostupné z: http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/emb/17_H202_AR_XOD.pdf
- [65] Esteráza nespecifická + NaF: Krev. b.(dřeň); vlastnost (popis). *Datový standard MZ ČR - verze 4: Webové služby pro distribuci číselníků datového standardu, DTD a schemat* [online]. [cit. 2013-12-16]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/_KOMP_CNAEASEF.htm
- [66] ZRAZHEVSKIY, Pavel a Xiaohu GAO. Multifunctional quantum dots for personalized medicine. *Nano Today*. 2009, vol. 4, issue 5, s. 414-428. DOI: 10.1016/j.nantod.2009.07.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S174801320900084X>
- [67] LIU, Zhuang, Scott TABAKMAN, Kevin WELSHER a Hongjie DAI. Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Research*. 2009, vol. 2, issue 2, s. 85-120. DOI: 10.1007/s12274-009-9009-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12274-009-9009-8>
- [68] MEHTA, Vaibhavkumar N., Sanjay JHA a Suresh Kumar KAILASA. One-pot green synthesis of carbon dots by using *Saccharum officinarum* juice for fluorescent imaging of bacteria (*Escherichia coli*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2014, vol. 38, s. 20-27. DOI: 10.1016/j.msec.2014.01.038. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493114000460>

Přílohy

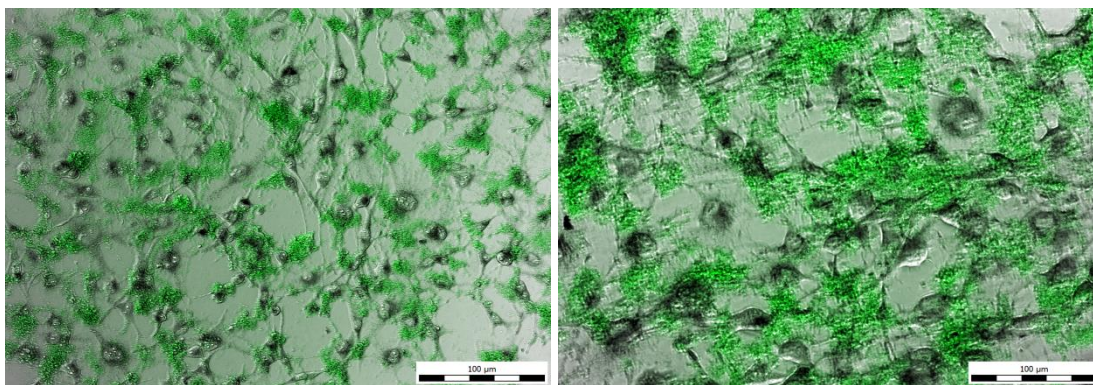
Fotografie buněk s uhlíkovými kvantovými tečkami.



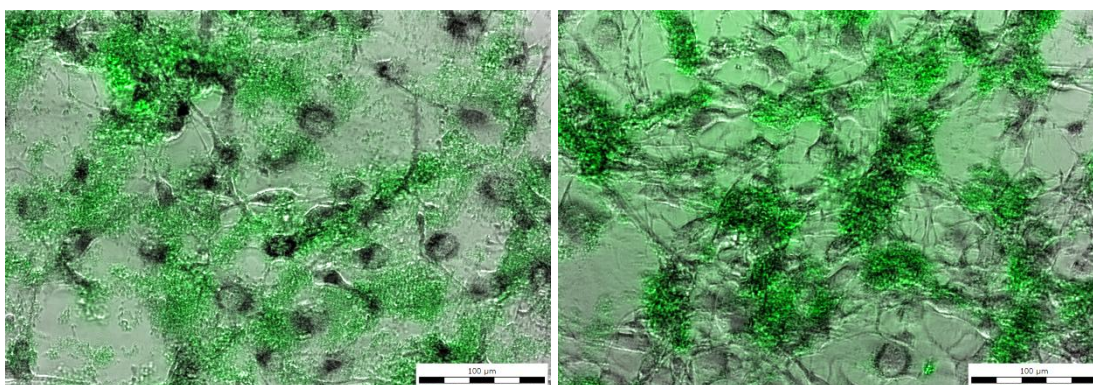
Obr. 28 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (15 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



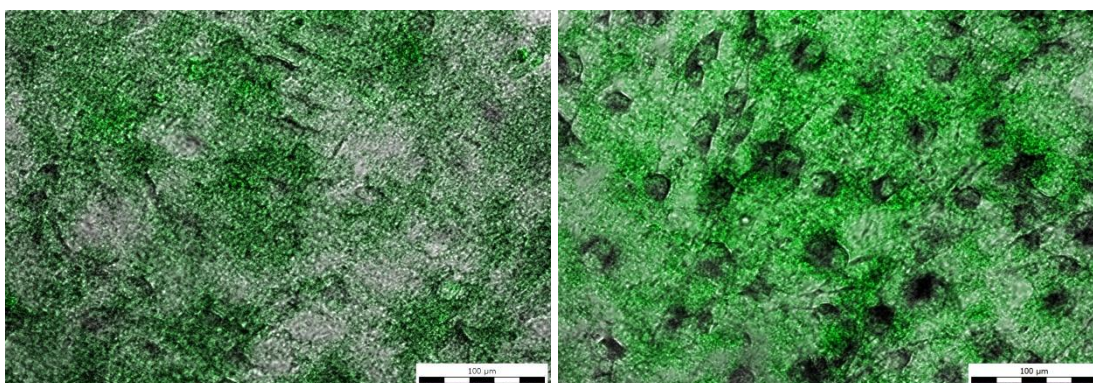
Obr. 29 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (30 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



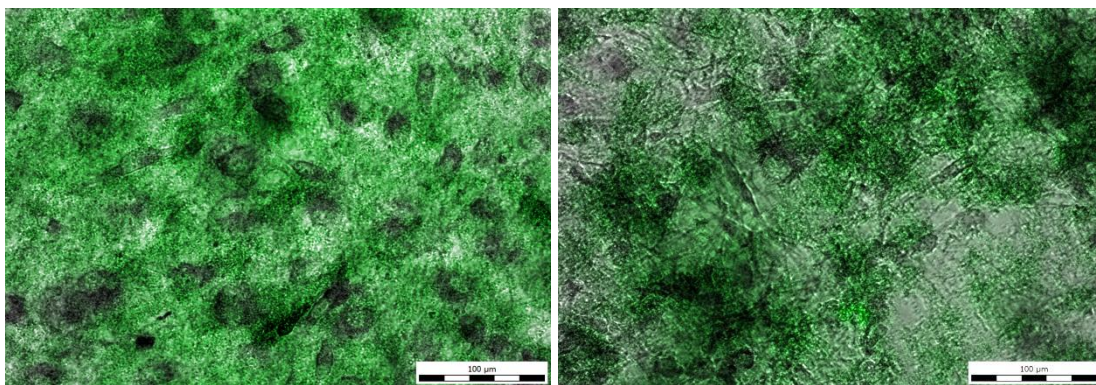
Obr. 30 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (60 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



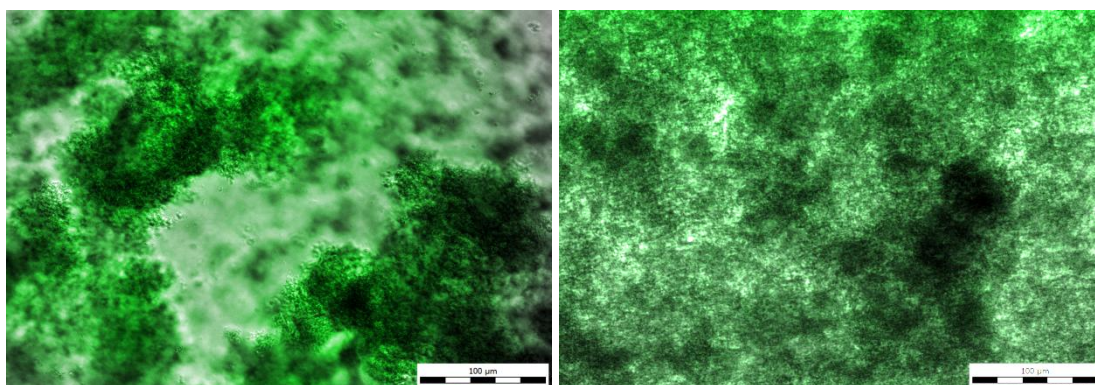
Obr. 31 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (125 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



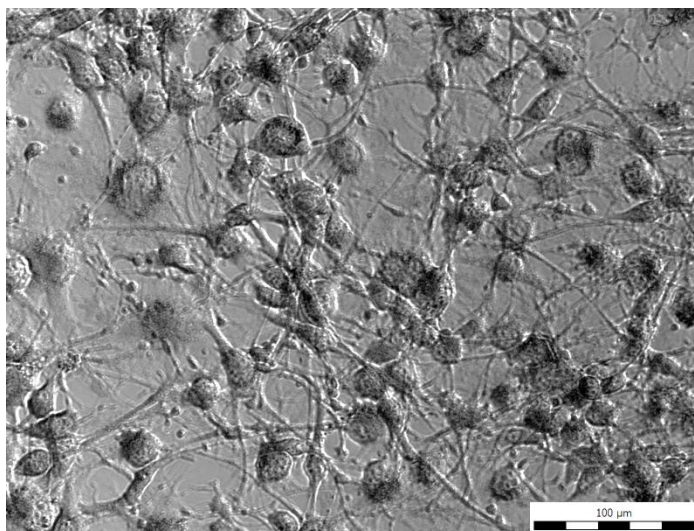
Obr. 32 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (250 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



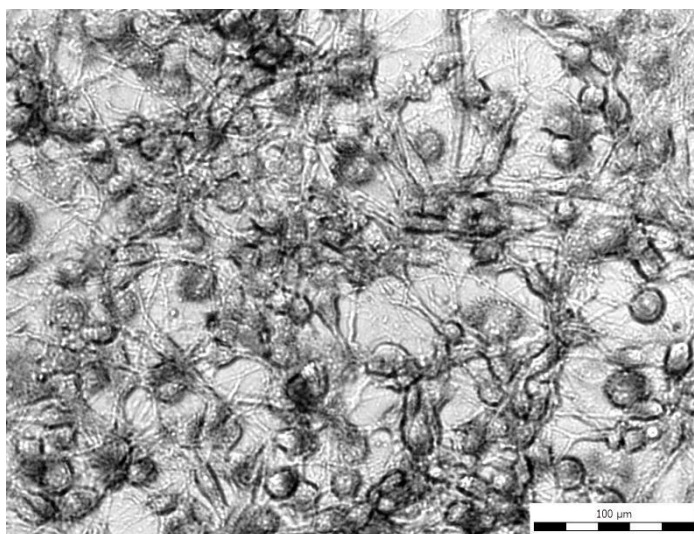
Obr. 33 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (500 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



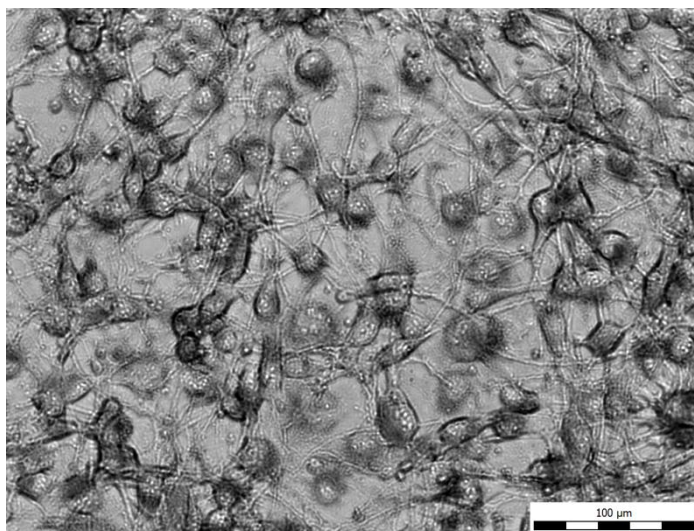
Obr. 34 Fluorescenčně značené buňky vzorkem QCDs (1000 µg/ml). Snímek složen z fluorescenčního obrazu a fázového kontrastu. Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



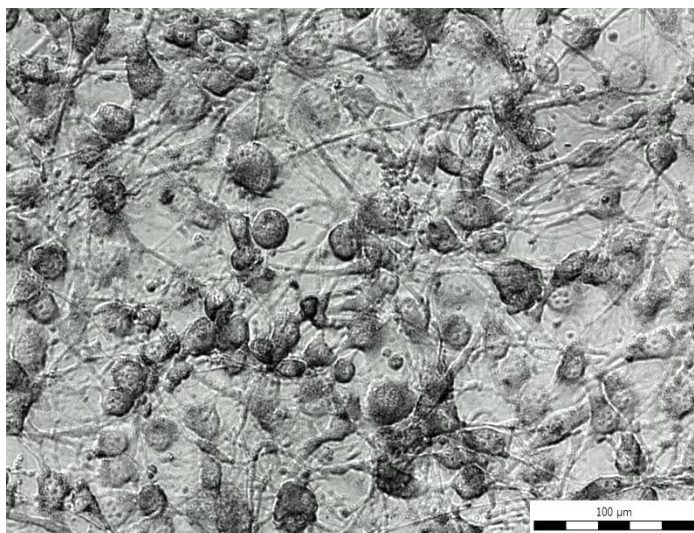
Obr. 35 Buňky značené GU5 (7,5 µg/ml). Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



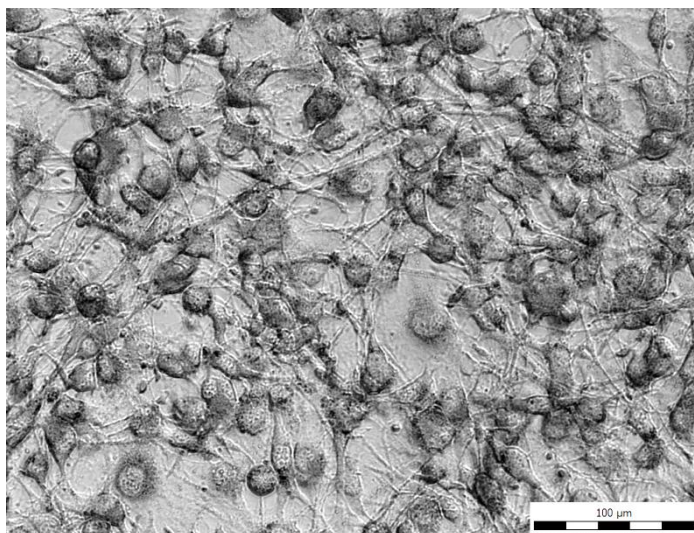
Obr. 36 Buňky značené GU5 (15 µg/ml). Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



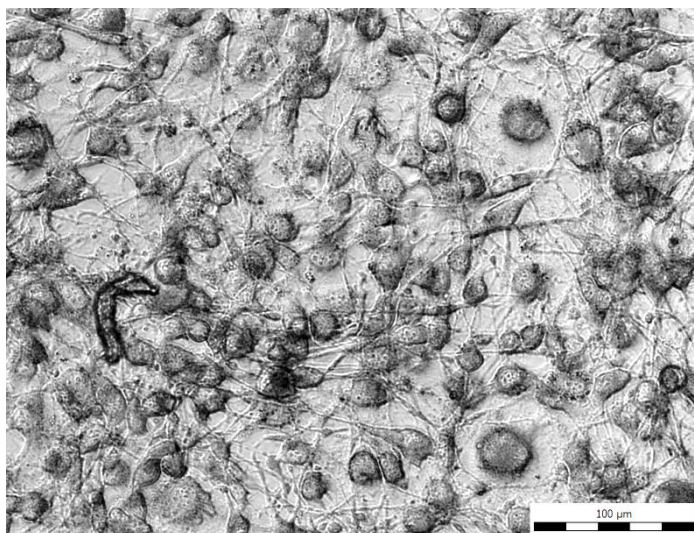
Obr. 37 Buňky značené GU5 (30 µg/ml). Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



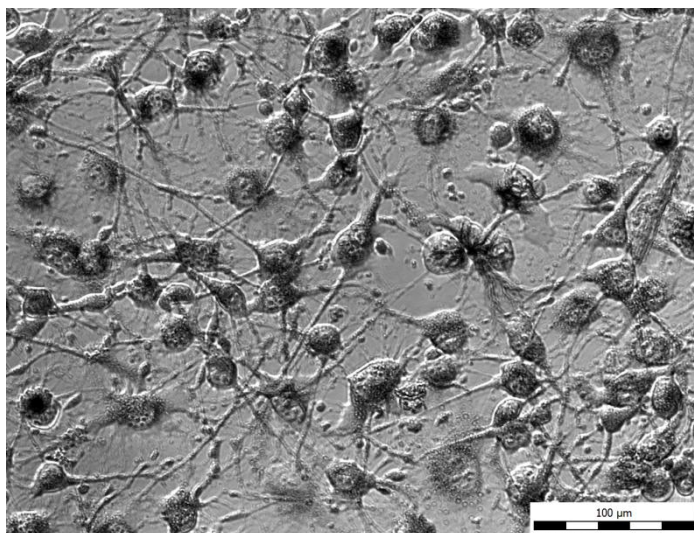
Obr. 38 Buňky značené GU5 (60 µg/ml). Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



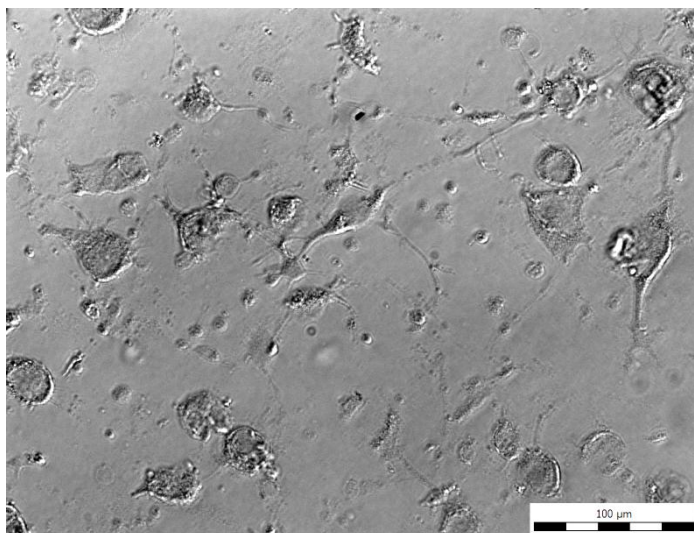
Obr. 39 Buňky značené GU5 (125 µg/ml). Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



Obr. 40 Buňky značené GU5 (250 µg/ml). Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



Obr. 41 Buňky značené GU5 (500 µg/ml). Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81



Obr. 42 Buňky značené GU5 (1000 µg/ml). Zvětšení 400×; světelný mikroskop Olympus IX 81