

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

**Hodnocení cytotoxicity nanočástic a jejich
Ramanova spektroskopická charakterizace na
buněčné úrovni**

Mgr. Monika Perlovská Harvanová

Školitel: Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP

OLOMOUC 2017

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci vypracovala samostatně s využitím citované literatury uvedené v závěru práce.

Olomouc 2017

Mgr. Monika Perlovská Harvanová

.....

Ráda bych poděkovala své školitelce, Prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. za její pozitivní přístup a odborné pedagogické vedení. Děkuji doc. Ing. Kateřině Bartoň Tománkové, Ph.D. a jejím studentům Mgr. Jakobovi Malohlavovi, Ph.D. a Mgr. Janě Jiravové za spolupráci při řešení experimentální části práce a paní Mgr. Janě Zapletalové, Dr. za pomoc se statistickým vyhodnocením výsledků. Celému kolektivu pracoviště Lékařské biofyziky děkuji za přátelské prostředí, jehož součástí jsem mohla být. Poděkování rovněž patří Ústavu farmakologie LF UP za možnost spoluúčasti na odborném školení k obsluze konfokálního Ramanova mikroskopu ve WITec GmbH v Ulmu. V neposlední řadě děkuji své rodině za motivaci a neutuchající podporu.

Obsah

1	Úvod do problematiky nanočástic	10
1.1	Úvod	10
1.2	Definice nanočástic	10
1.3	Původ a příprava nanočástic	11
1.4	Některé významné vlastnosti nanočástic	12
1.5	Využití nanočástic TiO ₂ a AgNPs v produktech denního používání	13
2	Toxicita nanočástic	15
2.1	Úvod	15
2.2	Penetrace nanočástic do kůže	15
2.2.1	Potenciální mechanismy penetrace nanočástic do kůže	15
2.3	Buněčný příjem nanočástic	17
2.4	Mechanismy toxického účinku nanočástic	20
2.4.1	Oxidativní stres	20
2.4.2	Poškození DNA	21
2.5	Genotoxicita nanočástic	21
2.6	Toxicita nanočástic TiO ₂ a AgNPs	22
3	Vybrané metody charakterizace nanočástic	24
3.1	Úvod	24
3.2	Dynamický rozptyl světla (DLS)	24
3.3	Mikroskopické metody	25
3.3.1	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	25
3.3.2	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	26
3.3.3	Mikroskopie atomárních sil (AFM)	26
3.4	Jiné metody charakterizace nanočástic	27
4	Úvod do Ramanovy spektroskopie	29
4.1	Úvod	29
4.2	Ramanův jev	29
4.3	Ramanovo spektrum	31
4.4	Ramanovo spektrum biomolekul	33
5	Konfokální Ramanova mikroskopie	36
5.1	Úvod	36
5.2	Princip metody a instrumentace v konfokální Ramanově mikroskopii	36
5.3	Hyperspektrální datové soubory	41

5.4	Univariační metoda analýzy obrazu v Ramanově mikroskopii	41
5.5	Multivariační metody analýzy obrazu v Ramanově mikroskopii	42
5.5.1	Analýza hlavních komponent.....	43
5.5.2	Analýza vrcholových komponent	43
5.5.3	Shluková analýza	45
5.5.4	Další multivariační metody analýzy v Ramanově mikroskopii	46
5.6	Ramanova mikroskopie v biomedicíně.....	46
6	Cíle práce	48
7	Experimentální část	49
7.1	Použitý materiál, přístroje a software	49
7.2	Studované nanočástice	50
7.3	Zobrazení nanočástic metodou AFM.....	51
7.4	Buněčné kultury	52
7.5	Stanovení hodnoty IC ₅₀ nanočástic - MTT test.....	52
7.6	Detekce reaktivních forem kyslíku	53
7.7	Kometový test	54
7.8	Statistické zpracování	55
7.9	Ramanova spektroskopie nanočástic, zobrazení buněk a buněčného příjmu nanočástic 56	
8	Výsledky	58
8.1	Mikroskopická a spektroskopická charakterizace studovaných nanočástic.....	59
8.1.1	Zobrazení studovaných nanočástic TiO ₂ a AgNPs metodou AFM	59
8.1.2	Ramanova spektroskopie studovaných nanočástic TiO ₂ a AgNPs.....	62
8.2	Ramanova mikroskopie buněčného příjmu nanočástic.....	63
8.3	Hodnocení cytotoxicity, genotoxicity a buněčného příjmu studovaných nanočástic TiO ₂ a AgNPs na buněčné linii lidských keratinocytů SVK-14	67
8.4	Hodnocení cytotoxicity, genotoxicity a buněčného příjmu studovaných nanočástic TiO ₂ a AgNPs na buněčné linii lidských fibroblastů BJ	71
8.5	Vyhodnocení buněčného příjmu AgNPs u buněčných linií SVK-14 a NIH3T3	76
9	Diskuze	77
	Závěr	83
	Seznam použité literatury	84
	Publikační činnost autora	102

Souhrn

Předmětem této disertační práce bylo hodnocení ovlivnění buněk buněčných linií lidských keratinocytů SVK-14 a lidských fibroblastů BJ působením studovaných nanočástic oxidu titaničitého (TiO_2) a nanočástic stříbra (AgNPs) z komerčně dostupných přípravků určených pro kosmetické účely k přímé aplikaci na kůži nebo na jiné upotřebení, při kterém kontakt s pokožkou není vyloučen. Výsledky experimentální části práce zahrnují mikroskopickou charakterizaci morfologie a velikosti studovaných nanočástic s využitím mikroskopie atomárních sil (AFM) a hodnotí cytotoxický a genotoxický potenciál studovaných nanočástic stanovením hodnot koncentrace IC_{50} , indukce produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a fragmentace DNA s využitím metody kometového testu. Současně jsou prezentovány výsledky hodnocení buněčného příjmu studovaných nanočástic s využitím moderní mikroskopické techniky – konfokální Ramanovy mikroskopie. Konfokální Ramanova mikroskopie umožnila zobrazit buněčný příjem, distribuci a intracelulární chování nanočástic s minimálními nároky na přípravu vzorku a bez nutnosti využití externího značení. Výsledky charakterizace nanočástic metodou AFM prezentují v několika případech odlišné hodnoty velikosti nanočástic v porovnání s hodnotami velikostí deklarovanými od výrobce. Výsledky práce poukazují na signifikantní rozdíly v cytotoxickém působení nanočástic TiO_2 a AgNPs a naznačují až o několik řádů vyšší hodnoty koncentrace IC_{50} u nanočástic TiO_2 . Navzdory tomu, indukce produkce ROS v případě nanočástic TiO_2 byla signifikantnější než v případě AgNPs. Všechny studované nanočástice TiO_2 i AgNPs způsobily fragmentaci DNA, nicméně, ani v jednom z prezentovaných případů nebyla prokázána vyšší než 10% fragmentace DNA v buňkách. U všech studovaných nanočástic byl potvrzen předpoklad jejich buněčného příjmu. Vizualizace nanočástic TiO_2 poukázala na signifikantnější aglomeraci nanočástic v buněčném prostředí v porovnání s AgNPs, co by mohlo souviset s obecně vyššími hodnotami koncentrace IC_{50} stanovenými pro nanočástice TiO_2 v porovnání s AgNPs. Současně je také v práci zhodnocen vliv modifikace výrobního postupu na vlastnosti AgNPs a jejich projevy v buněčném prostředí. Ukázalo se, že ačkoliv zmíněná modifikace vážně neovlivnila cytotoxický a genotoxický potenciál vzorků AgNPs, projevila se ve vlivu na buněčný příjem a aglomeraci nanočástic v buňkách. Vedle vlivu výrobního postupu na aglomeraci AgNPs v buňkách jsou také prezentovány výsledky studia buněčného příjmu a intracelulárního chování identického vzorku AgNPs u buněk odlišných buněčných linií - linií lidských keratinocytů SVK-14 a myších fibroblastů NIH3T3. U obou buněčných linií bylo zobrazeno odlišné intracelulární chování nanočástic, které doplňuje publikované výsledky o cytotoxicitě a genotoxicitě studovaných AgNPs.

Disertační práce představuje metodu konfokální Ramanovy mikroskopie jako nového nástroje pro zobrazení buněčného příjmu nanočástic, který doplňuje konvenční metody studia cytotoxických a genotoxických účinků. Výsledky práce přispívají do diskuze o potenciálním zdravotním riziku spojeném s používáním nanočástic TiO_2 a AgNPs.

Summary

The aim of this work was to evaluate the influence of studied commercially available titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles and AgNPs on SVK-14 human keratinocytes and BJ human fibroblasts cell lines with respect to health risks associated with their use for direct application on skin or another type of use where contact with skin is also probable. The results of the experimental work comprise a microscopic characterisation of nanoparticles size and morphology using atomic force microscopy (AFM) and evaluate cytotoxic and genotoxic potential of studied nanoparticles by assessment of IC₅₀ values, induction of reactive oxygen species (ROS) production and DNA fragmentation using comet assay. Furthermore, the results of the evaluation of nanoparticles cellular uptake using modern microscopic technique – confocal Raman microscopy are shown. Confocal Raman microscopy allowed to visualise the cellular uptake, distribution and intracellular behaviour of nanoparticles with the minimum sample preparation in the label-free manner. The results of AFM characterisation of nanoparticles size show different values from values declared by manufacturer. The results present significant differences in cytotoxicity of TiO₂ to compare with AgNPs and show several orders of magnitude higher IC₅₀ values in TiO₂ samples. Despite this fact, ROS production induced by TiO₂ nanoparticles was more significant in a comparison to AgNPs. All studied samples of TiO₂ and AgNPs caused DNA fragmentation, however, higher than 10% fragmentation was not observed. The assumption of cellular uptake was confirmed in all studied samples of nanoparticles. Visualisation of cellular uptake show more significant agglomeration of TiO₂, which could be associated with much higher IC₅₀ values to compare with AgNPs. Concurrently, the results also show the evaluation of the influence of sample manufacturing procedure modification on properties and cellular uptake of AgNPs. Although it was shown that this modification did not cause significant changes in cytotoxic or genotoxic potential, it affected the cellular uptake and agglomeration of nanoparticles in cells. Beside the effect of manufacturing procedure, the results of the cellular uptake of identical AgNPs in two different cell lines – SVK-14 human keratinocytes and NIH3T3 mouse fibroblasts are shown. Both cell lines show different intracellular behaviour of AgNPs, which is complementary to published results related to cytotoxicity and genotoxicity of studied AgNPs.

The work introduces confocal Raman microscopy as a new investigation tool for visualisation of the cellular uptake of nanoparticles. This microscopic technique supplements other conventional methods used in cytotoxicological and genotoxicological studies. The results of this work contribute to the discussion about the potential health risk associated with TiO₂ nanoparticles and AgNPs and their use.

Seznam použitých zkratk

- AFM - mikroskopie atomárních sil (z angl. atomic force microscopy)
- AgNPs - nanočástice stříbra
- ANN - umělá neuronová síť (z angl. artificial neural network)
- CCD - zařízení s vázanými náboji (z angl. charge couple device)
- CM-H₂DCFDA - (5,6-chloromethyl-2,7'-dichlorodihydrofluorescein)
- DLS - dynamický rozptyl světla (z angl. dynamic light scattering)
- DMEM - kultivační médium (z angl. Dulbecco's modified Eagle medium)
- DMSO – dimetylsulfoxid
- EDTA - etylendiamintetraoctová kyselina
- FBS - fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)
- FCM - fuzzy C-mean shluková analýza (z angl. fuzzy C-mean cluster analysis)
- GMM - Gaussovy směsné modely (z angl. Gaussian mixture modelling)
- HCA - hierarchická shluková analýza (z angl. hierarchical cluster analysis)
- HMP - s vysokým bodem tání (z angl. high melting point)
- IC₅₀ - střední inhibiční koncentrace (z angl. half inhibitory concentration)
- KMC - k-mean shluková analýza (z angl. k-mean cluster analysis)
- LMP - s nízkým bodem tání (z angl. low melting point)
- MTT - [3-(4,5 – dimethylthiazol – 2 – yl) – 2,5 – difenyl tetrazolium bromid]
- NA - numerická apertura
- PBS - solný fosfátový pufr (z angl. phosphate buffer saline)
- PCA - analýza hlavních komponent (z angl. principal component analysis)
- PCS - fotonová korelační spektroskopie (z angl. photon correlation spectroscopy)
- QELS - kvazi-elastický rozptyl světla (z angl. quasi elastic light scattering)
- RME - receptory zprostředkovaná endocytóza (z angl. receptor mediated endocytosis)
- ROS - reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
- SCGE - gelová elektroforéza jednotlivých buněk (z angl. single cell gel electrophoresis)
- SEM - skenovací elektronová mikroskopie (z angl. scanning electron microscopy)
- SERS - povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (z angl. surface enhanced Raman spectroscopy)
- TEM - transmisní elektronová mikroskopie (z angl. transmission electron microscopy)
- VCA - analýza vrcholových komponent (z angl. principal component analysis)
- WD - pracovní vzdálenost objektivu (z angl. working distance)
- XRD - rentgenová difrakční analýza (z angl. X-ray diffraction)

Úvod

Současná situace na poli nanotechnologií zaznamenává velký nárůst využití nanočástic v kosmetických i jiných přípravcích. Benefity vyplývající z fyzikálně-chemických vlastností nanočástic jsou často využívány v kosmetických přípravcích určených k přímé aplikaci na kůži nebo na jiné upotřebení, při kterém kontakt s pokožkou není vyloučen. I navzdory tomu, že pokožka tvoří účinnou bariéru pro vstup nanočástic do hlubších vrstev kůže, riziko buněčného příjmu a metabolického ovlivnění buněk stoupá s poraněním nebo poškozením pokožky. Tato skutečnost je příčinou posuzování možností zdravotního rizika souvisejícího s pronikáním nanočástic do buněk a metabolických změn, které s sebou působení nanočástic přináší. Předpokládá se, že specifické fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic odlišné od konvenčních chemických látek jsou příčinou specifického toxického účinku, nicméně, jeho mechanismus u jednotlivých nanomateriálů není dosud zcela pochopen. Bez ohledu na druh expozice, penetrace nanočástic do buněk je považována za klíčový krok toxického působení, jehož výsledkem je zejména produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a s ní související oxidativní stres, a také poškození DNA.

Tato disertační práce je hodnocením účinku studovaných vzorků nanočástic oxidu titaničitého (TiO_2) a nanočástic stříbra (AgNPs) na buněčných liniích lidských keratinocytů a lidských fibroblastů, které jsou buněčnými elementy vrstev kůže. Současně je hodnocením buněčného příjmu a intracelulárního chování studovaných nanočástic s využitím moderní mikroskopické techniky - konfokální Ramanovy mikroskopie. Metoda umožňuje vizualizaci buněčného příjmu a distribuce nanočástic bez využití externího značení. Zhodnocení průniku nanočástic do buněk a cytotoxického a genotoxického působení poskytuje soubor základních informací o toxicitě studovaných nanočástic.

1 Úvod do problematiky nanočástic

1.1 Úvod

Nanotechnologie jsou technickým oborem zabývajícím se studiem přípravy a vlastností struktur v řádech 10^{-9} (obvykle 1-100 nm). Richard P. Feynman, americký vědec a nositel Nobelovy ceny za fyziku svojí slavnou přednáškou „*There's plenty of room at the bottom*“ (volně přeloženo „*Tam dole je spousta místa*“) na schůzi Americké společnosti fyziků na Caltechu v roce 1959 otevřel diskuzi o možnostech manipulace s molekulami a atomy. Tím, byť nevyšlo slova nanotechnologie, položil základ pro rozvíjení tohoto oboru (Feynman, 1959). Na jeho počest je každoročně udělována Feynmanova cena za přínos v oboru nanotechnologie. Ustavičný rozvoj a výzkum v oblasti nanotechnologií je příčinou vzrůstu využití nanočástic v různých odvětvích lidské činnosti. Nové metody přípravy, modifikace a výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic jsou důvodem jejich vzrůstajícího uplatnění - od odvětví průmyslu až po biomedicínu a farmakologii, kde otevírají nové možnosti.

1.2 Definice nanočástic

Nanočástice patří do skupiny struktur, souhrnně označovaných jako nanomateriály. V současné době neexistuje jednotná uznávaná definice nanomateriálu či nanočástic. Všeobecně je přijímána definice dle normy ISO/TS 27687:2010, podle které je nanomateriálem materiál, který má nejméně jeden rozměr mezi 1 a 100 nm. V rámci EU byla navržena širší definice pro nanomateriály (2011/696/EU), která bere do úvahy i potenciální rizika spojená s jejich užíváním (Filipová et al., 2012). Dle doporučení Evropské komise se nanomateriálem rozumí přírodní materiál, materiál vzniklý jako vedlejší produkt nebo materiál vyrobený, obsahující částice v nesloučeném stavu nebo agregát či aglomerát, ve kterém je u 50 % nebo více částic ve velikostním rozdělení jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí velikosti 1-100 nm (Doporučení Komise 2011/696/EU). Nanočástice jsou částicemi splňujícími podmínku rozměru 1-100 nm ve všech 3 dimenzích.

1.3 Původ a příprava nanočástic

Nanočástice vznikají cílenou syntézou anebo jako vedlejší produkt při různých fyzikálních nebo chemických procesech souvisejících s lidskou činností (např. spalování, důlní činnost) nebo přírodními jevy (např. sopečná činnost, písečné bouře) (Goel et al., 2014). V prvním případě se jedná o tzv. *primární nanočástice*, které se od ve druhé řadě zmíněných *sekundárních nanočástic* liší především větší uniformitou a homogenitou (Abbot & Maynard, 2010). Jsou připravovány zejména pro komerční použití. Tuto skupinu nanočástic kromě uhlíkových nanotrubic, kvantových teček, dendrimerů a fullerenu zastupuje široká skupina nanočástic kovů a jejich oxidů (Vogel et al., 2014).

Nanočástice kovů a jejich oxidů, které reprezentují nanočástice Au, Ag, Fe₂O₃, CuO, TiO, ZnO nebo CeO₂, a také SiO₂ lze připravit dělením výchozích agregátů fyzikálními metodami, častěji jsou však využívány metody chemické. Tradičními jsou *redukce solí přechodných kovů, odstranění ligandů z organokovových sloučenin, metody elektrochemie* a tzv. *sol-gel metoda*, při které je koloidní disperze neboli sol převeden na gel a následně na pevnou látku (Lugue & Varma, 2012; Singh et al., 2011). V posledních letech si získává pozornosti alternativní způsob přípravy kovových nanočástic označovaný jako tzv. *green syntéza*. Tradiční způsoby přípravy nanočástic jsou často spojeny s využitím vysoce toxických látek a se vznikem toxických meziproduktů. Green syntézy nanočástic jsou v podstatě biosyntézami a patří do oboru bionanotechnologií. Jejich principem je substituce toxických činidel využívaných v tradičních chemických metodách přípravy nanočástic biokatalyzátory. Přitom biokatalyzátorem jsou molekuly syntetizované živým organismem (bakterie, kvasinky, vyšší rostliny), které se účastní na redukci kovů. Takto připravené nanočástice mohou mít, ve srovnání s nanočásticemi připravenými tradičními metodami, výhodnější vlastnosti, např. vyšší čistotu a biokompatibilitu (Hussain et al., 2016). Green syntéza otevírá velkou kapitolu možností přípravy nanočástic s ohledem na alternativní metody šetrnější nejen ve vztahu k prostředí, ale i k lidskému zdraví.

Zvláštní postavení mají nanočástice určené pro klinické účely, které jsou často využívány v diagnostice nebo jako nosiče léčiv či genů. Tato skupina nanočástic zahrnuje především pevné lipidové nanočástice, liposomy, dendrimery, polymerní micely, polymerní nanočástice a uhlíkové nanotrubičky. Tyto jsou připravovány z biodegradabilních prekurzorů (polysacharidy, lipidy, proteiny, syntetické polymery), a jejich příprava vychází ze specifických postupů umožňujících regulaci rozpustnosti, stability, biokompatibility a biodegradability, povrchových vlastností a antigenicity, či postupné uvolňování v nanočásticích uzavřeného léčiva. Principem metod přípravy zmíněných nanočástic je polymerizace, disperze polymerů, odpařování, fázová separace koloidů v gelech a další, využívající specifických polymerů, médií a pomocných látek (Richhariya et al, 2015).

1.4 Některé významné vlastnosti nanočástic

Vlastnosti nanočástic vzbuzují vědecký zájem zejména proto, že tvoří mezistupeň atomární či molekulární struktury chemické látky a její konvenční formy, která má konstantní fyzikální a chemické vlastnosti nezávislé na její velikosti. V řádech nanometrů jsou tyto vlastnosti na velikosti částic závislé. Velmi malá velikost nanočástic s sebou přináší řadu unikátních projevů chování (reaktivita, optické, elektrické, magnetické vlastnosti), a to jak ve vztahu k prostředí, tak ve vztahu vzájemného ovlivňování částic, kterými se zabývá kvantová fyzika.

Z pohledu nanotoxikologie je důležité, jak fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic ovlivňují jejich chování ve vztahu k organismu. Z tohoto hlediska byly s využitím zlatých nanočástic jako modelového systému zejména prozkoumány vlivy velikosti, tvaru a povrchových vlastností na chování nanočástic na buněčné úrovni. Studie prokazují, že nanočástice s průměry blízkými 50 nm vykazují významně vyšší buněčný příjem než nanočástice větších či menších velikostí, jejichž internalizace do buněk je mnohonásobně pomalejší (Arnida & Ghandehari, 2009; Gao et al., 2005; Chithrani et al., 2006). Cytoplasmatickou membránou buněk ochotněji pronikají kulovité než tyčinkovité nanočástice. Tento fakt je připisován existenci podélné osy u tyčinkovitých nanočástic, která je příčinou obsazení většího počtu membránových receptorů podílejících se na transportu nanočástice do buňky (Chithrani et al., 2006; Jin et al., 2009). Interakce nanočástic s cytoplasmatickou membránou buňky je ovlivněna i povrchovým nábojem. Pozitivně nabitý povrch nanočástic ochotněji interaguje s povrchem cytoplasmatické membrány buňky, u níž převažuje negativní náboj (Liang et al., 2010).

Důležité odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic zahrnují i jejich vysokou reaktivitu. U nanočástic dochází k obrovskému nárůstu poměru plochy povrchu k objemu částic. Počet atomů na povrchu je mnohonásobně vyšší než počet atomů uvnitř částice. Tím je významně ovlivněna reaktivita na povrchu nanočástic, které ovlivňují i jejich cytotoxické působení související s produkcí ROS (Strambeanu et al., 2014). Více o intracelulárním chování nanočástic a mechanismech toxického účinku pojednává kapitola 2.

Příprava a využití nanočástic se často potýká s komplikací, kterou je, v závislosti na povaze vazeb mezi částicemi, agregace nebo aglomerace. V případě agregátů jsou nanočástice ve shluku vázány kovalentní vazbou, v případě aglomerátů je vazba nanočástic způsobena slabými ne vazebnými interakcemi. Agregace nanočástic je jednou z významných odlišností od konvenčních chemických látek a přináší i zcela odlišné chování materiálu v životním prostředí i v lidském organismu. Jako příčina tvorby agregátů či aglomerátů je uvažována převaha přitažlivé van der Waalovy síly mezi nanočásticemi nad elektrostatickou odpudivou silou. Stabilizující elektrostatické síly na povrchu nanočástice jsou v prostředí obsahujícím ionty

(pufr, buněčné médium, fyziologické prostředí) neutralizovány, což má pozitivní vliv na agregaci nebo aglomeraci nanočástic (Albenese et al., 2011). Možností prevence agregace či aglomerace nanočástic je adsorpce velkých molekul na jejich povrch (např. polymerů, surfaktantů nebo proteinů). V komplexu s velkými molekulami dochází mechanismem sterické stabilizace ke zvýšení odlonosti vůči shlukování (Oh & Park, 2013).

1.5 Využití nanočástic TiO₂ a AgNPs v produktech denního používání

Jak již bylo zmíněno, nanotechnologie jsou rychle se rozvíjejícím oborem, který neustále představuje další poznatky z oblasti výzkumu vlastností a technik přípravy nanočástic a rozšiřuje možnosti jejich využití. Lze se okrajově zmínit o různorodých aplikacích nanočástic v technice či potravinářském průmyslu, biomedicíně, diagnostice, či cíleném doručování léčiv a genů, no tak specifické oblasti využití si zasluhují větší prostor k diskuzi.

Z hlediska produktů denního používání je často zmiňována skupina nekovových organických nanočástic (liposomy, micely), jež jsou součástí různých přípravků, v nichž plní především funkci nosičů aktivních látek (Mihriyan et al., 2012). Nicméně, tato práce se zabývá studiem cytotoxicity vybraných nanočástic kovů - nanočástic stříbra (AgNP) a jejich oxidů - nanočástic oxidu titaničitého (TiO₂), určených pro komerční účely, mj. spotřebu při výrobě kosmetických a jiných produktů denního používání. O dostupných poznatcích z této oblasti je pojednáváno níže.

AgNPs a nanočástice TiO₂ patří na seznam nanomateriálů posuzovaných Pracovní skupinou pro vyráběné nanomateriály (WPMN, z angl. Working Party on Manufactured Nanomaterials) Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD, z angl. Organisation for Economic Cooperation and Development). Patří k častým ingrediencím kosmetických přípravků, ale i jiných výrobků, se kterými je spotřebitel v každodenním kontaktu.

AgNP vykazují významný antibakteriální účinek (Le Ouay & Stellacci, 2015; Prabhu & Poulouse, 2012). Pro tuto vlastnost jsou častou přísadou mýdel, deodorantů, desinfekčních roztoků pro lékařské nástroje, textilií pro výrobu obvazových materiálů, a dokonce oblečení (Faunce & Watal, 2010; Gao et al., 2015; Selternich, 2013; Wijnhoven et al., 2009). Jako antimikrobiální látky jsou také součástí ošetřujících přípravků určených na ochranu popálené, poraněné nebo akné postižené kůže (Lohani et al., 2014). Antimikrobiální účinky AgNP byly testovány i na mikroorganismech, jejichž ničení je cílem přípravků ústní hygieny. Ukázalo se, že AgNP mají účinný antimikrobiální účinek na některé druhy kvasinek rodu *Candida*, což podnítilo jejich aplikaci do přípravků proti infekcím ústní dutiny, ale i do zubních past. V současnosti je ve světě na trhu více než 400 komerčně dostupných přípravků obsahujících

AgNP (Wang et al., 2015). Ty tvoří asi 12 % všech nanočástic využívaných v kosmetických přípravcích (Gajbhiye & Sakhawarde, 2016).

Nanočástice TiO_2 jsou ve vodě velmi málo rozpustným nanomateriálem, jenž je vedle ZnO častou ingrediencí pigmentů v různých produktech zahrnujících potravinářské a farmaceutické přípravky. V nich nanočástice TiO_2 zajišťují bělost a neprůhlednost přípravku, a také plní funkci zahušřovadla (Weir et al., 2012). Z kosmetických produktů jsou kromě zubních past zejména přísadou opalovacích krémů (Hamzeh & Sunahara, 2013). Zde nanočástice TiO_2 působí jako účinný anorganický UVB/UVA filtr, který poskytuje lepší ochranu proti UV záření ve srovnání s jejich konvenčními protějšky s rozměry v řádech mikrometrů. Částice TiO_2 o velikosti 150–300 nm světlo odrážejí a rozptylují a přípravky se jeví jako bílé. Když však mají nanočástice v přípravku velikost 20-150 nm, UV záření je absorbováno a rozptýleno, což je příčinou toho, že se přípravek na kůži jeví jako transparentní (Osmond et al., 2010). Nízká rozpustnost ve vodě a vysoká afinita nanočástic TiO_2 k povrchům přispívá ke zvýšené voděodolnosti opalovacích přípravků.

Využití anorganických nanočástic v kosmetických produktech přináší své výhody i nevýhody. Za výhodné jsou považovány především vlastnosti nanočástic, které v přípravku zvyšují jeho účinnost a stabilitu. Na nevýhody lze pohlédnout z environmentálního pohledu, který diskutuje možnosti úniku nanočástic do prostředí. Z hlediska zdravotního rizika souvisejí nevýhody využití nanočástic s jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které ovlivňují průnik biologickými membránami a vysokou reaktivitu v intracelulárním prostředí. Tyto aspekty otevírají diskuzi o toxicitě nanočástic, o které pojednává následující kapitola.

2 Toxicita nanočástic

2.1 Úvod

S neustále se rozšiřujícím dosahem využití nanočástic se také klade důraz na nutnost posouzení a hodnocení rizik spojených s jejich užíváním. V důsledku toho byl navržen samostatný podbor toxikologie, který se zabývá studiem toxických účinků nanočástic, *nanotoxikologie* (Donaldson et al., 2004). Mechanismus toxického působení nanočástic dosud není zcela pochopen. Nicméně, jelikož malé částice penetrují do buněk, nanočástice mohou být přijímány buňkou molekulárními mechanismy a v intracelulárním prostředí být příčinou biochemických změn vedoucích k poškození až smrti buněk. Proto jsou interakce s buňkou a hodnocení následných metabolických změn souvisejících s cytotoxicitou a genotoxicitou nanočástic relevantní při posuzování rizika jejich využití.

Nanočástice mohou pronikat do organismu různou cestou, v závislosti na způsobu expozice. Cestou vstupu do organismu může být vdechnutí, požití anebo příjem nanočástic kožní cestou. V souvislosti s využitím TiO₂ a AgNPs nebo jiných anorganických nanočástic v produktech denního používání se ve spojitosti s těmito nanomateriály nabízí k diskusi pronikání kožní bariérou. Bez ohledu na to, jak nanočástice vstoupí do organismu, za místo jejich toxikologického působení je považována buňka. Proto hodnocení cytotoxicity zajímá v toxikologické studii nanomateriálu významné místo.

2.2 Penetrace nanočástic do kůže

Možná penetrace nanomateriálů kůži po přímé aplikaci kosmetického přípravku je dle většiny dostupných zdrojů málo pravděpodobná, no pořád vzbuzuje obavy. Chování nanočástic ve vztahu ke kůži jako biologické bariéry je námětem řady studií, jejichž výsledky nejsou zcela jednotné, a současně dávají prostor k úvahám o možnostech penetrace nanočástic do hlubších vrstev kůže i dalších tkání.

2.2.1 Potenciální mechanismy penetrace nanočástic do kůže

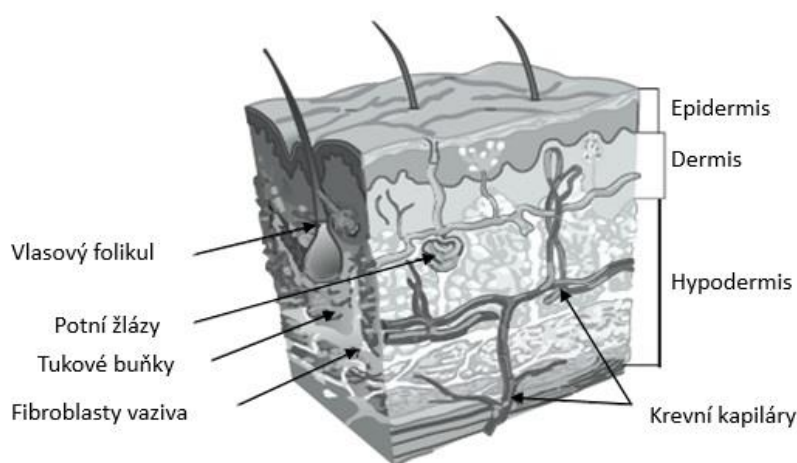
Kůže je největším orgánem těla, který je tvořen třemi vrstvami (obr. 1):

- *pokožka* (lat. epidermis) - nejvrchnější vrstva kůže, je tvořena mnoha vrstvami buněk. Nejvrchnější vrstva buněk (lat. stratum corneum) je pro svojí vysokou hydrofobicitu a

soudržnost mezi buňkami (corneocyty) odpovědná za hlavní bariérovou funkci kůže pro vstup nanočástic (Benson, 2005; Labouta et al., 2011). Prostřední vrstvy pokožky tvoří ploché buňky v cytoplasmě obsahující meziproducty rohovění a cytokeratinová filamenta. Nejspodnější vrstva pokožky (*lat. stratum basale*) je ze 95 % tvořena kubicko-cylindrickými buňkami (keratinocyty), z 5 % melanocyty.

- *škára* (*lat. dermis*) – prostřední vrstva kůže, je pevnou, vazivovou vrstvou kůže obsahující síť kolagenových a elastických vláken, potní a mazové žlázy, vlasové folikuly, tukové buňky a nervová tělíska.

- *podkožní vazivo* (*lat. hypodermis*) – nejspodnější vazivová vrstva kůže, obsahuje kolagenová a elastinová vlákna

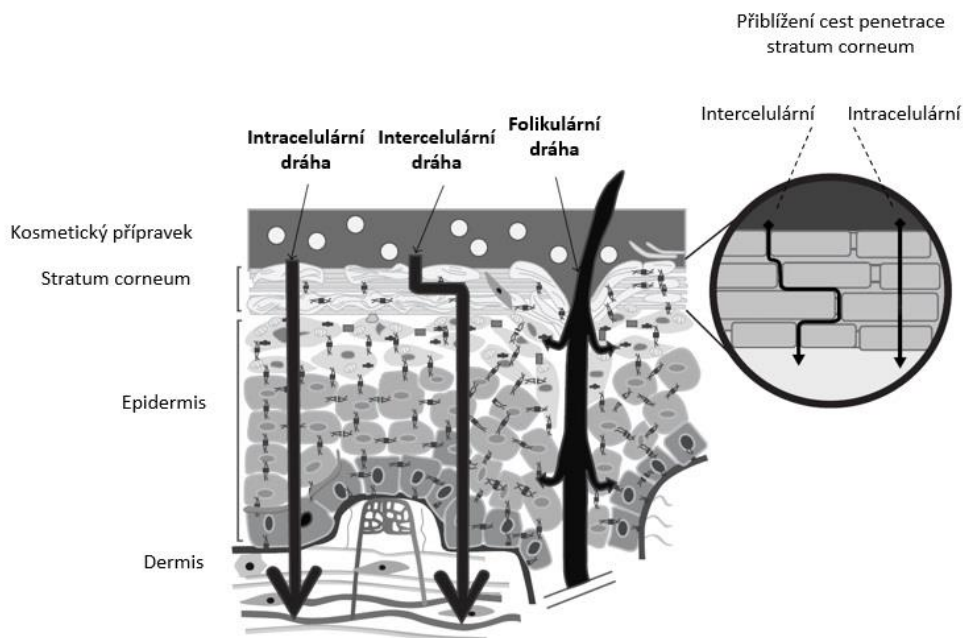


Obr. 1 Schematické znázornění vrstev lidské kůže.

Upraveno dle: Lohani et al., 2014

Faktorem, který ovlivňuje možnost pasivní penetrace nanočástic do kůže jsou zejména jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Ve stratum corneum pokožky představují cestu vstupu do kůže hydrofilní a lipofilní póry. Obecně, lipofilní látky vykazují větší penetraci do kůže než látky hydrofilní povahy. Polární látky i hydrofilními póry pronikají neochotně, z čeho lze vyvodit i malou pravděpodobnost penetrace anorganických nanočástic. Na druhou stranu, je-li velikost nanočástic menší, než je průměr mezibuněčných prostor ve stratum corneum, mohou i hydrofilní částice penetrovat do hlubších vrstev *intercelulární cestou* (Baroli, 2010). Bylo publikováno, že nanočástice o velikostech do 20 nm mohou kožní bariérou pronikat snadno (Campbell et al., 2012; Labouta & Schneider, 2013). Možnost penetrace anorganických nanočástic do hlubších vrstev kůže představuje i *folikulární cesta*, a to dokonce i pro větší nanočástice v řádech několika stovek nm (Patzelt et al., 2011). Možným mechanismem penetrace nanočástic do kůže je i *intracelulární cesta*, které bere v úvahu molekulární

mechanismy buněčného příjmu nanočástic endocytózou a jejich vyloučení v procesu exocytózy (Bolzinger et al., 2012). Zmíněné potenciální mechanismy penetrace nanočástic do kůže jsou schematicky znázorněny na obr. 2.



Obr. 2 Schematické znázornění potenciálních mechanismů penetrace nanočástic do kůže.

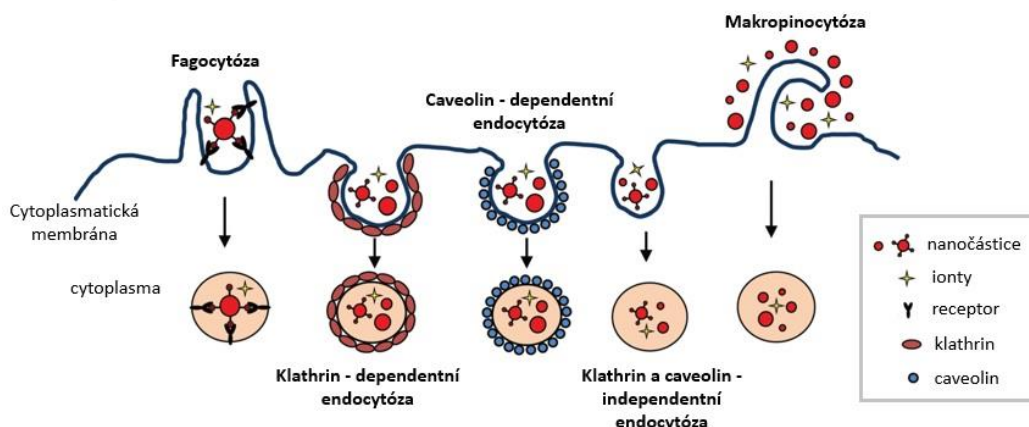
Upraveno dle Lohani et al., 2014

Navzdory výše zmíněnému, většina studií zabývajících se pronikáním anorganických nanočástic do hlubších vrstev kůže poukazuje na negativní výsledky, případně na schopnost nanočástic pronikat maximálně do vrstev stratum corneum (Campbell et al., 2012; Wiechers & Musee, 2010; Zhang, 2013). I přes předpoklady, že schopnost nanočástic pronikat kůží není ve srovnání s inhalací či perorálním požitím významná (Kokura et al., 2010; Monterio-Riviere & Riviere, 2009), nelze tuto možnost zanedbat. Pokožka sice představuje vůči nanomateriálům účinnou bariéru, nicméně za předpokladu, že není nijak porušena. Význam dermální absorpce totiž významně nárůstá za předpokladu, že je pokožka jakkoliv porušena, např. poraněním, popálením, spálením nebo patologickou změnou (Oberdöster et al., 2005).

2.3 Buněčný příjem nanočástic

Příjem nanočástic buňkou hraje významnou roli v jejich cytotoxickém působení, a také se, jak bylo zmíněno výše, může podílet na penetraci nanočástic do hlubších vrstev kůže.

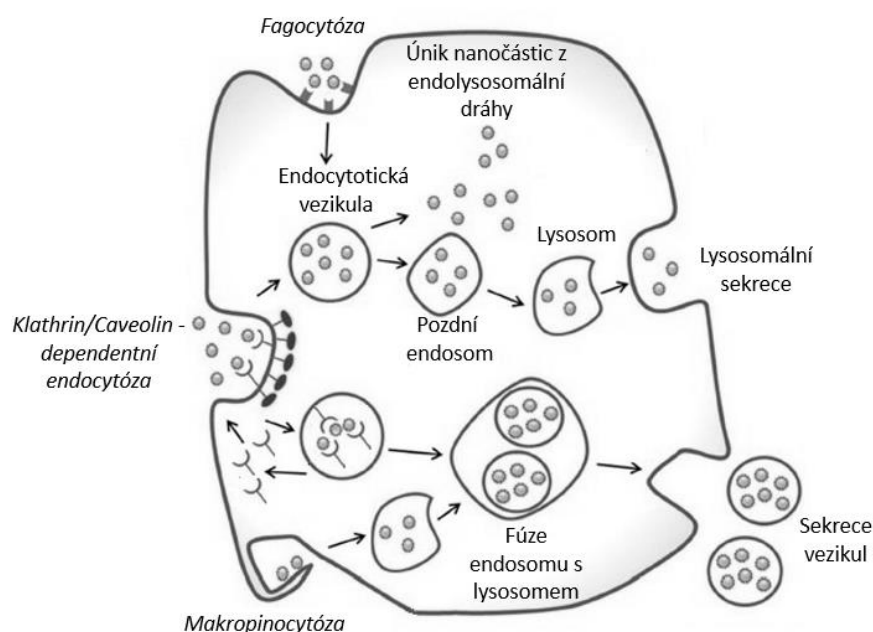
Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic, zahrnující velikost, tvar a povrchové vlastnosti značně a do různé míry ovlivňují jejich biologický účinek. Tyto vlastnosti jsou zásadním faktorem ovlivňujícím buněčný příjem nanočástic (Xia et al., 2008). Při pronikání nanočástic do buňky je klíčovou interakcí s cytoplasmatickou membránou buňky. Vzhledem k velké ploše povrchu nanočástic a jejich vysoké reaktivitě, mají nanočástice schopnost vázat se na receptory a proteiny na povrchu cytoplasmatické membrány (Nel et al., 2006). Za hlavní, nejpravděpodobnější mechanismus příjmu nanočástic do buňky je považována endocytóza zprostředkovaná receptorem (RME, z angl. receptor-mediated endocytosis) (Chithrani et al., 2006; Chithrani et al., 2007, Jin et al., 2009). Tento předpoklad potvrdily výsledky studií, kdy byl zaznamenán pokles příjmu nanočástic při nižší teplotě (4°C) a v ATP-deficientních médiích (Chithrani & Chan 2007, Kam et al., 2006). RME nanočástic se účastní proteiny nebo ligandy na povrchu nanočástice a povrchové receptory cytoplasmatické membrány buňky. Této interakce je využíváno při cílení nanočástic na specifické struktury, kdy úprava povrchu nanočástic a jeho vlastností zajišťuje vazbu na cílové místo, např. v jádře (Kang et al., 2010; Oyerle et al., 2007). U nepokryvaných nanočástic se interakce s cytoplasmatickou membránou účastní proteiny, kterýchž adhezi na povrch nanočástice došlo během fáze distribuce nanočástice *in vivo*, anebo při inkubaci nanočástic v buněčném médiu za experimentálních podmínek *in vitro* (Chithrani et al., 2006; Lynch, 2007). Velmi malé nanočástice s průměrem do 1 nm jsou schopny buněčnou membránou penetrovat s využitím jiných mechanismů, pravděpodobně transportu přes iontové kanály nebo póry v cytoplasmatické membráně (Porter et al., 2006).



Obr. 3 Schematické znázornění možností transportu nanočástic přes cytoplasmatickou membránu.

Upraveno dle: Wang et al., 2015

U nefagocytujících eukaryotických buněk mohou být nanočástice přijímány do intracelulárního prostředí v procesu klathrin-dependentní endocytózy a caveolin-dependentní endocytózy, nicméně literatura popisuje i mechanismy příjmu na základě clathrin a caveolin-independentní endocytózy a makropinocytózy. Klathriny a caveoliny jsou membránové proteiny, které po navázání nanočástic (či jiných endocytovaných částic) vytvářejí na intracelulární straně cytoplasmatické membrány proteinový plášť usnadňující tvorbu transportních vezikul při RME. Makropinocytóza je transportním membránovým mechanismem závislým na vytvoření váček zvaných makropinosomy. Ty transportují částice spolu s vnější kapalinou. U fagocytů, jako jsou makrofágy a monocyty, je hlavním mechanismem odpovědným za buněčný příjem nanočástic fagocytóza (Singh & Ramaro, 2012). Schematicky tyto mechanismy uzavírání nanočástic do transportních vezikul a jejich příjem do buňky znázorňuje obr. 3. Transportní vezikuly předávají transportované částice endosomům a dochází k recyklaci receptorů, které jsou transportovány zpátky na povrch cytoplasmatické membrány (Chithrani & Chan, 2007). Endosomy posléze fúzí s lysosomy, a po zpracování jsou transportovány na buněčnou periferii exocytózou. Část nepokrývaných nanočástic uniká endolysosomální dráze a kromě endosomů a lysosomů jsou nanočástice lokalizovány v cytosolu a v oblasti výskytu membránových struktur v perinukleární oblasti, mitochondriích, dokonce v jádře (Cartiera et al., 2009; Taylor et al., 2010). Tyto rozdílné fáze transportu nanočástic byly prozkoumány a zachyceny metodou transmisní elektronové mikroskopie s využitím nepokrývaných zlatých nanočástic jako modelového systému (Chithrani & Chan, 2007; Chithrani et al., 2006; Jin et al., 2006). Schematicky je popsán mechanismus vyobrazen na obr. 4.



Obr. 4 Schematické zobrazení intracelulárního transportu nanočástic v cytoplasmě buňky.

Upraveno dle: Oh & Park, 2013

2.4 Mechanismy toxického účinku nanočástic

V případě průniku nanočástic do organismu a jejich následné translokaci k cílovým tkáním, mohou nanočástice vyvolat řadu poškození biologických struktur. Na molekulární a buněčné úrovni jsou v souvislosti s toxickým působením skloňovány především dva mechanismy toxického účinku nanočástic, a to indukce oxidativního stresu a poškození DNA.

2.4.1 Oxidativní stres

Reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) jsou přirozenými participanty přenosu energie v mitochondriálním dýchacím řetězci. Vznikají funkcí leukocytů, při metabolismu xenobiotik nebo v signálních drahách. Za fyziologických podmínek v organismu existuje rovnováha mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a molekulami působícími jako jejich zhášecí, tj. antioxidanty. Příkladem endogenních antioxidantů jsou superoxidodismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza. Za těchto podmínek ROS sami přispívají k homeostáze buňky. Dojde-li z nějakého důvodu k porušení této rovnováhy, vzniká stav, který je označován jako tzv. oxidativní stres. Oxidativním stresem rozumíme nerovnováhu mezi tvorbou a odstraňováním ROS. Výsledkem oxidativního stresu v buňce je zvýšená tvorba ROS. Jedná se o kyslíkaté sloučeniny, které ve své valenční vrstvě nesou alespoň jeden nespárovaný elektron. ROS vznikající v buňkách zahrnují superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$, hydroxylový radikál HO^{\cdot} , alkyloxylový radikál RO^{\cdot} , peroxylový radikál ROO^{\cdot} , hyperoxylový radikál HO_2^{\cdot} i radikály oxidů dusnatého NO^{\cdot} a dusičitého NO_2^{\cdot} , dále peroxid vodíku H_2O_2 a kyselinu chlornou $HClO$. Tyto molekuly jsou vysoce reaktivní a za podmínek jejich zvýšeného výskytu mají schopnost reagovat s řadou makromolekul, jako jsou nenasycené mastné kyseliny v lipidech, proteiny a nukleové kyseliny, i nízkomolekulárními metabolity, koenzymy a jiné látky zahrnuté v buněčném metabolismu. Oxidativní stres může být příčinou ztráty membránového potenciálu na mitochondriální membráně (spotřeba ATP) (Singh et al., 2009).

Kromě působení UV nebo RTG záření, vznikají ROS také při reakcích kovů. Produkce ROS kovovými nanočásticemi může tak mít původ v samotné povaze nanomateriálu. V tomto případě může být vznik ROS na molekulární úrovni výsledkem Fentonovy reakce v kyselém prostředí lysosomů, která je reakcí peroxidu vodíku s dvojmocnými ionty kovů za vzniku vysoce reaktivních hydroxylových radikálů HO^{\cdot} (Blazi et al., 2011; He et al., 2014):



Druhou možností uvolňování hydroxylových radikálů vlivem nanočástic v buněčném prostředí představuje Haber-Weissova reakce, při níž superoxid nejprve redukuje ion přechodného kovu a

ten pak reaguje s peroxidem vodíku. Vzniká hydroxidový anion, hydroxylový radikál a přechodný kov se opět oxiduje:



Kovové nanočástice jsou pro své katalytické schopnosti intenzivně studovány v technologických disciplínách (Dhaksinamoorthy et al., 2012; Wang et al., 2013).

Na buněčné úrovni může být produkce ROS výsledkem interakce s buněčnými cíli. Tento mechanismus reprezentuje především interakce s respiračním řetězcem buňky a mitochondriální změny po distribuci a akumulaci nanočástic v mitochondriích buňky (Li et al. 2003; Xia et al., 2006). Na tkáňové úrovni je možné také uvažovat třetí mechanismus produkce ROS, která je vyvolána zánětlivou reakcí v organismu po průniku nanočástic. Obranná reakce organismu a rozpoznávání cizích částic buňkami imunitního systému vede k uvolňování ROS. Generace ROS působením nanočástic byla prokázána v *in vivo*, a také v *in vitro* podmínkách (Brown et al., 2004; Oberdöster et al., 2005). Výsledky studií poukazují na vztah mezi produkcí ROS a projevy oxidativního stresu u buněk exponovaných nanočásticím.

2.4.2 Poškození DNA

Jak již bylo zmíněno, nadprodukce ROS vede k poškození makromolekul buňky, především nenasycených mastných kyselin lipidů, které jsou integrální součástí membrán, nevratné oxidaci proteinů, a v neposlední řadě ke změnám ve struktuře DNA. Zejména působením hydroxylového radikálu HO[·] dochází k uvolňování purinových a pyrimidinových bazí, jejich oxidaci, vlivem čeho může docházet k chybnému párování, přerušování či zlomu jednoho nebo obou řetězců DNA. Tyto projevy mohou vést k apoptóze anebo souvisejí s následnou mutagenezí a karcinogenezí (Peters et al. 2006; Risom et al., 2005).

2.5 Genotoxicita nanočástic

Genotoxicita nanočástic úzce souvisí s produkcí ROS a poškozením DNA. Genotoxicita je schopnost látky pozměnit genetický materiál buňky, co může vést až ke karcinogenezi (Xie et al., 2011). Mechanismy genotoxicity lze rozdělit na:

a) přímé klastogenní mechanismy – zahrnují modifikaci bazí a vznik abazických míst v řetězci (místa s chybějící bazí) a zlomy jednoho nebo obou řetězců DNA.

b) nepřímé klastogenní mechanismy – souvisejí s peroxidací lipidů a vznikem elektrofilních produktů (aldehydů), které se vážou na povrch dvoušroubovice DNA a tvoří exocyklické adukty

c) aneugenické mechanismy - souvisejí se vznikem oxidativních lézí (např. oxidace cysteinu), které mohou ovlivnit komponenty mitotického aparátu (vřeténko, kinetochor, mikrotubuly) a negativně ovlivnit segregaci chromozómů během mitózy (Bota & Benaumer, 2011).

2.6 Toxicita nanočástic TiO₂ a AgNPs

Se vzrůstajícím zájmem o využití nanočástic v produktech denního používání je nezbytné porozumět také jejich toxickým účinkům, které představují potenciální zdravotní riziko. Potenciál cytotoxického a genotoxického působení nanočástic kovů a jejich oxidů byl prokázán v různých testech toxicity (Singh et al., 2009, Fubini et al., 2012; Volker et al., 2013). Velký povrch nanočástic zvyšuje jejich toxikologický potenciál, a to pro zvýšenou možnost adsorpce biomolekul a značně zvýšenou reaktivitu (Li et al., 2011). Tato práce se zabývá studiem cytotoxicity a intracelulárního chování vybraných vzorků AgNP a nanočástic TiO₂, proto je následující text věnován souhrnu dostupných informací o cytotoxicitě a genotoxicitě zmíněných nanočástic.

Jednou z charakteristických vlastností kovových nanočástic je, že snadno pronikají biologickými bariérami a cytoplasmatickou membránou buněk, a jsou distribuovány v intracelulárním prostředí (Limbach et al., 2007). Stejně jako jiné nanočástice na bázi kovů, mohou AgNP po vstupu do buňky přímo interagovat s makromolekulami buňky anebo uvolňovat své ionty (Johnston et al., 2010; Xie et al., 2011). V buňce jsou AgNP distribuovány do endosomů a lysosomů nebo unikají z endolysosomální dráhy do cytosolu, u AgNPs s menším průměrem (6-20 nm) byla také prokázána jejich přítomnost v jádře (AshaRani et al., 2009). Studie poukazují na to, že působením AgNP dochází ke změnám buněčné morfologie a zvýšení permeability membrány (Carlson et al., 2008; Hussain et al., 2005). K poškození integrity cytoplasmatické membrány pravděpodobně významnou měrou přispívají i AgNPs koncentrované na buněčném povrchu (George et al., 2012). V souvislosti s cytotoxicitou AgNPs je neustále zmiňována produkce ROS. Produkce ROS indukovaná působením AgNPs přispívá k narušení energetického metabolismu buňky (Ahmed et al., 2010; Kim & Ryu, 2013; Volker et al., 2013). AgNPs mohou nahrazovat železnaté ionty v proteinech a následně se účastnit Fentonovy reakce za tvorby hydroxylových radikálů HO[•] (Gordon et al., 2010). Poukázáno bylo také na potenciál přímé interakce AgNPs s glutathionem, který se významnou měrou podílí na odstraňování ROS v buňkách (Carlson et al., 2009). Překročení únosné hladiny ROS, kterou je

buňka schopna za účasti antioxidantů překonat, vede k oxidativnímu stresu s následným poškozením membránových biomolekul s následkem buněčné smrti (AshaRani et al., 2009; Yang et al., 2012; Shi et al., 2014). AgNPs jsou také charakterizovány z pohledu genotoxického potenciálu. Poškození DNA je jedním z posuzovaných mechanismů toxického působení AgNPs. Může být způsobeno translokací menších AgNPs do jádra, nicméně mechanismus poškození DNA působením AgNPs dosud nebyl objasněn. Předpokládá se, že příčinou genotoxického účinku AgNPs je produkce ROS po průniku jadernou membránou anebo přímá interakce nanočástic s molekulou DNA (Asare et al., 2012). Studie poukazují na to, že u buněk exponovaných působení AgNPs dochází vlivem poškození DNA k zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi a je inhibována proliferace buněk s následnou buněčnou smrtí (AshaRani et al., 2009).

Míra využití nanočástic TiO₂ je, podobně jako u AgNP, poměrně vysoká. Velké procento produkce nanočástic TiO₂ souvisí s jejich aplikací do opalovacích přípravků jako účinný fyzikální ochranný prostředek, který rozptyluje a odráží UVB i UVA záření. Toto využití je, zejména pro minimální schopnost nanočástic TiO₂ pronikat epidermis, považováno za bezpečné (Furukawa et al., 2011). Nicméně, studie poukázaly na fotokatalytickou aktivitu nanočástic TiO₂ (Jugan et al., 2012). Podstatná část UV záření je nanočásticemi TiO₂ absorbována, což, zejména ve vodném prostředí, může zapříčinit tvorbu hydroxylových radikálů (Guix et al., 2008). Bylo prokázáno, že nanočástice TiO₂ indukují tvorbu ROS (Xie et al., 2011; Simon et al., 2011) a jsou příčinou poškození DNA a membrán *in vivo* (Singh et al., 2009) i *in vitro* (Hamzeh & Sunahara, 2013; Pan et al., 2009).

Důležitým poznatkem problematiky nanočástic TiO₂ je skutečnost, že jejich cytotoxicita je ovlivněna krystalickou formou. U dvou forem TiO₂, rutilu a anatasu, byly při testech toxicity prokázány rozdíly poukazující na vyšší genotoxicitu anatasu, avšak tento poznatek dosud nebyl vysvětlen (El-Said et al., 2015; Numano et al., 2014; Uboldi et al., 2016). Nicméně, anatas spolu s brookitem patří k méně často se vyskytujícím krystalickým formám TiO₂.

3 Vybrané metody charakterizace nanočástic

3.1 Úvod

Nanočástice jsou nositeli zcela jedinečných vlastností, které zajišťují jejich odlišnost od konvenčních materiálů. Z obecného hlediska jsou nanočástice charakterizovány zejména velikostí, tvarem a povrchovými vlastnostmi. Studium velikosti a morfologie nanočástic má při jejich charakterizaci významné postavení. Základní metodu pro studium velikosti nanočástic v suspenzi reprezentuje metoda dynamického rozptylu světla (DLS, angl. dynamic light scattering). Ke studiu morfologie a velikosti nanočástic jsou využívány i metody elektronové mikroskopie – transmisní (TEM, z angl. transmission electron microscopy) a skenovací (SEM, angl. scanning electron microscopy) a mikroskopie atomárních sil (AFM, angl. atomic force microscopy).

3.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Metoda DLS je metodou stanovení velikosti částic nano- a submikronových kapalných disperzních soustav. Je rovněž označována jako kvazielastický rozptyl světla (QELS, angl. quasi elastic light scattering) nebo fotonová korelační spektroskopie (PCS, angl. photon correlation spectroscopy). Tradičně je využívána při charakterizaci proteinů, polymerů, micel, emulzí, koloidních disperzí i nanočástic.

Metoda je založená na interakci světla s částicemi v kapalně disperzi a následném měření fluktuací intenzity světla rozptýleného z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty. Tyto fluktuace souvisejí se zesilováním a zeslabováním světla rozptýleného na částicích v disperzi, které podléhají Brownovu pohybu. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Míru Brownova pohybu částic v disperzi kromě viskozity rozpouštědla a teploty ovlivňuje také velikost částic. S rostoucí velikostí částic rychlost jejich pohybu klesá, z toho vyplývá, že malé částice se pohybují rychleji a fluktuace způsobené jejich pohybem zanikají rychleji než u větších částic (Jackson & Johann, 2007).

Výpočet velikosti částic vychází z hodnoty translačního difuzního koeficientu D prostřednictvím Stokesovy - Einsteinovy rovnice:

$$d(H) = kT/3\pi\eta D$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částice, D je translační difuzní koeficient, k je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita disperzního prostředí (Kaszuba et al., 2008). Průměr částice získaný z měření metodou DLS se vztahuje k difuznímu pohybu částic v kapalině, proto je označován jako hydrodynamický průměr.

Výhodou využití metody DLS při stanovení velikosti nanočástic je rychlé a neinvazivní provedení, které k analýze vyžaduje malý objem vzorku (Brar et al., 2011).

3.3 Mikroskopické metody

3.3.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

TEM poskytuje zejména informaci o morfologii nanočástic, umožňuje ale hodnotit i jejich velikost. Metoda využívá elektromagnetickým polem urychlovaných elektronů, jejichž zdrojem je kovová katoda. Po průchodu dostatečně tenkým vzorkem vytvářejí elektrony na luminiscenčním stínítku viditelný obraz.

Transmisní elektronový mikroskop má mnoho částí, které vytvářejí jeho ozařovací a zobrazovací část. Kondenzor fokusuje elektronové paprsky na preparát a zajišťuje jeho homogenní a intenzivní ozáření. Společně s elektronovou tryskou tvoří ozařovací část mikroskopu. Elektronová tryska je katodou emitující elektrony, s inkorporovanou anodou s kruhovým otvorem, která elektrony přitahuje a dává jim dostatečné zrychlení na průlet tubusem mikroskopu. Zobrazovací část mikroskopu tvoří prostor preparátu s držákem vzorku, objektiv, projektiv a luminiscenční stínítko, případně CCD kamera pro záznam obrazu. Objektiv je určen k tvorbě obrazu a jeho faktor zvětšení je přibližně 100. Bývá tvořen jednou elektromagnetickou čočkou. Úkolem projektivu tvořeného čtyřmi elektromagnetickými čočkami je zobrazení vzorku na stínítku pokrytém luminoforem. Luminofor je látka, která je schopna, v závislosti na energii a množství dopadajících elektronů, emitovat světlo různé intenzity o přibližně stejné vlnové délce. Rozlišení stínítka je omezeno velikostí zrn luminoforu, která se pohybuje okolo 10-50 nm. Často používaným luminoforem pro tyto účely je sulfid zinečnatý ZnS. Proud procházející čočkami je možné regulovat, a tím měnit i výsledné rozlišení elektronového mikroskopu. K omezení možnosti zeslabování proudu elektronů, jsou všechny části mikroskopu umístěny ve vakuu (Carter & Williams, 2016).

3.3.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

SEM je další elektronovou mikroskopickou technikou umožňující studium morfologie vzorku s jeho současnou vizualizací. Stejně jako TEM, poskytuje možnost hodnocení střední velikosti studovaných částic vzorku. Pro charakterizaci částic v suspenzi musí být tato při přípravě preparátu nejdříve převedena na suchý prášek, který je následně potažen vodivou vrstvou kovu (Au, Pt, Pt + Pd) pomocí katodového naprašování nebo impregnace. Poté je povrch preparátu po řádcích, v jakémsi neviditelném rastru skenován zaostřeným paprskem elektronů. Informace o povrchu vzorku jsou obvykle získávány ze sekundárních elektronů emitovaných z povrchu vzorku. Na rozdíl od TEM, kdy je zobrazení závislé na elektronech prošlých vzorkem, v případě SEM jsou to právě odražené elektrony, na kterých je zobrazení závislé.

Metody elektronové mikroskopie poskytují výsledky měření střední velikosti částic srovnatelné s metodou DLS (Fissan et al., 2014; Pal et al., 2011). Přinášejí s sebou ale nevýhody v podobě náročné a nákladné přípravy vzorku a potřeby doplňujících informací k hodnocení velikosti částic.

3.3.3 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Mikroskopie atomárních sil (AFM, atomic force microscopy) je zástupcem skupiny mikroskopických technik známých jako mikroskopie skenující sondou (SPM, scanning probe microscopy). Metoda nabízí vysoké rozlišení a umožňuje skenování vzorků na submikronové úrovni. Principem AFM je detekce pohybu ostrého hrotu upevněného na pohyblivém nosníku při rastrovém snímání povrchu vzorku. Zdrojem informací o topografii zkoumaného povrchu jsou silové interakce mezi atomy v povrchu vzorku a atomy kovového hrotu. Změna silového působení v závislosti na topografii povrchu vzorku vyvolá přiblížení či oddálení hrotu vůči snímanému povrchu, jež se projeví v ohnutí nosníku, na jehož volném konci se hrot nachází. Rekonstrukce snímaných dat, kterými jsou změny amplitudy oscilací při interakci hrot-povrch, umožňuje vyhodnotit topografii či jiné parametry zkoumaného povrchu. Detekce ohnutí nosníku je detekována citlivým optickým systémem, u většiny AFM systémů je nejčastěji realizována prostřednictvím laserového svazku. Laserový svazek je fokusován na volný konec nosníku, od kterého se odráží a dopadá na fotodetektor. Se změnou ohnutí nosníku nastává i změna úhlu dopadu laserového paprsku na nosník, a proto paprsek dopadne do jiného místa fotodetektoru (Eaton & West, 2010).

Při AFM měření jsou nejčastěji rozlišovány tři režimy zobrazování: nekontaktní, kontaktní a přerušovaný (tapping nebo semikontaktní režim). V kontaktním režimu je hrot

udržován ve fyzickém kontaktu s povrchem vzorku. Mezi hrotem a povrchem vzorku působí odpudivé síly. V nekontaktním režimu je hrot udržován ve vzdálenosti 1 – 10 nm nad zkoumaným povrchem a zde se uplatňují přitažlivé van der Waalsovy síly. Tento režim poskytuje zpravidla horší rozlišení než režim kontaktní. Při nekontaktním režimu se nosník nedotýká zkoumaného povrchu. Vzhledem k tomu, že silové působení mezi hrotem a povrchem je mnohem menší než v případě kontaktního módu, detekována je změna amplitud, a tak hrot musí oscilovat. Princip činnosti přerušovaného režimu je podobný nekontaktnímu režimu. Rozdíl je ve frekvenci rozkmitu nosníku, který je v případě přerušovaného módu větší. Tento režim umožňuje snímat plochu s větším rozpětím v ose z.

AFM poskytuje informace o velikosti nanočástic a jejich morfologii s vysokou přesností. AFM a techniky elektronové mikroskopie jsou častokrát porovnávány, přičemž je technika AFM upřednostňována zejména pro menší náročnost přípravy vzorku a méně náročnou proveditelnost měření (Lu et al., 2015).

3.4 Jiné metody charakterizace nanočástic

Povrchový náboj nanočástic určuje vzájemné interakce s prostředím. Jeho povaha a intenzita je tedy důležitým faktorem, který ovlivňuje chování nanočástic v biologických systémech. *Zeta potenciál* (elektrokinetický potenciál) hodnotí povrchový náboj nanočástic a odpovídá rozdílu potenciálů mezi objemem kapaliny a tenkou vrstvou protioiontů poutaných k povrchu nanočástice, tedy na rozhraní mezi kompaktní a difúzní částí elektrické dvojvrstvy. Měření zeta potenciálu je doplňkovou metodou charakterizace nanočástic, která informací o hodnotě povrchového náboje umožňuje předpovědět stabilitu koloidní disperze nanočástic během skladování. Dle literatury by se měly hodnoty zeta potenciálu pohybovat ve vysokých kladných nebo záporných hodnotách v řádech desítek mV (Pal et al., 2011).

Informace o vlastnostech povrchu a jeho modifikacích poskytují metody založené na *rentgenovém záření*, např. rentgenová difrakční analýza (XRD, X-ray diffraction). Rentgenová spektroskopie je často kombinována s technikou elektronové mikroskopie (López-Serrano et al., 2014).

Výše zmíněné metody umožňují studium fyzikálně-chemických vlastností nanočástic. V kapitole 2 zmíněná toxicita nanočástic však zejména diskutuje o potenciální penetraci nanočástic do intracelulárního prostředí, které je pokládáno za místo jejich toxikologického působení. Vizualizaci buněčného příjmu nanočástic umožnily metody TEM i fluorescenční mikroskopie, nicméně, tyto metody s sebou přinášejí řadu nevýhod. TEM umožňuje zobrazení nanočástic v cytoplasmě buněk s vysokým rozlišením, nicméně analýza vyžaduje náročnou přípravu vzorku i přístup k odlišení nanočástic od buněčného prostředí (Ahlinder et al., 2013).

Jiná metoda umožňující vizualizaci nanočástic v buňkách je fluorescenční mikroskopie. I tato technika je vhodným nástrojem hodnocení buněčného příjmu nanočástic, nicméně, vyžaduje jejich předchozí značení fluorescenční sondou, eventuálně jejich vnitřní fluorescenci (Marquis et al., 2009). Metodou, která obchází nevýhody výše zmíněných mikroskopických technik a umožňuje studium buněčného příjmu nanočástic je Ramanova mikroskopie. O této metodě zobrazení pojednává následující kapitola.

4 Úvod do Ramanovy spektroskopie

4.1 Úvod

Spektroskopické metody jsou založeny na studiu interakce elektromagnetického záření s hmotou. Důležitým hlediskem, které tuto interakci ovlivňuje, je vlnová délka použitého elektromagnetického záření, ze které vyplývá jeho energie. Pokud je energie záření rovna energetickému rozdílu mezi základním a excitovaným stavem molekuly, je foton elektromagnetického záření absorbován a molekula přechází do excitovaného stavu. Pokud ale energie excitačního záření není rovna rozdílu mezi základním a excitovaným stavem molekuly (např. pokud je vlnová délka záření ve viditelné oblasti ~400-800 nm), dochází více než k absorpci záření, k jeho rozptylu. Detekce tohoto jevu je principem Ramanovy spektroskopie (Smith & Dent, 2005).

Jev Ramanova rozptylu byl předpovězen v roce 1923 rakouským fyzikem *Adolfem Smekalem*. Mezi léty 1925 až 1927 byl předmětem zájmu několika významných vědců, mezi jinými i *Heisenberga* či *Schrödingera*. Teprve v roce 1928 byl jev Ramanova rozptylu experimentálně prokázán indickým vědcem, sirem *Chandrasekhara Venkata Ramanem*, který spolu s *K.S. Krishnanem* poprvé pozorovali změny ve vlnové délce světla rozptýleného kapalinou (Raman & Krishnan, 1928). V roce 1930 byl sir Raman za tento objev oceněn Nobelovou cenou za fyziku.

4.2 Ramanův jev

Fyzikální původ Ramanova jevu spočívá v neelastických srážkách excitačního monochromatického záření ve viditelné až blízké červené oblasti s molekulou. Literatura se na popis jevu Ramanova rozptylu elektromagnetického záření dívá dvěma pohledy. První je založen na indukci dipólového momentu v molekule působením oscilujícího elektrického pole excitačního záření. Indukovaný dipól je následně zdrojem rozptýleného záření. Indukovaný dipólový moment μ_i je přímo úměrný intenzitě elektromagnetického pole E , a to podle vztahu

$$\mu_i = \alpha \cdot E,$$

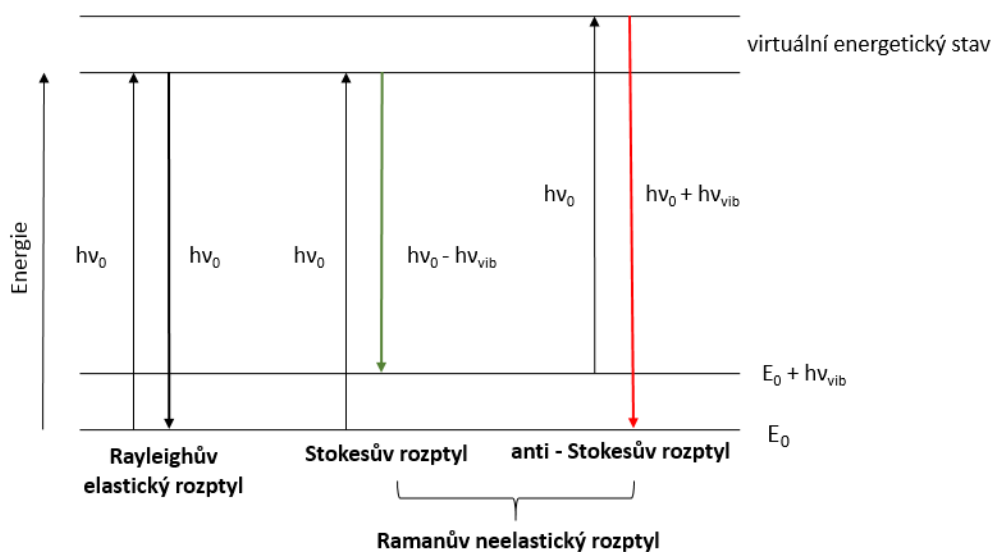
kde koeficient α je elektrická polarizovatelnost. Polarizovatelnost je fyzikálně spjata s mírou schopnosti elektrického pole změnit v molekule rozložení nábojů a vypovídá tedy o schopnosti elektrického pole indukovat v dané molekule dipólový moment (Dietzek et al., 2010).

Literatura ale uvádí i kvantově-mechanický popis Ramanova rozptylu, který zohledňuje vlnově-částicovou povahu fotonů elektromagnetického záření a kvantování energetických hladin molekuly. Podle této teorie dochází při interakci fotonu s molekulou na extrémně krátký čas k excitaci molekuly do virtuálního energetického stavu, který je energeticky nižší než plně excitovaný stav molekuly. Tento stav odpovídá jiné vibrační energetické hladině molekuly. Poté se molekula vrací do základního stavu odpovídajícího výchozí energetické hladině. Principem Ramanova rozptylu dle této teorie je tedy přechod molekuly mezi dvěma vibračními stavy s energií E_1 a E_2 . V první fázi interaguje foton elektromagnetického záření o frekvenci ν_0 s molekulou, která přechází do virtuálního energetického stavu. Následně dochází k přechodu molekuly na nižší energetickou hladinu za současného vyzáření rozptýleného fotonu o frekvenci ν_{vib} , za současného splnění podmínky zachování energie:

$$h \cdot \nu_{\text{vib}} = h \cdot \nu_0 \pm (E_2 - E_1),$$

kde h je Planckova konstanta ($h = 6,626\ 070\ 040 \cdot 10^{-34}$ J.s)

Tento proces má několik možností, které jsou schematicky znázorněny na obr. 5. Je-li výchozí a koncová energetická hladina molekuly stejná, hovoříme o *elastickém Rayleighově rozptylu*. Je-li koncová energetická vibrační hladina molekuly jiná než výchozí hladina, vyzářený foton má jinou vlnovou délku jako excitační záření, a v tomto případě se jedná o *neelastický Ramanův rozptyl*. Jestliže je frekvence rozptýleného záření nižší než frekvence excitačního záření, jsou v Ramanově spektru rozlišovány *Stokesovy linie* odpovídající fotonům s nižší energií (větší vlnovou délkou). V případě, že je frekvence rozptýleného záření vyšší než frekvence excitačního záření, jsou v Ramanově spektru *anti-Stokesovy linie*, odpovídající fotonům s vyšší energií (kratší vlnovou délkou). Intenzita anti-Stokesových linií ve srovnání se Stokesovými je mnohem nižší. Pro vznik těchto linií je nutné, aby se molekula již na začátku děje nacházela ve vyšším vibračním energetickém stavu. Protože procento molekul nacházejících se za normálních podmínek v takovém stavu je velmi malé, praxe se zabývá zejména studiem Stokesových linií (Smith & Dent, 2005).



Obr. 5 Schematické znázornění Rayleighova, Stokesova a anti-Stokesova Ramanova rozptylu.

4.3 Ramanovo spektrum

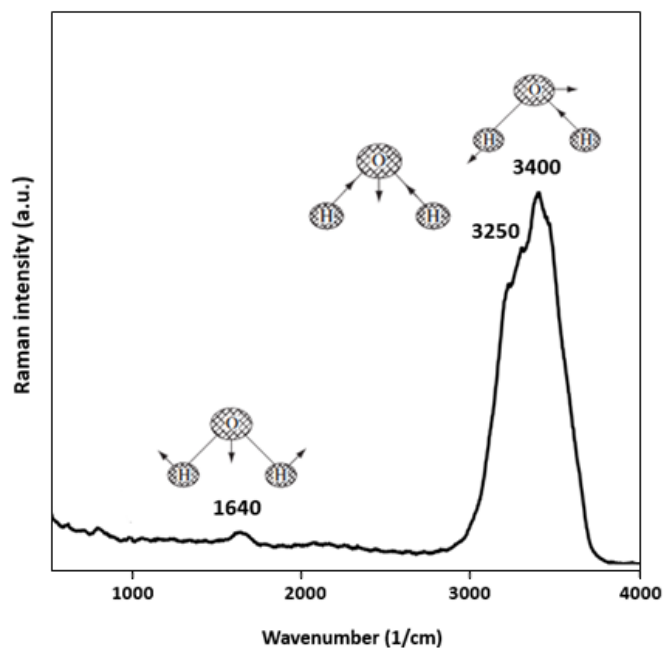
Analytickým výstupem metody Ramanovy spektroskopie je Ramanovo spektrum, které vyjadřuje závislost intenzity Ramanova rozptýleného záření na Ramanově posunu $\Delta\nu$ (cm^{-1}). Ramanovo spektrum poskytuje informace o vibračních pohybech molekul. Hovoříme-li o vibraci, jedná se o vibraci jader kolem rovnovážné polohy. Molekuly jsou tvořeny z atomů, které jsou vázány pružnými vazbami, a proto mohou vykonávat periodický pohyb, kterému jednotlivé vibrace odpovídají. Tyto pohyby jsou označovány jako *vibrační stupně volnosti*. Počet vibrací dané nelineární molekuly lze vypočítat podle vztahu

$$x = 3n - 6,$$

kde n je počet atomů molekuly. Pokud je molekula lineární, je počet vibrací řešen druhým vztahem

$$x = 3n - 5$$

Vibrační stupně volnosti molekuly definují její vibrační spektrum. Na obr. 6 je uveden příklad Ramanova spektra jednoduché molekuly, molekuly vody. V Ramanově spektru této tříatomové nelineární molekuly jsou viditelné tři vibrační pásy. Pás při 1640 cm^{-1} odpovídá deformační vibraci, pásy při 3250 cm^{-1} a 3400 cm^{-1} souvisejí se symetrickými a antisymetrickými valenčními vibracemi molekuly.



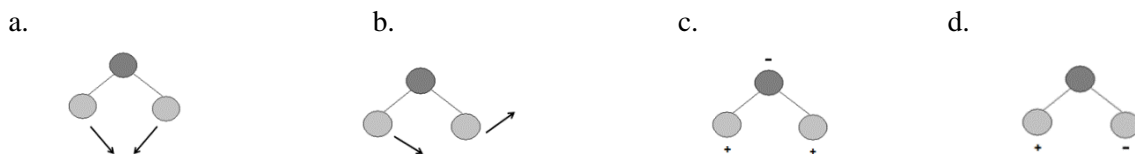
Obr. 6 Ramanovo spektrum vody. Pás při 1640 cm^{-1} odpovídá deformační vibraci, pásy při 3250 cm^{-1} a 3400 cm^{-1} souvisí se symetrickými a antisymetrickými valenčními vibracemi molekuly.

Upraveno dle: Smith & Dent, 2005

Valenčními vibracemi (angl. stretching vibrations) se nazývají vibrace, při nichž dochází ke změnám mezijaderných vzdáleností atomů v molekule. Tyto se dále klasifikují na symetrické a antisymetrické (obr. 7). *Deformačními vibracemi* (angl. bending vibrations) se rozumí deformace valenčních úhlů. Deformační vibrace jsou dále klasifikovány na rovinné a mimorovinné (obr. 8).



Obr. 7 Znárodnění valenčních vibrací molekul: a. symetrická, b. antisymetrická vibrace



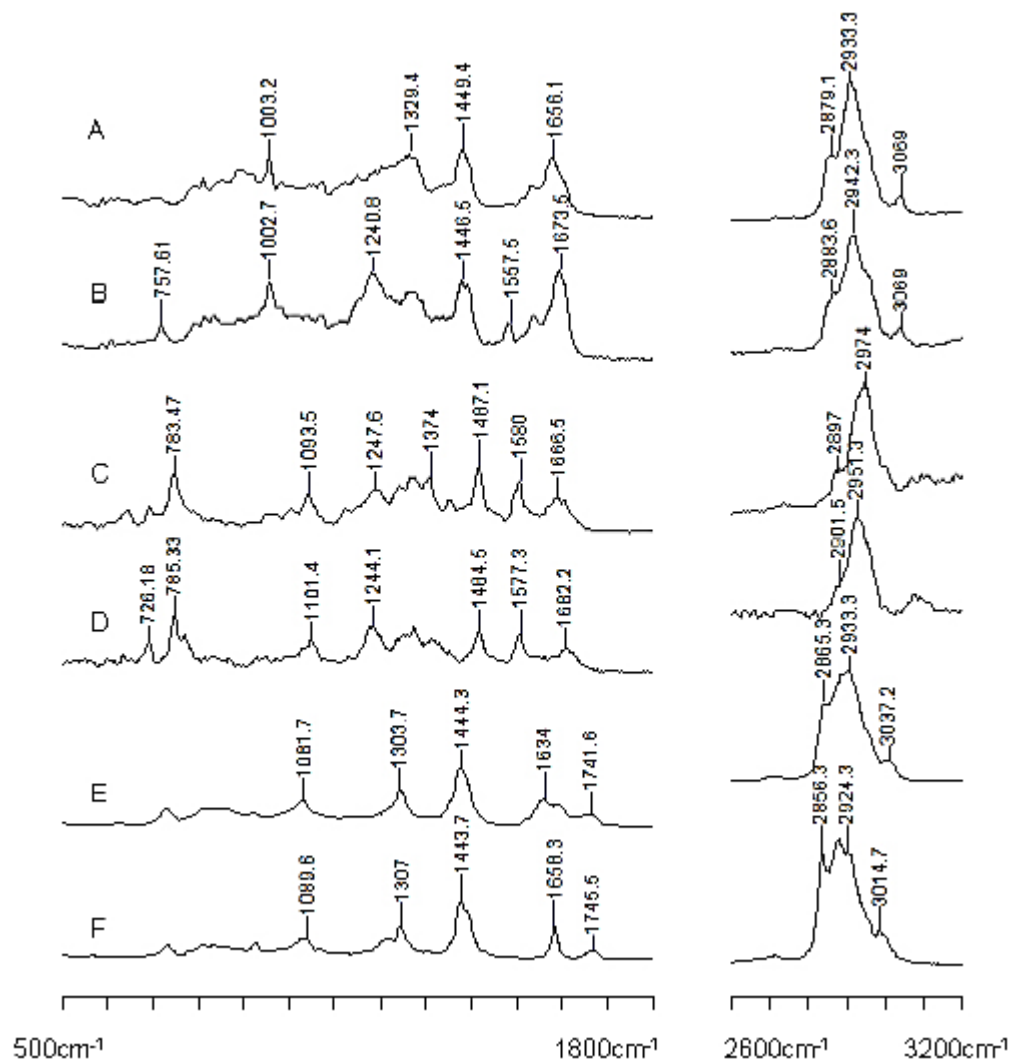
Obr. 8 Znáornění deformačních vibrací: a. rovinná nůžková, b. rovinná kyvadlová, c. mimorovinná vějířová, d. mimorovinná kroutivá deformace

4.4 Ramanovo spektrum biomolekul

Biomolekuly – lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a sacharidy jsou komplexními molekulárními systémy složenými z mnoha atomů. V takovémto komplexu atomů s ekvivalentní strukturou jsou dvě a více vazeb v blízkosti a vzájemně se ovlivňují. Výsledná vibrace pozorovaná v Ramanově spektru je vibrací relativně malé skupiny atomů vázaných těmito vazbami, které jsou od ostatních částí makromolekuly izolovány. Taková vibrace je označována jako *skupinová vibrace* a je charakterizována specifickým skupinovým vlnočtem. Každé skupině atomů jednoho typu odpovídá skupinová vibrace s podobným vlnočtem. Odpovídající pásy v Ramanově spektru vznikají překrytím příspěvků všech těchto skupin s ekvivalentní strukturou a prostředím (Smith & Dent, 2005).

Ramanovo spektrum biomolekul je spektrem složeným z příspěvků všech skupinových vibrací ve složitém komplexu. I pro molekulu DNA, proteinu nebo lipidu existuje $3n-6$ normálních vibrací, ale v jejich skutečném Ramanově spektru lze v intervalu $\sim 600-1800\text{ cm}^{-1}$ rozeznat významně menší počet vibrací, které souvisejí s vibracemi aromatických bází, zbytků sacharidů a fosfátových skupin (obr. 9).

Ramanovo spektrum buňky charakterizují stejné znaky jako Ramanovo spektrum biomolekul. Je rovněž spektrem obsahujícím skupinové vibrace odpovídající vibračním vazeb v lipidech, fosfolipidech, nukleových kyselinách a proteinech podílejících se na kompozici buňky.

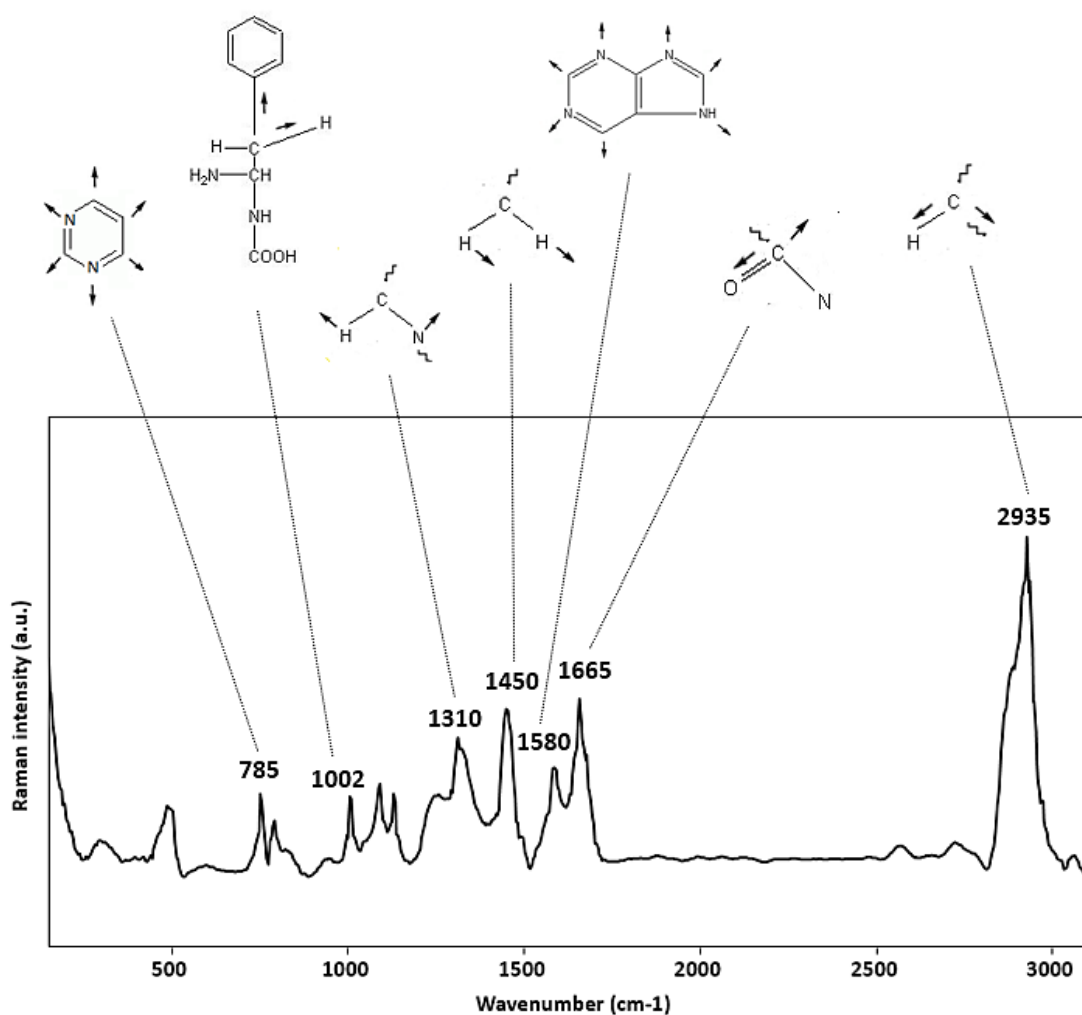


Obr. 9 Demonstrace Ramanova spekter vybraných biomolekul: a. albuminu, typického proteinu v α -konformaci, b. γ -globulinu, typického proteinu v β -konformaci, c. DNA, d. RNA, e. fosfatidyletanolaminu, f. lipidu (1,2-dioleoyl – 3 – trimethylamoniumpropanu) s vyznačením vlnočtu skupinových vibrací v jejich maximu.

Převzato z: Diem et al., 2008

Na obr. 10 je znázorněno průměrné Ramanovo spektrum buňky buněčné linie lidských keratinocytů SVK-14 s vyznačením skupinových vibračních pásů. Nejintenzivnějším pásem v Ramanově spektru buňky je vibrační pás v oblasti $\sim 2800-3030 \text{ cm}^{-1}$ s maximem při 2935 cm^{-1} . odpovídající valenční vibraci C-H vazby. Ta je charakteristická zejména pro dlouhé řetězce nasycených a nenasycených uhlovodíkových řetězců, které jsou důležitými strukturálními jednotkami membránových lipidů. Jejich majoritní výskyt odráží také vysokou intenzitu tohoto vibračního pásu v Ramanově spektru buňky. Důležitá oblast Ramanova spektra buňky leží

v rozmezí $\sim 600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. Tato oblast poskytuje nejkomplexnější informaci o jejím molekulárním složení (Matthäus et al., 2008 A). Intenzivním pásem této oblasti je vibrační pás C=O vazby v peptidech, označované jako amid I $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$. Jiná oblast spektra charakteristická pro vibraci vazeb v proteinech, je oblast $\sim 1270\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ s maximem při 1310 cm^{-1} . V této části Ramanova spektra se vyskytuje větší počet pásů odpovídajících deformační vibraci vazeb C-H a C-N a je označována jako amid III. Deformační vibraci methylenových skupin v lipidech, fosfolipidech, ale také postranních řetězcích proteinů odpovídá vibrační pás $\sim 1425\text{--}1475\text{ cm}^{-1}$ s maximem při 1450 cm^{-1} . Viditelným vibračním pásem je i pás symetrické valenční vibrace fenylové skupiny fenylyalaninu $\sim 1002\text{ cm}^{-1}$. Z vibrací charakteristických pro báze nukleových kyselin jsou důležité především vibrační pás $\sim 785\text{ cm}^{-1}$ odpovídající dýchací vibraci pyrimidinových bází a vibrační pás $\sim 1570\text{--}1590\text{ cm}^{-1}$ s maximem při 1580 cm^{-1} související s dýchací vibrací purinových bází. Dýchací vibrace (*angl.* breathing vibration) souvisí s rozvolňováním aromatického kruhu (Matthäus et al., 2008 A; Matthäus et al., 2008 B; Dieing et al. 2010; Draux et al. 2012).



Obr. 10 Ramanovo spektrum buňky s vyznačením nejintenzivnějších vibračních pásů.

5 Konfokální Ramanova mikroskopie

5.1 Úvod

Mikroskopické techniky jsou neoddělitelnou součástí studia buněk a procesů na buněčné úrovni. Dvacáté století představilo několik významných zobrazovacích technik, které mikroskopii posunuly na úroveň důležitého analytického nástroje. Při využití mikroskopické zobrazovací techniky jsou často hodnoceny výhody a nevýhody, které s sebou metoda přináší. Primárním zdrojem informace na buněčné úrovni bývá zejména detekce informace z fluorescenčně nebo radioaktivně značené sondy, např. protilátky, specificky vyvinuté pro vazbu na cílové místo. Jiné mikroskopické techniky, jako je elektronová mikroskopie nebo mikroskopie skenující sondou splňují požadavky extrémně vysokého rozlišení pro studium buněčných struktur a procesů na buněčné úrovni. Nicméně, přináší komplikace ve vysokých nárocích na přípravu mikroskopického preparátu a sofistikovanost zpracování naměřené informace. Nedávný vývoj vytvořil místo pro jinou mikroskopickou techniku, konfokální Ramanovu mikroskopii. Metoda umožnila zobrazení buněk, buněčných organel, buněčného příjmu a distribuce exogenních látek jako jsou léčiva nebo nanočástice bez nutnosti specifického značení cílových struktur s minimálními nároky na přípravu vzorku.

5.2 Princip metody a instrumentace v konfokální Ramanově mikroskopii

Konfokální Ramanova mikroskopie kombinuje vibrační spektroskopickou techniku - Ramanovu spektroskopii se zobrazovací technikou – konfokální mikroskopii. Systém zahrnující spojení těchto technik nabízí dosažení vysokého rozlišení mikroskopické a citlivosti spektroskopické metody. Tato mikroskopická technika je založená na postupném sběru Ramanova rozptylu z mikroskopického preparátu skenováním bod po bodu, odrážejíc chemickou kompozici vzorku na základě identifikace charakteristických skupinových vibrací v Ramanových spektrech. Pro buňky a tkáně je příznačná identifikace funkčních skupin v proteinech, nukleových kyselinách, lipidech, fosfolipidech a v sacharidech, tedy v základních stavebních složkách buňky. Exogenní látky, např. léčiva nebo nanočástice charakterizuje jiná, často naproti buněčnému prostředí unikátní skupinová vibrace, která se v Ramanově spektru v dané oblasti projeví. Detekce je tedy založená na identifikaci vlastních vibračních znaků molekul.

Počátky metody Ramanovy mikroskopie jsou datovány do 90. let 20. století, kdy byl poprvé zkonstruován Ramanův spektrometr kombinovaný s konfokálním optickým mikroskopem. Další vývoj přinesl krokový motor, umožňující postupné skenování zvolené

oblasti pohybem vzorku. To umožnilo sběr Ramanova spekter z různých pozic na vzorku a tvorbu

jedno-, dvou- nebo třírozměrných zobrazení. Rychlý technický pokrok vedl k postupnému vývoji citlivých a přesných mikroskopických systémů (Dieing et al., 2010). Základní schéma konfokálního Ramanova mikroskopu je zobrazeno na obr. 12 na straně 40.

Zdrojem excitační energie je, podobně jako u typů konfokální mikroskopie, laserový svazek. Intenzita Ramanova rozptylu je úměrná ν^4 , kde ν je frekvence excitačního záření. Excitace při vlnové délce v modré až zelené části spektra (430-565 nm) tak vede k mnohem vyššímu Ramanovu signálu než excitace ve žluté až červené části spektra (565-800 nm). Kratší vlnová délka excitačního záření je spojena s vyšším laterálním rozlišením podle Reyleighova kritéria

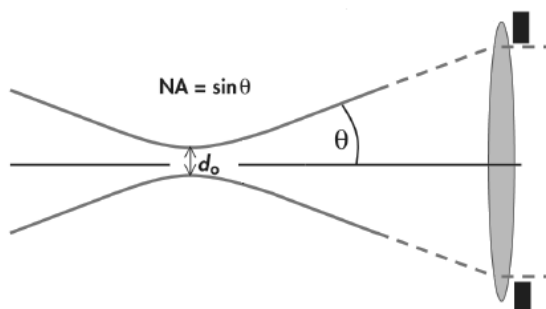
$$D_{xy} = 0,61 \cdot \lambda / NA_{obj},$$

kde λ je vlnová délka, NA numerická apertura použitého objektivu a D_{xy} laterální rozlišení pro specifickou hodnotu vlnové délky λ . Hodnota uvádí vzdálenost mezi dvěma odlišitelnými body.

Ze vztahu pro Rayleighovo kritérium dále vyplývá důležitost numerické apertury *objektivu*. Ta v mikroskopii vyjadřuje účinnou světelnost objektivu. Jedná se o bezrozměrné číslo, které lze vyjádřit vztahem

$$NA = n \cdot \sin \theta$$

kde n je index lomu prostředí před objektivem a θ je polovina vrcholového úhlu kužele paprsků vstupujících do objektivu z bodu s minimálním poloměrem d_0 , v němž je laserový svazek fokusován (obr. 11).



Obr. 11 Schematické znázornění paprsků vstupujících do objektivu s vyjádřením vztahu pro numerickou aperturu objektivu.

Upraveno dle: Overall, 2008

Vztah mezi hodnotou NA a laterálním rozlišením je nepřímo úměrný. Čím více se hodnota NA blíží jedné, tím je hodnota vzdálenosti mezi dvěma odlišitelnými body menší. Uvedené poznatky lze aplikovat na praktickém příkladu. Použití excitační vlnové délky v zelené nebo v modré části spektra elektromagnetického záření a objektivu s NA rovné 0.8 – 1.0 umožňuje dosažení rozlišení v rozmezí hodnot asi 300 – 400 nm. To dovoluje studium preparátu na úrovni buňky, a také na úrovni jednotlivých buněčných organel.

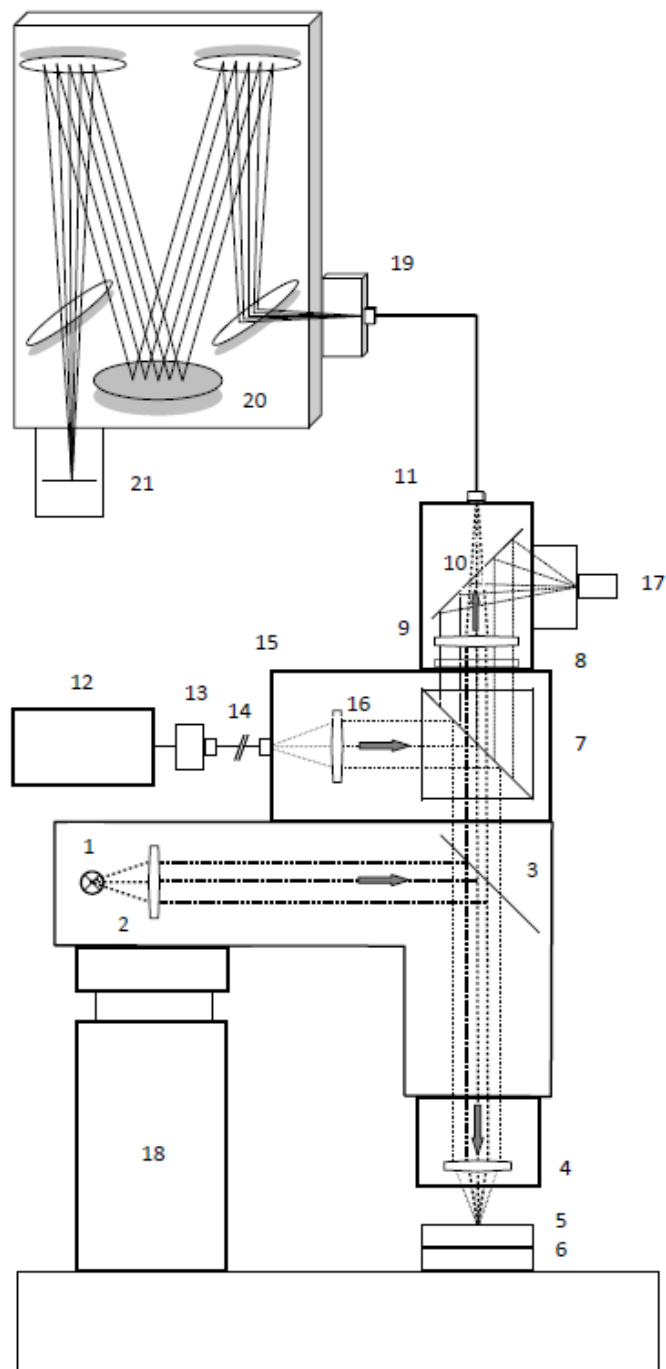
Vstupní a výstupní optické vlákno vytvářejí konfokální optické apertury. Rozptýlené světlo z oblastí vzorku mimo oblast fokusace laserového paprsku, je silně tlumeno filtrací, kterou zajišťují konfokální apertury. Konfokalita systému má kromě vysoké hodnoty rozlišení i jiný praktický význam. Do značné míry také omezuje negativní vliv fluorescence na detekci Ramanova rozptylu (Hollricher, 2010). Fluorescence je významnou komplikací Ramanovy spektroskopie. Při interakci záření s molekulou se vyskytuje s větší pravděpodobností než Ramanův rozptyl. Intenzita fluorescence může dosáhnout až o 6 řádů vyšší hodnoty než je intenzita Ramanova rozptylu. Proto je redukce vlivu fluorescence při sběru Ramanova rozptylu velmi důležitá. Konfokální uspořádání přispívá k redukci vlivu fluorescence z oblastí vzorku mimo oblast fokusace laserového svazku. Využití metody klade také důraz na omezení použití, či eliminaci vlivu přirozeně fluoreskujících látek, a to jak povahy chemikálií využitých při přípravě vzorku (např. složky média), tak pracovních pomůcek (např. popisovače). Specifické je využití mikroskopických sklíček pro Ramanovu mikroskopii vyhotovených z křemene nebo fluoridu vápenatého CaF₂. Vzhledem k obsahu příměsí, které vykazují fluorescenci, není sklo v Ramanově mikroskopii využíváno.

Excitační záření je vstupním optickým vláknem vedeno do mikroskopu, kde je dále zacíleno na *holografický filtr* (*angl.* band – pass filter – filtr propouštějící záření v určitém rozmezí frekvence a silně tlumící záření o frekvenci mimo tento rozsah). Tento filtr zajišťuje redukci Ramanova rozptylu vlákna. Poté je mikroskopickým objektivem fokusováno na vzorek. Rozptýlené Ramanovo záření je sbíráno stejným mikroskopickým objektivem a vedeno na jiný *holografický filtr* (*angl.* edge filter – filtr propouštějící záření za určitou hodnotou frekvence). Tento filtr blokuje Rayleighův rozptyl a paprsky odraženého laserového záření. Rozptýlené záření je výstupním optickým vláknem vedeno na *detektor Ramanova spektrometru*.

Detektor je jednou z klíčových komponent Ramanova mikroskopu a jeho správný výběr silně ovlivňuje účinnost zařízení. *CCD* (*z angl.* charged couple devices neboli zařízení s vázanými náboji) je elektronická součástka na bázi silikonového čipu používaná pro snímání obrazové informace. CCD využívá fyzikálního jevu známého jako *fotoelektrický jev*. Čip se skládá ze sítě polovodičových fotobuněk. Po dopadu světla vzniká fotoelektrickým jevem v polovodiči elektrický náboj. Volné nosiče náboje (zejména elektrony) jsou kladnou elektrodou

zachyceny v tzv. kapacitoru. V dalším kroku je tento obraz čtený pixel po pixelu. Čtení signálu probíhá přesouváním kladného náboje v každém sloupci pixelů, přičemž jsou elektrony přemísťovány z jednoho pixelu na druhý. Elektrony jsou tímto způsobem přesouvány až na terminál na konci zařízení. Po přečtení celé řady se celý proces opakuje a postupně je přesouvána další řada elektronů. Tímto způsobem jsou všechny elektrony zachycené na čipu přeneseny a odpovědny za tvorbu signálu (Bushberg et al., 2002). Obvyklý rozměr mřížky v Ramanově spektroskopii je 1024 x 127 pixelů (Hollricher, 2010).

Slabá intenzita Ramanova rozptylu posiluje důležitost optimalizace každé části mikroskopu tak, aby byla zaručena co možná nejméně ztrátová transmise záření. Nesprávný výběr komponent a nastavení jednotlivých částí systému může negativně ovlivnit citlivost systému, a to dokonce až o několik řádů. Důležitými prvky ovlivňujícími měření je správné nastavení objektivu a fokusace laserového svazku na vzorek.

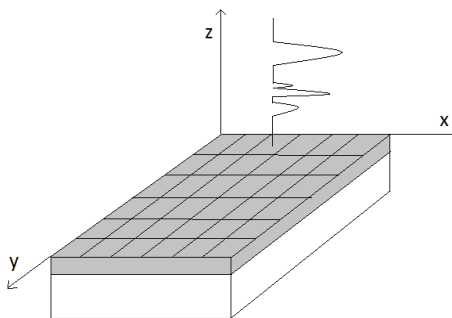


Obr. 12 Schematické znázornění konfokálního Ramanova mikroskopu.

1 – osvětlení mikroskopu, 2 – systém čoček, 3 – dělič paprsků (50:50), 4 – objektiv, 5 – vzorek, 6 – piezoelectricky řízený stolek mikroskopu, 7 – pásmový holografický filtr, 8 – přechodový holografický filtr, 9 – čočka, 10 – dělič paprsků (100:0), 11 – vícevidové optické vlákno propojující mikroskop se spektrometrem, 12 – excitační laser, 13 – výstup jednovidového optického vlákna, 14, 15 – propojení a vstup laserového paprsku, 16 – systém čoček, 17 – videokamera, 18 – zaostřovací systém, 19 – výstupní optické vlákno propojující mikroskop se spektrometrem, 20 – Ramanův spektrometr, 21 – CCD detektor

5.3 Hyperspektrální datové soubory

Analytickým výstupem konfokální Ramanovy mikroskopie buněk je soubor Ramanových spekter, které jsou komplexním zdrojem informací o pozorovaném vzorku. V předchozím textu zmíněný sběr Ramanova rozptylu bod po bodu v rovině a oblasti zvolené pro zobrazení poskytuje soubory stovek až tisíců spekter, které musí být dále zpracovány. Např. v zobrazované oblasti 100 x 100 pixelů je celkově změřeno $100 \times 100 = 10\,000$ individuálních Ramanových spekter. Tento rozsáhlý datový soubor je označován jako *hyperspektrální datový soubor*. Hyperspektrální datový soubor tvoří tzv. *datovou kostku* (z angl. data cube), kterou charakterizují tři dimenze (obr.). Souřadnice x a y poskytují dvojrozměrnou informaci o vzorku, souřadnice z je spektrální informací o každém pixelu zobrazované oblasti. *Jedno Ramanovo spektrum datové kostky představuje jeden pixel ve výsledném zobrazení.*



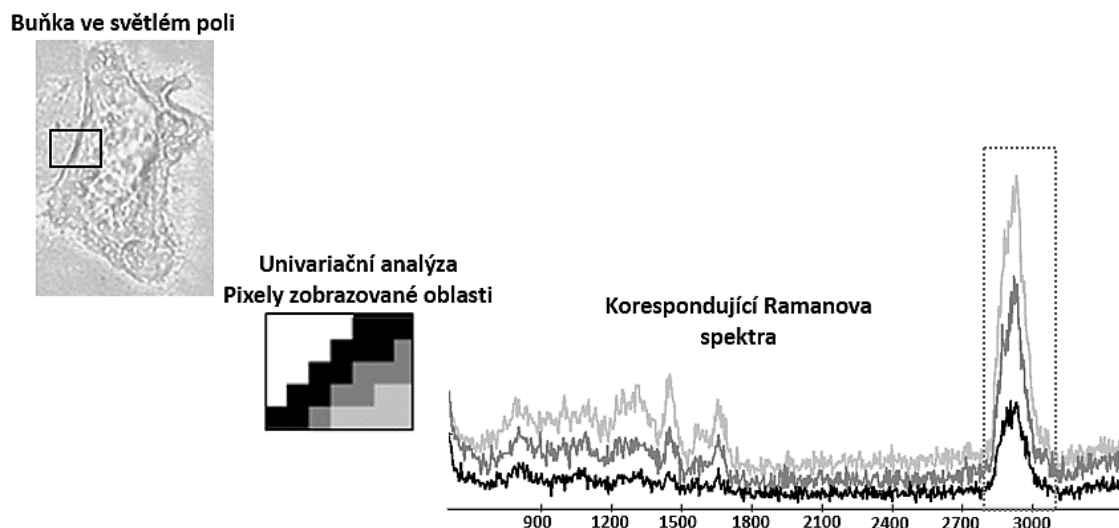
Obr. 13 Schematické znázornění datové kostky hyperspektrálního datového souboru.

Pro zobrazení v Ramanově mikroskopii jsou využívány dvě metody analýzy, resp. jejich skupiny: *univariační*, nebo také jednorozměrná (s jednou proměnnou) a *multivariační* nebo také vícerozměrné metody analýzy (s více proměnnými). Primárním rozdílem je, že univariační analýza zahrnuje zpracování jedné proměnné ve všech spektrech a postupnou tvorbu zobrazení pixel po pixelu, zatímco metody multivariační analýzy využívají informace z celého datového souboru, které postupně, s využitím výpočetních algoritmů, porovnávají.

5.4 Univariační metoda analýzy obrazu v Ramanově mikroskopii

Principem univariační metody při tvorbě zobrazení je individuální zpracování jednotlivých Ramanových spekter. Pro zobrazení je klíčovým výběr relevantní spektrální informace, která vytváří proměnnou, jenž charakterizuje každé individuální spektrum. Touto proměnnou je konkrétní oblast v Ramanově spektru, např. specifický vibrační pás. Intenzita

zabarvení pixelu se odvíjí od intenzity Ramanova rozptylu v dané oblasti. Výstupem je následně monochromatická intenzitní mapa znázorňující intenzitu daného vibračního pásu v jednotlivých pixelech. Pro zobrazení buňky je za nevhodnější považován výběr vibračního pásu odpovídajícího valenční vibraci vazby C-H, a to $2800 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ (Scaffi-Haap et al., 2007). Schematicky univariační metodu analýzy obrazu znázorňuje obr. 14.



Obr. 14 Schematické znázornění univariační metody analýzy obrazu s využitím intenzity vibračního pásu vibrace vazby C-H $2800 - 3100 \text{ cm}^{-1}$.

Intenzita každého pixelu nabývá hodnot intenzity od 0 do 255 (pro vysvětlení jako 8 bitový byte; $2^8 = 255$), kde 0 (černá) znázorňuje nulovou a 255 (bílá) nejvyšší intenzitu. Překrytí dvou monochromatických map pro různé vibrační pásy umožňuje kombinaci do RGB, tzn. red-green-blue zobrazení, a vytváří tak pseudo-barevné zobrazení se smíchanými barvami indikujícími hodnoty intenzity vybraných vibračních pásů v každém pixelu dle aditivního RGB modelu (obr.).

5.5 Multivariační metody analýzy obrazu v Ramanově mikroskopii

Multivariační metody analýzy jsou děleny do dvou skupin. První skupinu tvoří tzv. „těžké“ metody (z *angl.* hard nebo crisp), druhou tzv. „měkké“ metody (z *angl.* soft). Zatímco v prvním případě metoda začlení spektrum do určité skupiny, ve druhém případě může být pixel odpovídající jednomu Ramanovu spektru výsledkem kombinace několika skupin (Miljkovic et al., 2010). Podstatou je zobrazení pixelů (Ramanových spekter) patřících do stejné skupiny

stejnou barvou. Vytvářeno je tak jakési pseudo-barevné zobrazení, které poskytuje pohled na diferenciaci vnitrobuněčného prostředí, resp. diferenciaci částí jakéhokoliv pozorovaného vzorku.

Nejčastěji využívané „měkké“ multivariační metody reprezentuje zejména analýza hlavních komponent a analýza vrcholových komponent, „těžké“ multivariační metody jsou reprezentovány shlukovou analýzou.

5.5.1 Analýza hlavních komponent

Analýza hlavních komponent (PCA, principal component analysis) je často používanou metodou pro analýzu hyperspektrálních dat (Hadegaard et al., 2011). Patří k tzv. „měkkým“ multivariačním metodám.

Analýza je založena na lineární transformaci souboru spekter do nového souřadnicového systému. Každé spektrum je zobrazeno jako bod v soustavě souřadnic, které jsou tvořeny novými proměnnými, tzv. *hlavními komponentami* (PC, principal component). Určujícím faktorem pro zobrazení spektra v systému hlavních komponent je jeho vzdálenost od hlavní komponenty. Hlavní komponenty jsou seřazeny dle důležitosti. První hlavní komponenta (PC1, principal component 1) udává největší vzdálenost od všech spekter v datovém souboru a nejvyšší míru variability, druhá a každá následující hlavní komponenta je ortogonální (kolmá na všechny předcházející) a popisuje množství zbývající variability. Obecně, první tři PC vykazují nejvyšší variabilitu v datovém souboru. Získávají jsou normalizované hodnoty vzdálenosti bodů, resp. spekter od hlavních komponent, a ty jsou kvantitativně vyjádřeny intenzitou zbarvení. Intenzity jsou rozmístěny v prostoru jako funkce vzdálenosti individuálních spekter od hlavních komponent (Lasch & Naumann, 1998).

Hodnoty vzdálenosti spekter od PC odpovídají 0-255 a jsou konvertovány do monochromatické intenzitní mapy. Dvě nebo tři monochromatické mapy pro různé PC mohou být zkombinovány do RGB zobrazení a vytvořit tak pseudo-barevné zobrazení se smíchanými barvami indikujícími hodnoty intenzity pro každou PC (Miljkovic et al., 2010).

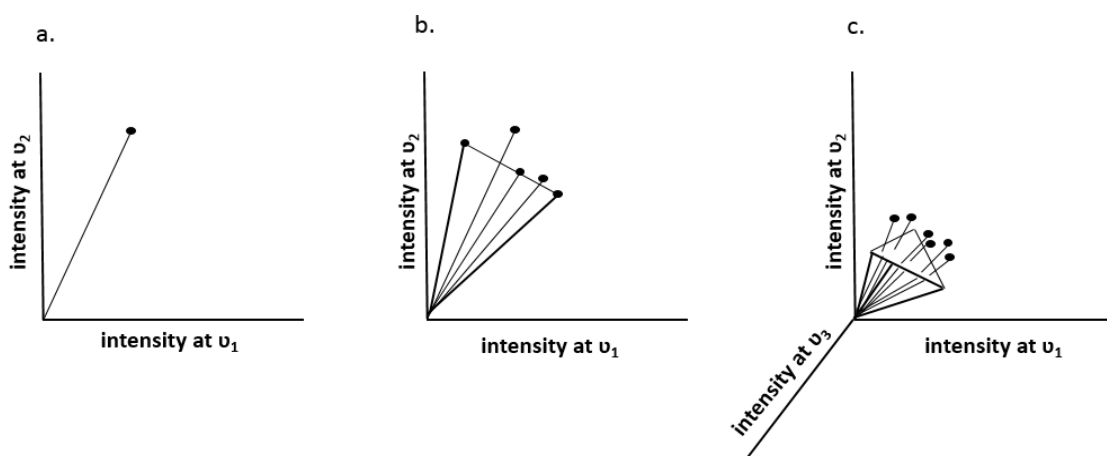
5.5.2 Analýza vrcholových komponent

Základem metody analýzy vrcholových komponent (VCA, z *angl.* vertex component analysis) je předpoklad, že každé spektrum může být považováno za vektor v n-dimenzionálním prostoru. Vektory spekter v tomto prostoru tvoří geometrický útvar libovolného rozměru,

přičemž je dodrženo pravidlo počtu $n+1$ rohů v n -dimenzionálním prostoru. Vrcholy tohoto geometrického útvaru odpovídají nejintenzivnějším spektrům datového souboru a jsou označovány jako „koncová spektra“ (z *angl.* endmembers). VCA analyzuje, jak podobné je každé spektrum tomuto „koncovému spektru“ v datovém souboru (Hadegaard et al., 2011).

Představme si, že spektrum v datovém souboru je popsáno dvěma frekvencemi ν_1 a ν_2 . Poté může být na základě odpovídajících intenzit rozmístěno v systému dvou os frekvencí ν_1 a ν_2 (obr. 15a). Pokud jsou spektra identická, budou popsány dvěma identickými vektory (obr. a). Dvě spektra mající stejné „složení“, ale jinou intenzitu budou popsány dvěma překrývajícími se vektory různé délky (obr. 15b). U spekter charakterizovaných třemi frekvencemi vytvoří vektory vrcholy trojúhelníku (obr. 15c). Vektory (spektra) procházející vrcholy trojúhelníku jsou „koncová spektra“ (také bývají označovány jako „pure component spectra“ = „spektra čistých komponent“). Obecně, VCA vytváří v tomto uspořádání vrcholy p -rozměrného geometrického útvaru – polytopu o počtu $p+1$ rohů.

Experimenty při zpracování dat naměřených Ramanovou mikroskopií buněk poukázaly na přítomnost minimálně tří „koncových spekter“. Jedno „koncové spektrum“ vždy patří vodě. Další následující nesou znaky odpovídající vodě a proteinům a poté fosfolipidům (Matthäus et al., 2010). Podobně jako u PCA, i u VCA mohou být monochromatické mapy pro různé „koncové členy“ být zkombinovány do RGB zobrazení a vytvořit tak pseudo-barevné zobrazení se smíchanými barvami indikujícími hodnoty intenzity pro každé „koncové spektrum“ (Miljkovic et al., 2010).



Obr. 15 Znárodnění vektorů a „koncových spekter“ analyzovaných metodou VCA
Upraveno dle: Miljkovic et al., 2010

5.5.3 Shluková analýza

Shluková analýza (také klastrová analýza, *angl.* cluster analysis) je v podstatě tříděním desítek až tisíců spekter v souboru dat podle jejich podobnosti. Jako výsledek je zobrazována oblast s určitým rozložením shluků obsahujících soubory podobných spekter.

„*k-mean*“ *shluková analýza* (KMC, *k-mean cluster analysis*) je „těžká“ multivariační metoda, která rozděluje počet n spekter do předem určeného počtu k shluků. Na počátku algoritmus rozpoznává tzv. centroidy, spektra reprezentující výchozí průměrné spektrum vznikajícího shluku. Každému centroidu jsou přidělena nejbližší spektra. Poté, co je spektrum zaříděno do skupiny, je definován nový centroid, který tvoří průměrné Ramanovo spektrum vznikajícího shluku. Důležitou hodnotou při shlukování je vzdálenost spekter od jednotlivých centroidů, která se označuje jako tzv. skóre. Ve spektroskopické terminologii se vysokým skóre rozumí vysoká podobnost spektra centroidu daného shluku (Hadegaard et al., 2011). Ve výsledném zobrazení jsou jednotlivé shluky a jejich spektra (pixely) barevně odlišeny.

Blízká KMC je tzv. „*fuzzy C-mean*“ *shluková analýza* (FCM, *fuzzy C-mean cluster analysis*), jejíž princip vychází z KMC. Podobnost spektra centroidu je ve shluku odstupňovaná v rozsahu 0 až 1, kde 1 značí identicitu spektra s centroidem. Jak již bylo zmíněno výše, spektra (pixely) v rámci jednoho shluku jsou v zobrazení znázorněna stejnou barvou. V případě FCM je navíc stupeň jejich intenzity závislý na vzdálenosti spektra od centroidu.

Hierarchická shluková analýza (HCA, *hierarchical cluster analysis*) vytváří určitou shlukovou hierarchii, která může být prezentována v podobě stromu. Toto uspořádání se nazývá *dendrogram*. Kmen stromu představuje hlavní shluk obsahující všechna spektra. Následně jsou shluky rozděleny na sub-shluky různé velikosti (větve), a ty na další menší sub-shluky (menší větve, větvičky, menší větvičky atd.). Listy jsou poté individuální spektra z datového souboru. Tvorba hierarchického uspořádání začíná buď ze základního shluku, který je postupně rozdělován anebo je hierarchické uspořádání vytvořeno postupným shlukováním jednotlivých spekter. Důležitým ukazatelem pro třídění dat, resp. spekter do klastrů je jejich podobnost, resp. vzájemná vzdálenost. HCA počítá symetrickou vzdálenost dat v souboru o rozměrech $n \times n$ mezi n spektry a určuje jejich podobnost. Každé individuální spektrum je porovnáváno se všemi spektry v datovém souboru a je určena jejich vzájemná vzdálenost. Algoritmus poté vyhledává spektra s nejmenší vzdáleností a dvě nejpodobnější, resp. nejbližší spektra zařadí do jednoho klastru. Poté spočítá rozdíl mezi spektry zařazenými v klastru a zbývajících spektry v datovém souboru. Tento iterativní proces je opakován $n-1$ krát a je ukončen po sloučení odpovídajících spekter do finálního klastru (Hadegaard et al., 2011).

5.5.4 Další multivariační metody analýzy v Ramanově mikroskopii

Výše zmíněné metody multivariační analýzy patří k nejastěji využívaným algoritmům pro zobrazení v Ramanově mikroskopii. Nicméně, zpracování hyperspektrálních datových souborů je rozšířeno i o další metody modelující rozdíly mezi skupinami dat. Lze zmínit multivariační metody analýzy, jako jsou *Gaussovy směsné modely* (GMM, Gaussian mixture modelling) nebo aplikace zvaná „*umělá neuronová síť*“ (ANN, artificial neural network) (Lasch et al., 2006; Yang et al., 2006).

Alternativou VCA je *N-FINDR* algoritmus, který byl navržen pro studium složení minerálů v geologickém průzkumu (Winter, 1999) a v analýze dat naměřených konfokální Ramanovou mikroskopii představuje nový přístup (Hadegaard et al., 2011). Podobně jako VCA, i N-FINDR principem je hledání spekter čistých komponent, tzv. „endmembers“. N-FINDR algoritmus je založený na poznatku, že v p -spektrální dimenzi je p -objem definován koncovými spektry, přičemž tento objem je větší než objem definovaný jakoukoliv jinou kombinací pixelů (spekter). Tento algoritmus vyhledává soubor spekter definujících největší p -objem (Nascimento & Bioucas, 2005; Wu et al., 2012).

5.6 Ramanova mikroskopie v biomedicině

Za počátek vývoje metody konfokální Ramanovy mikroskopie lze považovat období 90. let 20. století, kdy byl konfokální Ramanův mikroskop poprvé zkonstruován. Rychlý technologický vývoj přispěl k rozšíření metody, která umožňovala sběr Ramanova rozptylu ze vzorku s vysokou přesností a citlivostí (Delhaye et al., 1996). Nicméně, využití metody se omezovalo zejména na oblast techniky, geologie a materiálového výzkumu. Ačkoliv zmíněné oblasti zájmu nadále využívají Ramanovu mikroskopii jako jednu z důležitých aplikací, teprve nedávné období motivovalo mnoho vědeckých skupin k začlenění Ramanovy mikroskopie do oblasti biomedicínského výzkumu.

Ramanova mikroskopie si získala pozornost zejména jako technika pro *zobrazení buněk*, nevyžadující značení. Metoda je založena na detekci specifických spektroskopických vlastností biomolekul v buněčném prostředí, lišícími se intenzitou na základě poměru jejich výskytu v různých oblastech buňky. Technika umožnila zobrazení buněčných organel, zejména jádra (Uzunbajakava et al., 2003 A) a membránových organel, jako jsou mitochondrie (Matthäus et al., 2007). Komparativní studie s fluorescenčním značením mitochondrií poukázaly na konkurenceschopnost Ramanovy mikroskopie v zobrazení membránových struktur v perinukleární oblasti buňky. Metoda Ramanovy mikroskopie si získala významné postavení v oblasti studia *distribuce exogenních látek* na buněčné úrovni. Velký zájem se

soustředil na studium vnitrobuněčné distribuce klinicky využívaných *léčiv*, např. ze skupiny imunopresiv nebo protinádorových léčiv (Balls et al., 2007; El-Mashtoly et al., 2014; Feofanov et al., 2000; Ling et al., 2002). Neméně významné využití získává metoda Ramanovy mikroskopie ve studiu buněčného příjmu a distribuce *nanočástic*. Vedle metody TEM a fluorescenční mikroskopie zajímá metoda Ramanovy mikroskopie v této oblasti významné postavení. Důvodem jsou zejména minimální nároky na přípravu vzorku a spolehlivá detekce nanočástic, jejichž vibrace jsou dostatečně odlišné od skupinových vibrací biomolekul. Metoda byla např. úspěšně využita pro vizualizaci buněčného příjmu a distribuce nanočástic TiO₂ a FeO(OH) (Ahlinder et al., 2013), zlatých (Shah et al., 2011), polystyrenových (Dorney et al., 2012) i lipidových nanočástic (Chernenko et al., 2009).

Na aplikace metody Ramanovy mikroskopie v biomedicině lze pohlédnout dvěma způsoby. První zahrnuje výše zmíněné zobrazení buněk s využitím univariačních nebo multivariačních metod analýzy. Druhý způsob je, více než možností zobrazení, charakterizován aplikací multivariačních metod na hyperspektrální datové soubory s cílem diferenciac skupin, které nesou specifické vlastnosti projevující se Ramanových spektrech. Důležitým příkladem aplikace, která tento přístup reprezentuje, je *odlišení nádorových od nenádorových buněk*. S tumorigenezí související biochemické změny probíhající na úrovni biomolekul mohou být monitorovány zejména jako kvantitativní a konformační transformace DNA a proteinů, které se projevují v Ramanových spektrech nádorových buněk (Choi et al., 2005; Yu et al., 2006). Metoda Ramanovy mikroskopie byla také úspěšně využita jako nástroj pro *diferenciaci bakteriálních kmenů*. Aplikace je založena na detekci spektrálních odlišností souvisejících zejména s odlišným výskytem a kvantitativním zasoupením pigmentů u různých druhů a kmenů bakterií (Almarashi et al., 2013; Münchberg et al., 2014).

Ramanova mikroskopie je rychle se vyvíjející metodou, která neustále nabízí možnosti využití v různých odvětvích biologie a medicíny. Současná situace naznačuje, že využití metody Ramanovy mikroskopie není na ústupu. Naopak, objevují se další studie, zejména studie možností klinických aplikací metody. Ty jsou především zaměřeny na rychlou diagnostiku tumorigeneze, a to jak u cirkulujících (Krafft et al., 2016; Neugebauer et al., 2014), tak u solidních nádorů (Kast et al., 2014; Taketani et al., 2013).

6 Cíle práce

1. Zhodnotit cytotoxický a genotoxický efekt studovaných TiO_2 a AgNPs získaných od různých výrobců, určených pro komerční účely na buněčných liniích odvozených od lidských keratinocytů SVK-14 a lidských fibroblastů BJ.
2. Využít metodu konfokální Ramanovy mikroskopie pro charakterizaci studovaných nanočástic TiO_2 a AgNPs a zobrazení jejich buněčného příjmu a distribuce na buněčné úrovni.
3. Doplnit výsledky studií cytotoxického a genotoxického působení nanočástic TiO_2 a AgNPs na Ústavu lékařské biofyziky o zhodnocení jejich buněčného příjmu.

7 Experimentální část

Materiál a metody

7.1 Použitý materiál, přístroje a software

Chemikálie a studované nanočástice

- chlorid sodný NaCl, chlorid draselný KCl, hydrogenfosforečnan draselný K_2HPO_4 , dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 (Lach-ner) pro přípravu pufovaného fyziologického roztoku (PBS, phosphate buffer saline): v 1 l H_2O 8 g NaCl; 3,2 g K_2HPO_4 ; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,2 g KCl; pH = 7.4
- 10% zásobní roztok formaldehydu (Fagron)
- dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich)
- agaróza s vysokým bodem tání (HMP, Serva), agaróza s nízkým bodem tání (LMP, Qbiogene)
- Triton X-100 (Serva)
- NaOH (Sigma Aldrich)
- SYBR Green (Invitrogen)
- MTT - [3-(4,5 – dimethylthiazol – 2 – yl) – 2,5 – difenyl tetrazolium bromid] (Sigma Aldrich)
- CM-H₂DCFDA (5,6-chloromethyl-2,7'-dichlorodihydrofluorescein) (Invitrogen)
- vzorky TiO₂ nanočástic: TiO₂ a Nanorutil (Precheza), Eusolex® T-AVO (Merck)
- vzorky AgNPs: KC Rulc 14, 20, 9 a 29 (KC Rulc), VINTR (Lakshmi-Narayan)

Kultivace buněčných linií

- buněčné linie lidských keratinocytů SVK-14, lidských fibroblastů BJ (ACTT)
- růstové médium (DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium, Invitrogen)
- fetální bovinní sérum (FBS, fetal bovine serum, Sigma Aldrich)
- trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich)
- L- glutamin (Sigma-Aldrich)
- penicilin (Biotika)
- streptomycin (Invitrogen)
- okénka z taveného křemene SiO₂ 1 x 1 cm (Meopta)

Přístroje

- multidetekční destičkový spektrofotometr Synergy HT (BioTek)
- mikroskop atomárních sil Bioscope Catalyst s transmisním mikroskopem IX81 (Olympus); opatřený křemíkovou sondou, pozůstávající z křemíkového hrotu na trojúhelníkovém nosiči z nitridu křemíku SNL-A (Bruker)
- fluorescenční mikroskop Olympus IX81 (Olympus)
- konfokální Ramanův mikroskop CRM model Alpha 300 R+ (WiTec); opatřený frekvenčním zdvojeným Nd:YAG laserem (Spectra Physics Excelsior, 532 nm)

Využitý software

- Gwyddion 2.40 (Český metrologický institut, Brno, Česká republika)
- Nanoscope Analysis 1.5 (Bruker, Santa Barbara, Kalifornie)
- WSxN 5.0. Develop 7.0 Image Browser
- Phototox 2.0 (ZEBET, Berlín, Německo).
- WiTec Project 2.10 (WiTec, Ulm, Německo)
- statistický software SPSS 22 (SPSS Inc. Chicago, USA)

7.2 Studované nanočástice

V práci byly studovány vzorky AgNPs a nanočástic TiO₂ v přípravcích určených pro komerční použití. První část experimentální práce zahrnovala 5 vzorků – 2 vzorky TiO₂ a 3 vzorky AgNPs. Disperze TiO₂ nanočástic (v práci označeny jako TiO₂), s deklarovanou koncentrací

8 g.l⁻¹, byla získána od firmy Precheza, a.s. Nanočástice v disperzi nebyly stabilizovány. Výrobce doplnil informaci o jejich velikosti na 28 nm. Druhý vzorek obsahující TiO₂ nanočástice (v práci označen jako Nanorutil) byl rovněž získán od firmy Precheza, a.s. Jeho koncentrace byla 16,4 mg.l⁻¹. Velikost nanočástic dle výrobce byla 128 nm. Nanočástice v disperzi byly stabilizovány směsí SiO₂/Al₂O₃. Nanočástice TiO₂ z této skupiny vzorků byly určeny jako příměs do nátěrových hmot. Zbývající vzorky obsahovaly AgNPs. První dva vzorky byly pořízeny od firmy KC Rulc s koncentracemi 14 mg.l⁻¹ (v práci označeny jako KC Rulc 14) a 20 mg.l⁻¹ (v práci označeny jako KC Rulc 20). Přípravky obsahovaly stříbro (99,99%) a ultračistou vodu, bez příměsi stabilizačních látek. Informace o velikosti nanočástic v disperzích nebyly dodány. Poslední vzorek AgNPs byl pořízen u firmy Lakshmi-Narayan s koncentrací 40

mg.l⁻¹ (v práci označen jako VINTR). Ani v tomto případě nebyla výrobcem charakterizována velikost nanočástic v disperzi. Ve druhé části experimentální práce byly studovány 3 vzorky – 1 vzorek nanočástic TiO₂ a dva vzorky AgNPs. Nanočástice TiO₂ v této skupině vzorků byly určeny jako anorganický UV filtr v příměsi do kosmetických opalovacích přípravků (Eusolex® T-AVO) a v disperzi byly stabilizovány SiO₂. Informace o velikosti nanočástic nebyly dodány. Dva vzorky AgNPs byly pořízeny u firmy KC Rulc a jejich koncentrace byla 20 mg.l⁻¹. Disperze se lišily mezikrokem v elektrolytické přípravě nanočástic, který zahrnoval odlišné způsoby míchání (v práci označeno jako KC Rulc S9 a KC Rulc S29). Výrobní postup není, vzhledem k přání výrobce, komentován. Přípravky obsahovaly stříbro (99,99%) a ultračistou vodu, bez příměsí stabilizačních látek. Informace o velikosti nanočástic nebyly dodány. Výše zmíněné informace o vzorcích studovaných nanočástic přehledně shrnuje tab.1.

Tab. 1 Souhrné informace o studovaných vzorcích nanočástic TiO₂ a AgNPs dostupné od výrobce.

Nanočástice TiO ₂				
Vzorek	Zdroj	Koncentrace	Velikost částic	Stabilizace
TiO ₂	Precheza a.s.	8 g.l ⁻¹	28 nm	ne
Nanorutil	Precheza a.s.	16,4 g.l ⁻¹	128 nm	SiO ₂ /Al ₂ O ₃
Eusolex® T-AVO	Merck s.r.o.	pevná látka	-	SiO ₂
AgNPs				
Vzorek	Zdroj	Koncentrace	Velikost částic	Stabilizace
KC Rulc 14	KC Rulc	14 mg.l ⁻¹	-	ne
KC Rulc 20	KC Rulc	20 mg.l ⁻¹	-	ne
VINTR	Lakshmi - Narayan	40 mg.l ⁻¹	-	-
KC Rulc S9	KC Rulc	20 mg.l ⁻¹	-	ne
KC Rulc S29	KC Rulc	20 mg.l ⁻¹	-	ne

7.3 Zobrazení nanočástic metodou AFM

Pro zobrazení studovaných vzorků nanočástic a jejich morfologie byl využíván mikroskop atomárních sil Bioscope Catalyst s transmisním mikroskopem IX81 (Olympus) a SNL-A sondou (Bruker). Vzorky studovaných nanočástic byly nejdříve dle potřeby zředěny v PBS. Následně byla disperze nanočástic aplikována na mikroskopické sklíčko a vysušena při 60 °C. Nanočástice byly zobrazovány při rychlosti snímání 0,3 Hz. Velikost skenované oblasti byla 5 x 5 μm. AFM zobrazení byla prováděna v poklepovém režimu s použitím křemíkové

sondy SLN-A, s rezonanční frekvencí 40-75 kHz s konstantní silou 0.58 N.m^{-1} v případě vzorků TiO_2 , Nanorutil, KC Rulc 14, KC Rulc 20 a Vintr, resp. 45-95 kHz s konstantní silou 0.4 N.m^{-1} v případě vzorků Eusolex® T-AVO, KC Rulc S9 a S29. Zobrazení byla zpracována v programech Gwyddion 2.40 a WSxN 5.0. Develop 7.0 Image Browser. Hodnoty vertikální vzdálenosti byly zpracovány v programu Nanoscope Analysis 1.5.

7.4 Buněčné kultury

V experimentech byly využívány buňky buněčných linií lidských keratinocytů SVK-14 a lidských fibroblastů BJ. Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích v prostředí 5% CO_2 při 37 °C, 24 h v médiu DMEM obsahujícím 10% fetální bovinní sérum a 2 mM L-glutamin. Po odstranění růstového média byly buňky promývány roztokem PBS a poté byl přidán 0,1% roztok trypsinu s EDTA. K uvolnění adherentních buněk od stěn kultivační nádoby byly buňky vystaveny působení enzymu trypsinu 2-5 min v inkubátoru, při teplotě 37 °C. K inaktivaci enzymu bylo poté přidáno médium a buněčná suspenze byla přemístěna do centrifugační zkumavky. Byla provedena centrifugace (400 g, 5 min) a po opatrném odstranění supernatantu byl pelet resuspendován. Následně byl stanoven počet buněk v buněčné suspenzi metodou počítání buněk pod mikroskopem s využitím Bürkerovy komůrky. Buněčná suspenze byla v potřebném objemu dále využívána pro následující experimenty. Všechna stanovení byla prováděna v triplicátech spolu s relevantní kontrolou. Výsledky experimentů na buněčných kulturách reprezentují hodnoty odvozené ze tří na sobě nezávislých měření.

7.5 Stanovení hodnoty IC_{50} nanočástic - MTT test

Cytotoxicita studovaných nanočástic byla hodnocena pomocí testu viability MTT. MTT test je kvantitativní spektroskopická metoda analyzující schopnost buněčné proliferace na základě mitochondriální aktivity živých buněk. Metoda je založena na detekci aktivity mitochondriálních enzymů ze skupiny dehydrogenas, aktivních pouze v živých proliferujících buňkách, které metabolizují žlutou tetrazoliovou sůl MTT [3-(4,5 – dimethylthiazol – 2 – yl) – 2,5 – difenyl tetrazolium bromid] na fialový formazan. Formazan, vzhledem ke své nerozpustnosti ve vodném prostředí, tvoří krystaly, které se snadno rozpouštějí v organickém rozpouštědle, např. DMSO. Intenzita fialového zbarvení reakční směsi je přímo úměrná počtu živých, proliferujících buněk. Test je vyhodnocován měřením nárůstu absorbance a hodnota IC_{50} stanovena jako koncentrace, při níž dochází k poklesu živých buněk na 50 %. Tomu

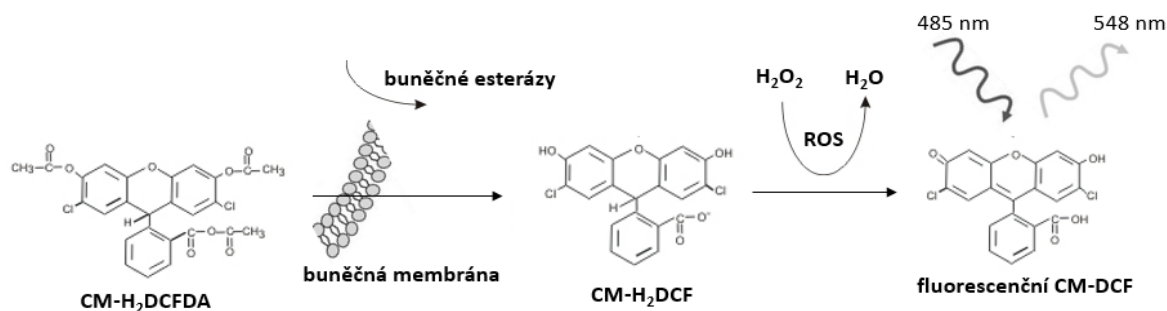
odpovídá koncentrace studované látky IC_{50} , kterou je možné vypočítat metodou nelineární regresní analýzy.

Objem buněčné suspenze odpovídající množství 10^4 buněk byl inkubován v 96-jamkových panelech v inkubátoru při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5% CO_2 24 h s čerstvým DMEM. Poté byla k buňkám přidána koloidní disperze studovaných nanočástic a buňky byly následně inkubovány dalších 24 h. Přidáním nanočástic do buněčné suspenze byly vytvořeny koncentrační gradienty v rozmezích $0 - 20\text{ mg.l}^{-1}$ v případě AgNPs a $0 - 30\ 000\text{ mg.l}^{-1}$ v případě nanočástic TiO_2 . Po inkubaci byly buňky promývány roztokem PBS. Poté bylo k buňkám přidáno 20 μl MTT (rozpuštěného v PBS) o koncentraci 20 mmol.l^{-1} a buňky byly inkubovány v inkubátoru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5% CO_2 další 3 h. Poté bylo PBS odstraněno a k buňkám bylo přidáno 100 μl DMSO s cílem rozpustit ve vodě nerozpustné krystaly formazanu. Suspenze v destičce byla promíchána a následně byla měřena absorbance s využitím multidetekčního destičkového spektrofotometru Synergy HT. Vyhodnocován byl nárůst absorbance při 570 nm, který je přímo úměrný metabolické aktivitě buněk, resp. intenzitě fialového zabarvení reakční směsi. Pro výpočet hodnoty IC_{50} byl využitý software Phototox 2.0.

7.6 Detekce reaktivních forem kyslíku

Pro detekci ROS byla použita fluorescenční sonda CM-H2DCFDA (5,6-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát), která je po vstupu do buňky přeměněna buněčnými esterázami na membránou nepropustný derivát CM-H2DCF. CM-H2DCF při reakci s ROS oxiduje na fluorescenční produkt CM-DCF (5,6-chloromethyl-2,7-dichlorofluorescein), který zůstává zachycen v buňce a intenzita jeho fluorescence je přímo úměrná vnitrobuněčné koncentraci ROS (obr. 16).

Objem buněčné suspenze odpovídající množství 10^4 buněk byl inkubován v 96-jamkových panelech v inkubátoru při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5% CO_2 24 h s čerstvým DMEM. Poté bylo růstové médium odstraněno a buňky propláchnuty roztokem PBS. Následně byla k buňkám přidána koloidní disperze studovaných nanočástic v koncentraci odpovídající stanovené hodnotě IC_{50} , příp. IC_{75} a IC_{25} , a současně i fluorescenční sonda CM-H2DCFDA v koncentraci $5\text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$ (naředěná v PBS). Po 30 min inkubaci bylo zahájeno monitorování produkce ROS po dobu 1 h s využitím excitační vlnové délky 485 nm a emisní vlnové délky 548 nm. Výsledky byly vyhodnocovány jako lineární regresní koeficienty odrážející lineární trend nárůstu koncentrace ROS v buňkách, který se projevil se nárůstem fluorescence.



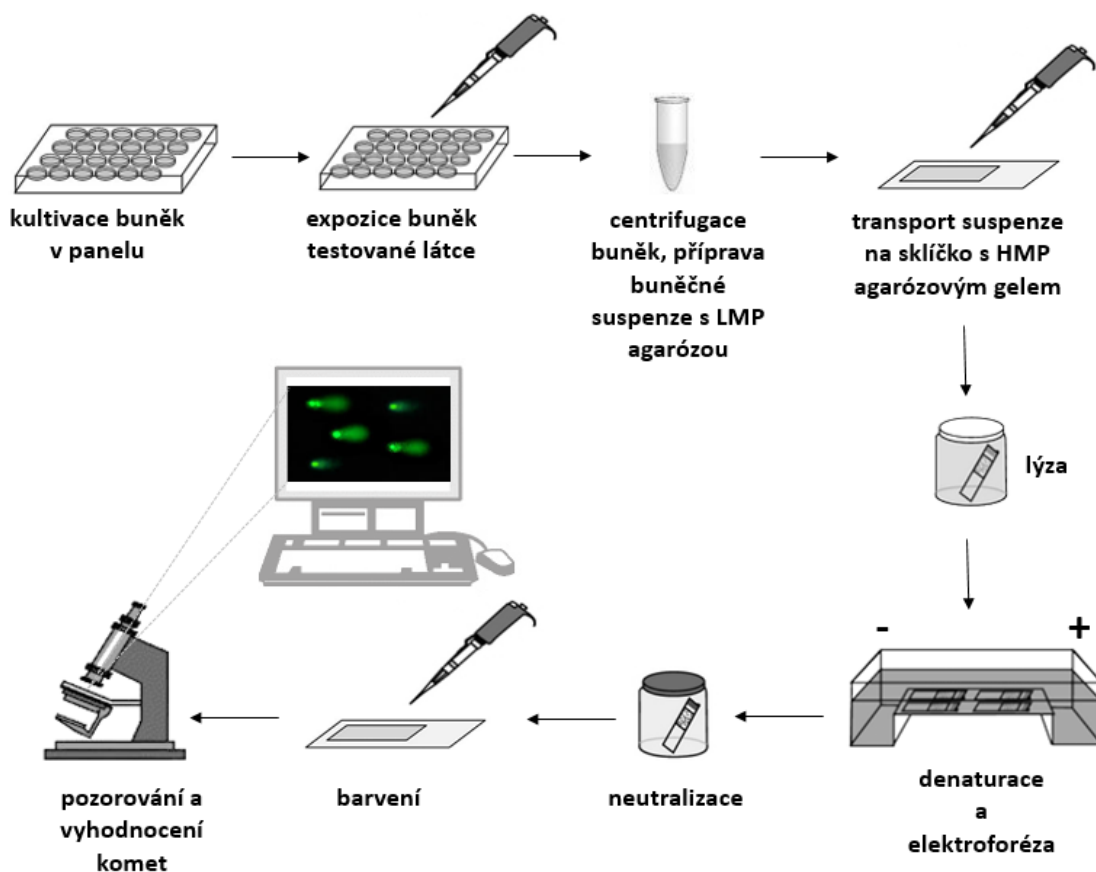
Obr. 16 Schematické znázornění přeměny sondy CM-H₂DCFDA na fluorescenční CM-DCF vlivem buněčných esteráz a reakci s ROS v buňce.

7.7 Kometový test

Pro hodnocení poškození DNA vlivem působení studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs byla použita metoda kometového testu. Kometový test, známý také jako gelová elektroforéza jednotlivých buněk (SCGE, *angl.* single cell gel electrophoresis) je nenáročná a citlivá technika pro detekci poškození DNA na úrovni jednotlivých buněk. Principem metody je odlišná migrace DNA a její fragmentů v elektrickém poli. Vzorek buněk je po inkubaci se studovanou látkou podroben působení lyzačního pufru, vlivem kterého dochází k odstranění membrány a většiny proteinů z buněk. Následně je vzorek denaturován v alkalickém prostředí, vlivem čeho dochází k rozvolnění struktury superhelixové DNA v gelu. Při elektroforetickém dělení migrují vzniklé fragmenty DNA ke kladné elektrodě. Po obarvení jsou v gelu vizualizovány typické komety, jejichž hlava (*angl.* head) je tvořena DNA a ohon (*angl.* tail) tvoří její fragmenty, vznikající jako důsledek poškození vlivem studované látky. Nejčastěji vyhodnocovaným parametrem je procentuální podíl DNA v hlavě komety nebo jejím ohonu (obr. 17).

Nejdříve byla připravena agarózová podložní skříčka. Mikroskopická podložná skříčka byla potažena 1% HMP agarózou (*angl.* high melting point, neboli s vysokým bodem tání) v destilované vodě a poté byla umístěna do sušárny, kde byla ponechána při teplotě 60 °C 30 min. Následně bylo aplikováno 85 μl 1% roztoku HMP agarózy v PBS a podložní skříčka byla pokryta krycími. Skříčka byla umístěna do mrazničky za účelem urychlení tvorby agarózového gelu. Objem buněčné suspenze odpovídající množství 10⁴ buněk byl inkubován ve 24-jamkových panelech v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂ 24 h. Následně byly buňky promývány roztokem PBS a k buňkám byla přidána koloidní disperze studovaných nanočástic v PBS v koncentraci odpovídající stanovené hodnotě IC₅₀, příp. IC₇₅ a IC₂₅. Po 6 hodinové inkubaci byly buňky trypsinizovány, promývány roztokem DMEM, přemístěny do centrifugační zkumavky a centrifugovány (6 min, 1000 rpm). K buněčné suspenzi bylo přidáno 85 μl 1%

LMP agarózy (*angl.* low melting point, neboli s nízkým bodem tání) a 85 μ l této směsi bylo po odstranění krycího sklíčka napipetováno na podložní sklíčko s agarózovým gelem. Sklíčka byla po ztuhnutí gelu umístěna do lyzačního pufru, který obsahoval 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris a 1% Triton X-100 (pH = 10) na 1 h při 4 °C. Následně byla sklíčka promývána destilovanou vodou a umístěna do elektroforetické vany obsahující elektrodotový pufr (300 mM NaOH a 1mM EDTA) na 40 minut. Následně byla provedena elektroforéza za podmínek 0,8 V.cm⁻¹ a 380 mA 20 min. Po ukončení elektroforézy byla sklíčka promývána 5 minut v neutralizačním pufru (0,4 M Tris, pH = 7.5) při 4 °C. DNA v gelu byla obarvena s využitím fluorescenčního barviva SYBR Green. Buňky byly pozorovány s využitím fluorescenčního mikroskopu. Pro vyhodnocení bylo náhodně vybráno 100 buněk z každého vzorku. K vyhodnocení byl využitý software Comet Score a pro prezentaci výsledků byly využívány vyhodnocené % DNA (Tománková et al., 2011).



Obr. 17 Schematické znázornění průběhu experimentu s využitím metody kometové analýzy.

7.8 Statistické zpracování

Prezentovaná data byla vyhodnocena ze tří na sobě nezávisle provedených experimentů. Data produkce ROS jsou prezentována jako průměry regresních koeficientů a byla

porovnávána s využitím metody ANOVA s Dunnettovými post hoc testy. U kometového testu byly mediány % DNA porovnávány s použitím Mann-Whitneyho U testu s Bonferroniho korekcí signifikance na násobné porovnání. Normalita dat byla ověřena Shapiro-Wilk testem. Pro statistickou analýzu dat byl použit software SPSS verze 22. Jako statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

7.9 Ramanova spektroskopie nanočástic, zobrazení buněk a buněčného příjmu nanočástic

Pro zobrazování buněk a Ramanovu spektroskopii studovaných nanočástic byl využíván konfokální Ramanův mikroskop CRM Alpha 300 R+ (WiTec) s excitačním laserem v zelené části spektra (Nd:YAG 532 nm, s maximálním výkonem ~25 mW dopadajícím na vzorek).

Ramanova spektra AgNPs a nanočástic TiO₂ byla měřena na křemenném sklíčku pro Ramanovu mikroskopii. Koloidní disperze o objemu několika μl byla napipetována na sklíčko, a po fokusaci laserového paprsku na povrch kapky bylo změřeno Ramanovo spektrum nanočástic v disperzi. Měření bylo prováděno s využitím integračního času v řádech sekund, při maximálním výkonu laserového svazku dopadajícího na vzorek (~10 mW).

Ke sběru Ramanova rozptylu pro zobrazení buněk byl využíván suchý objektiv Zeiss EC Epiplan-Neofluar 50x NA = 0,8, WD = 0,58 mm. Pro měření jednotlivých spekter studovaných nanočástic byl využíván suchý objektiv Zeiss EC Epiplan-Neofluar 20x, NA= 0,5, WD = 2,2 mm. Objem buněčné suspenze odpovídající množství 10^4 buněk byl inkubován v 6-jamkových kultivačních panelech v inkubátoru při teplotě 37C° a 5% CO₂ 24 h. K buněčné suspenzi byla na počátku kultivace přidána křemenná sklíčka pro Ramanovu mikroskopii, na jejichž povrch buňky během kultivace adherovaly. Následně byla k buňkám přidána koloidní disperze AgNPs nebo nanočástic TiO₂ odpovídající koncentraci IC₅₀ a buňky byly při výše zmíněných podmínkách inkubovány dalších 24 h. Po této inkubaci bylo růstové médium odstraněno a buňky byly třikrát promyty roztokem PBS. Následně byla provedena fixace buněk 4% roztokem formaldehydu, který byl napipetován na povrch sklíčka. Po 10 min byl fixační roztok odstraněn a křemenná sklíčka s fixovanými buňkami byla ponechána volně uschnout v laminárním boxu.

Pro zobrazení fixovaných buněk byl vzorek skenován laserovým svazkem kontinuálně, v rastru, a to v oblasti vzorku definované při jeho pozorování ve světelném poli. Počet pixelů byl charakterizován v softwarovém nastavení jako počet spekter změřených na μm . Tento počet byl zvolen v závislosti na teoretické hodnotě rozlišení použitého objektivu vyplývajícího z Rayleighova kritéria. Pro objektiv s NA = 0,8 a použitou vlnovou délku 532 nm, odpovídala teoretická hodnota rozlišení objektivu přibližně 400 nm, měření bylo tedy provedeno v mřížce o

vzdálenosti bodů 0.5 μm , co odpovídá měření dvou Ramanova spekter na μm . Ramanův rozptyl byl v každém pixelu měřen s integračním časem 0,25 nebo 0,5 s. Daná hodnota integračního času byla s ohledem na výsledky optimalizace zvolena za optimální pro zobrazení fixované buňky, nicméně, vzhledem k výskytu tepelné degradace buněk během skenování bylo měření prováděno při polovičním maximálním výkonu laseru.

Pro zpracování jednotlivých Ramanových spekter nanočástic i hyperspektrálních dat za účelem zobrazení buněk byl využíván program WiTec Project 2.10. Softwarová úprava Ramanova spekter zahrnovala odstranění artefaktů spekter způsobených částicemi kosmického záření, a případné vyhlazení pro prezentaci jednotlivých spekter. K zobrazení jednotlivých buněk a zobrazení nanočástic v buňkách byla využívána univariační metoda zobrazení. Postup zobrazení je popsán v konkrétních částech prezentace výsledků experimentální části práce.

8 Výsledky

Práce na experimentální části probíhala ve dvou časových obdobích. První experimenty se zaměřily na skupinu vzorků zahrnující 2 vzorky TiO₂ nanočástic označených TiO₂ a Nanorutil a 3 vzorků AgNPs KC Rulc 14, KC Rulc 20 a VINTR. Tyto byly studovány na buněčných liniích lidských keratinocytů SVK-14. Studované nanočástice byly charakterizovány metodou AFM a byly stanoveny hodnoty koncentrace IC₅₀, indukce produkce ROS a poškození DNA metodou kometového testu. V tomto období byla úspěšně zavedena a zoptimalizována metoda konfokální Ramanovy mikroskopie pro hodnocení buněčného příjmu nanočástic. Výsledky této práce jsou součástí spoluautorských publikací

- Bartoň Tománková, K., Jiravová J., **Harvanová M.**, Malina L., Soukupová J., Hradilová Š., Kejlová K., Malohlava J., Licman L., Dvořáková M., Jírová D., Kolářová H. (2015) Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles *in vitro*, *Food And Chemical Toxicology*, 85(-), 20-30

- Jiravová, J., Bartoň Tománková K., **Harvanová M.**, Hradilova S., Mašek V., Malohlava J., Malina L., Manišová B., Kejlová K., Jírová D., Kolářová H. (2014) Study of the penetration of silver nanoparticles into SVK14 cells. V: *Microscopy : advances in scientific research and education*. 6. Vyd. Badajoz, Spain: A. Méndez-Vilas, Ed., *Formatex*, 2014. 173-178

Druhou skupinu vzorků reprezentoval vzorek TiO₂ nanočástic Eusolex® T-AVO a 2 vzorky AgNPs KC Rulc S9 a KC Rulc S29, které byly studovány na buněčných liniích lidských fibroblastů BJ. Nanočástice byly charakterizovány metodou AFM, stanoveny byly hodnoty koncentrace IC₅₀, indukce produkce ROS a poškození DNA metodou kometového testu, a současně byl hodnocen buněčný příjem nanočástic metodou Ramanovy mikroskopie. Výsledky této práce jsou zahrnuty v prvoautorských a spoluautorských publikacích:

- **Perlovská Harvanová M.**, Malohlava J., Jiravová J., Bartoň Tománková K., Kolářová H. (2017) Raman imaging of cellular uptake and studies of silver nanoparticles effect in BJ human fibroblasts cell lines, *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1-2), ISSN 0378-5173

- **Harvanová M.**, Mašek V., Jírová D., Kolářová H. (2016) Raman label-free visualisation of TiO₂ nanoparticles in BJ cell lines, *Clinician and technology Journal*, 1(46), 25-28

- Kolářová H., Tománková K., **Harvanová M.**, Horáková J., Malohlava J., Cenklová V., Bajgar R., Kejlová K., Jírová D. (2015) Cell Uptake Of Titanium Dioxide Nanoparticles, V: *Int'l Conf.*

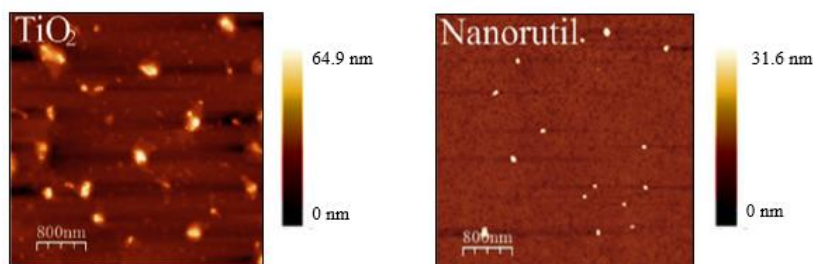
Součástí prezentovaných výsledků je i zobrazení a porovnání buněčného příjmu AgNPs připravených Tollensovou metodou na Přírodovědecké fakultě UPOL na buněčných liniích lidských keratinocytů SVK-14 a myších fibroblastů NIH3T3, které je součástí spoluautorské publikace

- Jiravová J., Bartoň Tománková K., **Harvanová M.**, Malina L., Malohlava J., Luhová L., Panáček A., Manišová B., Kolářová H. (2016) The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro, *Food And Chemical Toxicology*, 96, 50-61

8.1 Mikroskopická a spektroskopická charakterizace studovaných nanočástic

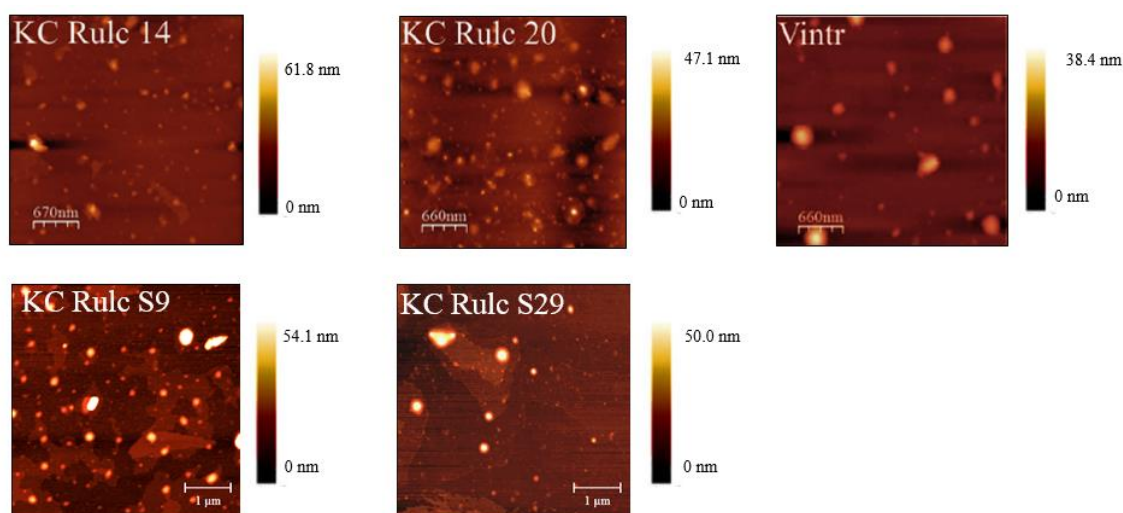
8.1.1 Zobrazení studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs metodou AFM

Metoda AFM umožnila studium morfologie studovaných vzorků nanočástic TiO₂ a AgNPs. Výsledky dvoudimenzionálního zobrazení nanočástic TiO₂ jsou shrnuty na obr. 18. Menší částice u vzorků nanočástic TiO₂ označené výrobcem jako TiO₂ a Nanorutil měli kulovitý tvar. Větší částice vytvářely shluky s nepravidelnou geometrickou strukturou. Výsledky AFM zobrazení studovaných nanočástic TiO₂ nezahrnují vzorek Eusolex® T-AVO. Ze vzorku nanočástic, který byl dodán v práškové formě, byla připravena disperze, v níž se i při mnohonásobném ředění vytvářely nepravidelné a rozměrné shluky komplikující zobrazení.



Obr. 18 Výsledky AFM zobrazení vzorků studovaných nanočástic TiO₂ s intenzitním znázorněním výšky scanu ve směru osy z. Zobrazení byla provedena v poklepovém režimu při rychlosti snímání 0.3 Hz a zpracována v programu WSxN 5.0. Develop 7.0 Image Browser s rozlišením 256 px.

Výsledky dvoudimenzionálního zobrazení AgNPs jsou shrnuty na obr. 19. Z hlediska morfologie byly v případě vzorků AgNPs získány obdobné výsledky. U všech vzorků AgNPs byly kromě kulovitých částic přítomny i větší shluky nanočástic s nepravidelnou geometrickou strukturou. Tyto shluky pravděpodobně odpovídají agregátům či aglomerátům, k jejichž vzniku mohlo docházet během skladování, či přípravy nanočástic.



Obr. 19 Výsledky AFM zobrazení vzorků studovaných AgNPs. Zobrazení byla provedena v pokleповém režimu při rychlosti snímání 0.3 Hz a zpracována v programu WSxN 5.0. Develop 7.0 Image Browser (KC Rulc 14, KC Rulc 20, Vintr) a Gwyddion 2.40 (S9 a S29) s rozlišením 256 px.

Hodnoty vertikální vzdálenosti z AFM měření byly využity k vyjádření velikosti nanočástic v studovaných vzorcích. Výsledky byly vyhodnoceny jako mediány hodnot velikosti částic v nm a jsou shrnuty v tab. 2. Pouze v případě vzorků nanočástic TiO₂ označených výrobcem jako TiO₂ a Nanorutil byla v informacích od výrobce uvedena jejich velikost, a to 28 nm v případě vzorku TiO₂ a 128 nm v případě vzorku Nanorutil. Z naměřených hodnot byl stanoven medián velikosti nanočástic ve vzorku TiO₂ 20,8 nm; v případě vzorku Nanorutil 22,9 nm. I navzdory tomu, že částice ve vzorku TiO₂ by dle výrobce měli být menší, výsledky AFM potvrdily opačný výsledek. Ten pravděpodobně souvisí s příměsí stabilizačních látek SiO₂ a Al₂O₃ v přípravku Nanorutil, které zamezili agregaci nanočástic v disperzi, jejíž koncentrace byla v porovnání se vzorkem TiO₂ dvakrát vyšší.

U vzorků AgNPs chyběly údaje o velikosti částic, proto výsledky získané z měření AFM nemůžou být porovnány s výrobcem deklarovanou velikostí. Vzorky KC Rulc 14 a KC

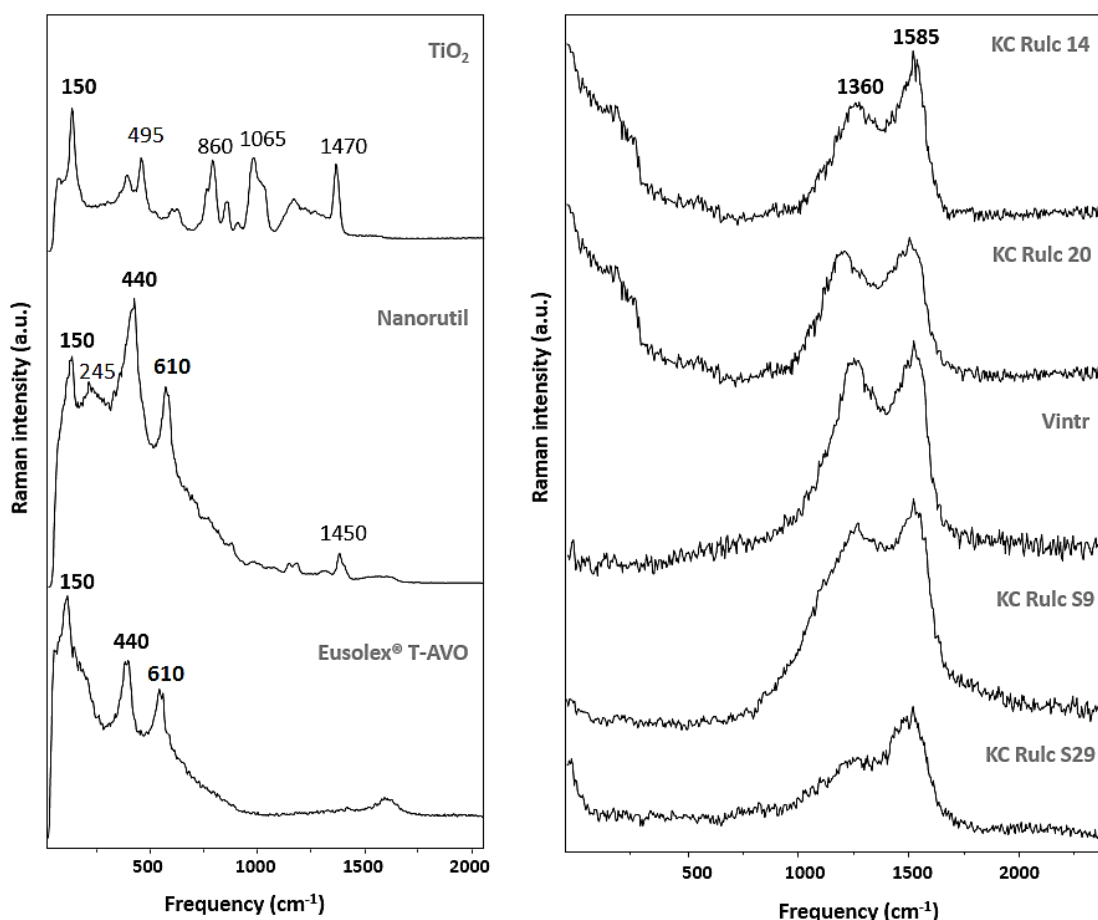
Rulc 20 od stejného výrobce se lišily pouze koncentrací nanočástic v disperzích, která byla 14 mg.l⁻¹ a 20 mg.l⁻¹ ve druhém případě. Přípravky obsahovaly stříbro a ultračistou vodu, bez příměsí stabilizačních látek. Z výsledků je možné diskutovat předpoklad, že ve vzorku s vyšší koncentrací nanočástic je pravděpodobnost tvorby agregátů, resp. aglomerátů vyšší, než ve vzorku s nižší koncentrací. Medián velikosti částic ve vzorku KC Rulc 20 se od vzorku KC Rulc 14 lišil o více než 100 %. Na druhou stranu, ve vzorku Vintr, jehož koncentrace by dle údajů od výrobce měla být mezi vzorky AgNPs nejvyšší, a to 40 mg.l⁻¹, byla stanovena nejnižší hodnota mediánu velikosti částic. Je ale důležité zmínit, že od výrobce chybí údaje o stabilizaci nanočástic v disperzi, která by mohla tento výsledek významně ovlivnit. Částice posledních dvou vzorků AgNPs KC Rulc S9 a KC Rulc S29 se ve velikosti odlišovaly téměř o 50 %. Disperze měly stejnou výchozí koncentraci 20 mg.l⁻¹, nicméně, vzájemně se lišily v mezikroku při elektrolytické přípravě nanočástic, který zahrnoval odlišné způsoby míchání. Výrobní postup není, vzhledem k přání výrobce, nijak komentován. Přípravky obsahovaly stříbro a ultračistou vodu, bez příměsí stabilizačních látek. Na základě uvedeného je možné vyhodnotit, že odlišný postup při výrobě nanočástic mohl ovlivnit agregaci, resp. aglomeraci v konečném výrobním produktu.

Tab. 2 Přehled výsledků hodnot mediánů velikosti stanovených z údajů o vertikální vzdálenosti získaných během AFM zobrazení pro jednotlivé studované nanočástice TiO₂ a AgNPs. Ke zpracování byl využitý program Nanoscope Analysis.

Nanočástice TiO ₂	
Vzorek	Medián velikosti
TiO ₂	20,8 nm
Nanorutil	22,9 nm
AgNPs	
Vzorek	Medián velikosti
KC Rulc 14	10,2 nm
KC Rulc 20	24,4 nm
Vintr	9,9 nm
KC Rulc S9	30,6 nm
KC Rulc S29	20,4 nm

8.1.2 Ramanova spektroskopie studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs

Specifické vibrační spektroskopické vlastnosti studovaných nanočástic byly důležité pro jejich detekci v buňkách metodou Ramanovy mikroskopie při zobrazení buněčného příjmu. Jednotlivá Ramanova spektra s vyznačením nejintenzivnějších vibračních pásů jsou znázorněna na obr. 20. Přítomnost odlišných vibračních pásů v Ramanově spektru prvního vzorku nanočástic TiO₂ souvisí s jinou krystalovou modifikací TiO₂. Porovnáním s literaturou bylo zjištěno, že zmíněné nanočástice TiO₂ odpovídají krystalové modifikaci anatasu. V případě vzorků Nanorutil a Eusolex® T-AVO Ramanova spektra odpovídají modifikaci rutilu (Burgio & Clark, 2001; Hardcastle, 2011). Nejintenzivnější vibrační pás v Ramanově spektru anatasu při ~150 cm⁻¹ souvisí s deformační vibrací vazby O-Ti-O. Podobně, vibrační pásy v Ramanově spektrech rutilu při ~150 cm⁻¹ a ~440 cm⁻¹ odpovídají deformačním vibracím vazeb O-Ti-O. Literatura dále popisuje symetrickou valenční vibraci vazeb O-Ti-O při ~610 cm⁻¹ (Zhang et al., 2013).

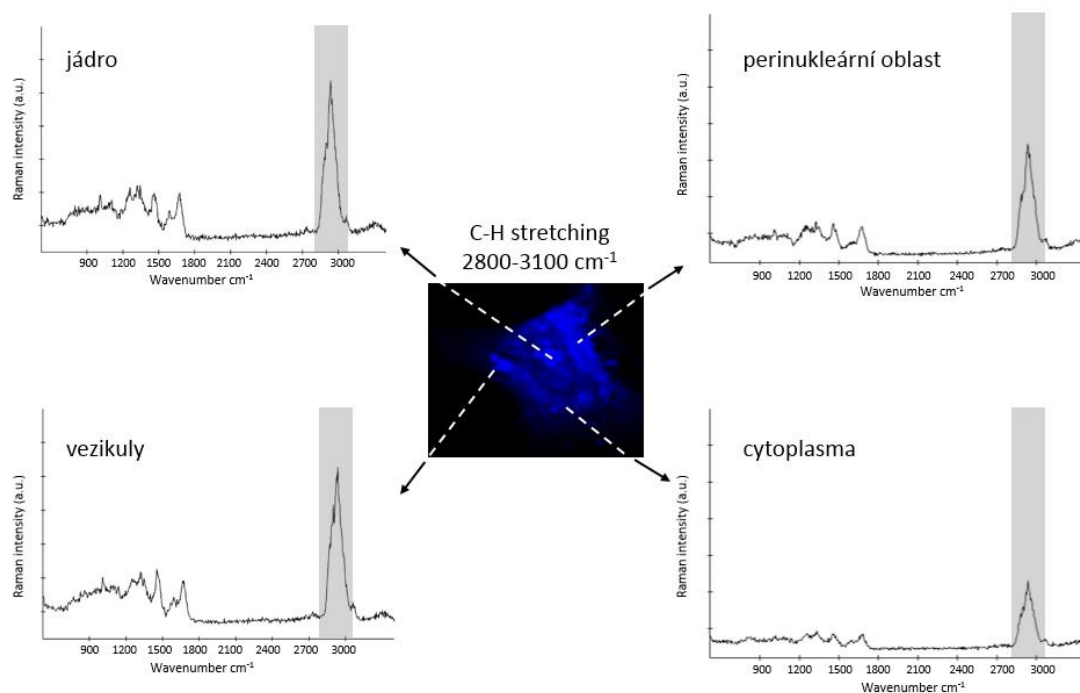


Obr. 20 Ramanova spektra koloidních disperzí studovaných nanočástic TiO₂ (TiO₂, Nanorutil a Eusolex® T-AVO) a AgNPs (KC Rulc 14, KC Rulc 20, Vintr, KC Rulc S9 a KC Rulc S29) s vyznačením nejintenzivnějších vibračních pásů.

Ramanova spektra všech studovaných AgNPs obsahují široký viditelný vibrační pás v oblasti $\sim 1250\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ s maximy při $\sim 1360\text{ cm}^{-1}$ a $\sim 1585\text{ cm}^{-1}$. Původ vibrace se zřetelem na skutečnost, že výklad Ramanova jevu souvisí s excitací molekuly anebo indukci dipólového momentu v molekule, není jasný. AgNPs jako shluky atomů stříbra se v Ramanově spektroskopii používají zejména při metodě povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS, *angl.* surface enhanced Raman spectroscopy), kde je využíváno jevu zesílení intenzity Ramanova rozptylu studovaných molekul adsorbovaných na zdrsňený povrch kovu. Výše zmíněná vibrace je ve spojitosti s vibracemi vodních disperzí AgNPs a v konjugátech s biomolekulami popisována i v dostupné literatuře (Naja et al. 2007; Kora & Arunachalam, 2012).

8.2 Ramanova mikroskopie buněčného příjmu nanočástic

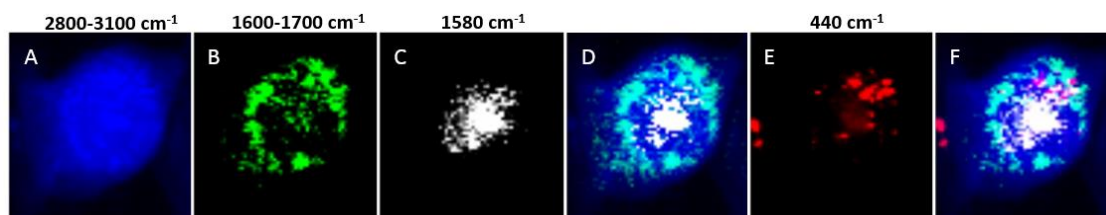
Ramanovo spektrum buňky je vibračním spektrem obsahujícím příspěvky skupinových vibrací lipidů, fosfolipidů, nukleových kyselin a proteinů – základních stavebních jednotek buňky. Jednotlivé vibrace biomolekul v Ramanově spektrech buňky byly popsány v kapitole 4.4 teoretické části práce. Jednoduchou metodou analýzy hyperspektrálního datového souboru, která umožňuje zobrazení na základě intenzity jednotlivých vibrací, je univariační metoda. Tato metoda zobrazení zpracovává individuálně každé spektrum v datovém souboru na základě analýzy jedné proměnné, kterou je intenzita vybraného vibračního pásu. Zobrazením je pseudo-barevná intenzitní mapa, která demonstruje rozdíly v jednotlivých bodech, kterým odpovídají jednotlivá Ramanova spektra. Pro zobrazení buňky je neoptimálnější volba vibračního pásu odpovídajícího valenční vibraci vazby C-H v rozmezí $\sim 2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, s maximem při $\sim 2935\text{ cm}^{-1}$ (Scalfi-Haap et al., 2007). Obecně, intenzita vibrace je přímo úměrná kvantitě entity, resp. skupiny, která je jejím původcem. Univariační zobrazení buňky při výběru vibračního pásu odpovídajícího valenční vibraci vazby C-H odráží odlišnosti v hustotě biomolekul zastoupených v různých oblastech buňky a umožňuje zejména diskriminaci jádra a oblastí membránových organel v perinukleární oblasti (obr. 21).



Obr. 21 Demonstrace rozdílů intenzity C-H vibrace v Ramanových spektrech z různých částí buňky. Univariační zobrazení fixované buňky SVK-14 při $\sim 2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ a jednotlivá Ramanova spektra.

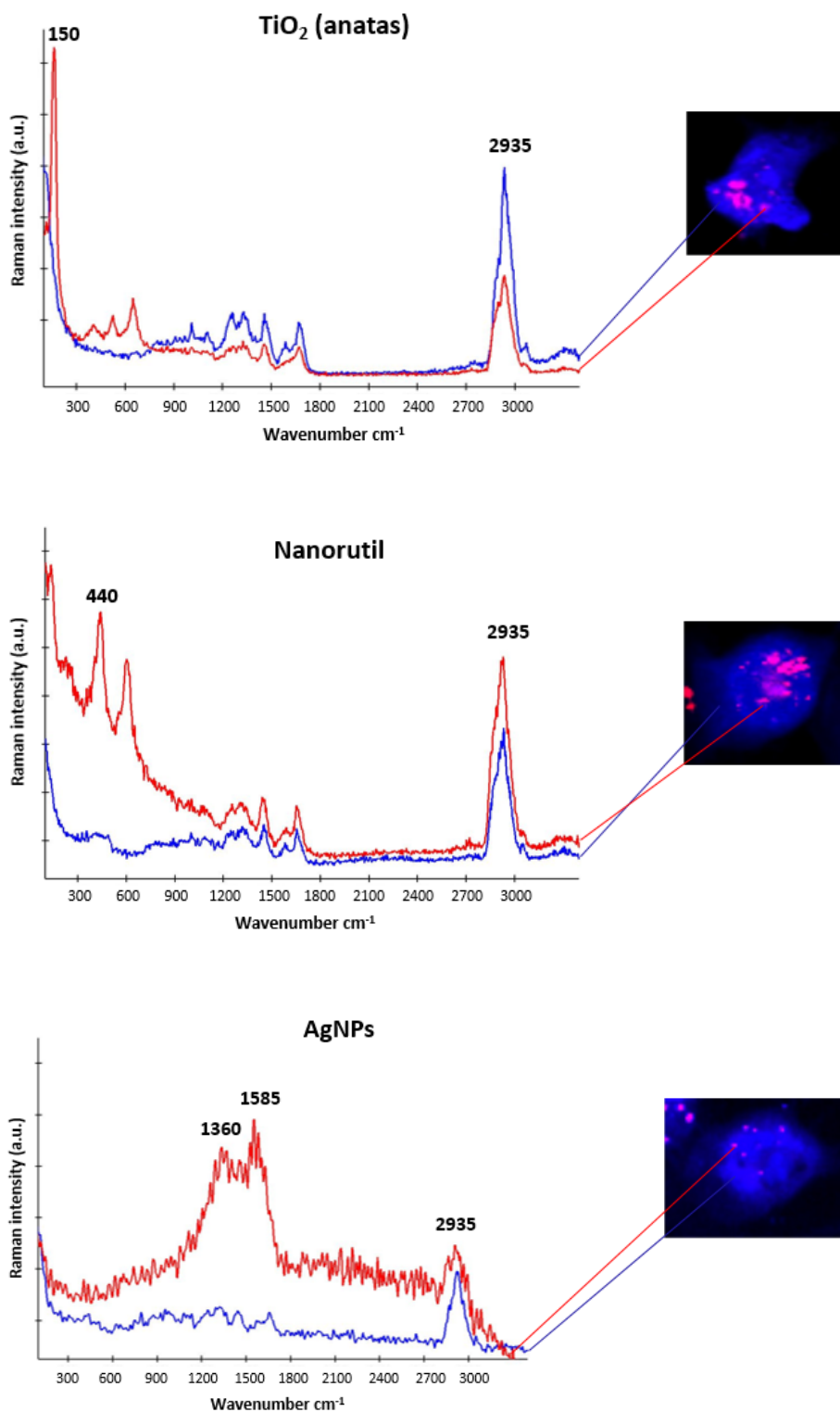
Výše zmíněná frekvence odpovídající vibracím C-H vazeb v biomolekulách může být nahrazena vibracemi typickými pro nukleové kyseliny (např. 785 cm^{-1} resp. 1580 cm^{-1} odpovídající vibracím pyrimidinových, resp. purinových bází) nebo proteiny (1310 cm^{-1} , resp. 1655 cm^{-1} odpovídající vibracím v amidové vazbě). Překrytí monochromatických intenzitních map obsahujících nejintenzivnější pixely jednotlivých vibrací nabízí detailnější pohled na strukturu vnitrobuněčného prostředí (obr. 22A-D).

Konfokální Ramanova mikroskopie v kombinaci s univariační metodou zobrazení umožnila studium buněčného příjmu studovaných nanočástic TiO_2 a AgNPs ve fixovaných buňkách s minimálními nároky na přípravu vzorku a následné zpracování dat. Předpokladem zobrazení exogenní částice v buněčném prostředí metodou Ramanovy mikroskopie jsou dostatečně odlišné spektroskopické vlastnosti projevující se v jejím Ramanově spektru. Na rozdíl od většiny exogenních látek, které jsou předmětem zájmu (např. léčiv), jejichž molekulární struktura bývá vesměs prezentována vazbami vyskytujícími se ve struktuře biomolekul, Ramanova spektra studovaných nanočástic TiO_2 a AgNPs obsahují specifické vibrační pásy, které nejsou charakteristické pro biomolekuly (viz. kap. 7.1.2). To umožňuje jejich diskriminaci od buněčného prostředí. Ramanovo spektrum buňky z oblasti výskytu nanočástic kromě vibrací vazeb v biomolekulách reprezentují i specifické vibrace nanočástic.



Obr. 22 Univariační zobrazení fixované buňky SVK-14 při $\sim 2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ odpovídající valenční vibraci vazby C-H (A); $\sim 1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ s maximem při 1655 cm^{-1} odpovídající vibraci amidové vazby (B); $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$ odpovídající vibraci purinových bazí v nukleových kyselinách (C); překrytí zobrazení A, B a C (D); $\sim 440\text{ cm}^{-1}$ odpovídající deformační vibraci vazby O-Ti-O ve vzorku Nanorutil (E); překrytí zobrazení v D a E (F) k vizualizaci buněčného příjmu nanočástic TiO_2 .

Zobrazení nanočástic v buňkách pro potvrzení jejich buněčného příjmu metodou univariační analýzy spočívá v zobrazení intenzity vibračního pásu specifického pro nanočástice, který se projevuje v Ramanově spektru buňky. Obr. 22E je zobrazením nanočástic TiO_2 ve vzorku Nanorutil v buňce vytvořeném při výběru vibračního pásu $\sim 440\text{ cm}^{-1}$ odpovídajícím deformační vibraci vazby O-Ti-O. Překrytím se zobrazením buňky s jednotlivými kompartmenty (obr. 22F) je vizualizace buněčného příjmu studovaných nanočástic. V případě Ramanových spekter vzorků nanočástic TiO_2 (v modifikaci anatas i rutil) leží jejich vibrační pásy mimo oblast frekvence, v níž se vyskytují vibrace biomolekul, tj. mimo oblast frekvence $\sim 600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$. Nicméně, vibrační pásy v Ramanově spektrech vodních disperzí AgNPs leží přímo v oblasti vibračních pásů biomolekul. Univariační zobrazení v oblasti frekvence typické pro vibrace nukleových kyselin nebo proteinů by tak neposkytovalo výsledky zobrazení související s jejich distribucí v buněčném prostředí, nýbrž by kolidovalo s oblastmi s výskytem AgNPs. I z toho důvodu jsou výsledky Ramanova zobrazení buněčného příjmu nanočástic prezentována jako kombinace zobrazení buňky při volbě vibračního pásu odpovídajícího valenční vibraci vazby C-H a vibračního pásu specifického pro jednotlivé vzorky nanočástic. Na obr. 23 je demonstrováno zobrazení buněčného příjmu studovaných nanočástic TiO_2 (v modifikaci anatas a rutil) a AgNPs spolu s příkladem spekter z oblastí s výskytem a bez výskytu nanočástic. Výsledky zobrazení buněčného příjmu u jednotlivých vzorků nanočástic jsou zahrnuty mezi výsledky studia jejich cytotoxicity a genotoxicity v kapitolách 8.3 a 8.4.



Obr. 23 Ramanova spektra z oblasti s výskytem (červená) a bez výskytu nanočástic (modrá) se zobrazením překrytí univariačních zobrazení při výběru vibračního pásu odpovídajícímu vibraci vazby C-H ~2800-3100 cm⁻¹, s maximem při ~2935 cm⁻¹ a vibračních pásů odpovídajících vibracím nanočástic: ~150 cm⁻¹ (vzorek TiO₂ – anatase), ~440 cm⁻¹ (vzorek Nanorutil a Eusolex® T-AVO) a 1250-1650 cm⁻¹ (AgNPs).

8.3 Hodnocení cytotoxicity, genotoxicity a buněčného příjmu studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs na buněčné linii lidských keratinocytů SVK-14

Hodnoty *koncentrace IC₅₀* u studovaných vzorků nanočástic TiO₂ a AgNPs byly stanovovány s využitím MTT testu na buněčných liniích lidských keratinocytů SVK-14, které byly následně využívány v experimentech pro stanovení produkce ROS, kometovém testu a při vizualizaci buněčného příjmu metodou Ramanovy mikroskopie. Hodnota IC₅₀ byla důležitá z pohledu volby koncentrace nanočástic, které byly buňky v experimentech exponovány. Stanovené hodnoty IC₅₀ shrnuje tab. 3.

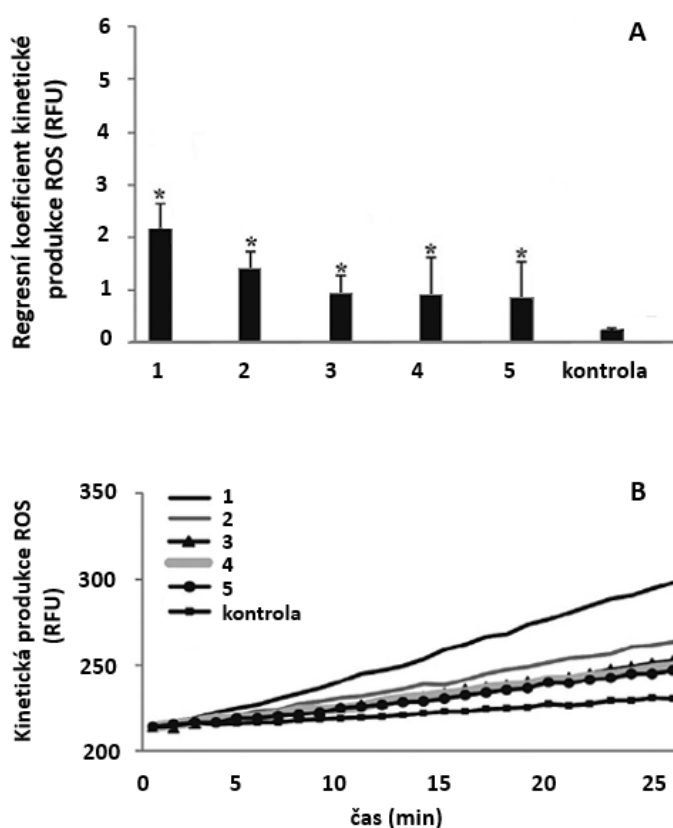
Tab. 3 Hodnoty IC₅₀ studovaných vzorků nanočástic TiO₂ a AgNPs stanovených MTT testem na buněčné linii lidských keratinocytů SVK-14. K vyhodnocení byl využitý program Phototox 2.0.

Nanočástice TiO ₂	
Vzorek	Hodnota IC ₅₀ (mg.l ⁻¹)
TiO ₂	1744,1
Nanorutil	508,6
AgNPs	
Vzorek	Hodnota IC ₅₀ (mg.l ⁻¹)
KC Rulc 14	2,7
KC Rulc 20	2,1
Vintr	2,2

Obecně je vztahu mezi cytotoxicitou nanočástic a jejich velikostí připisována nepřímá úměra. Z toho vyplývá, že čím menší je velikost studovaných nanočástic, tím větší je jejich cytotoxicita, a tím nižší koncentrace odpovídá poklesu životnosti buněk na 50 %. Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s vyšší schopností menších částic blokovat transportní kanály a negativně ovlivňovat biochemické procesy v buňce (Tománková et al., 2015). Studované vzorky nanočástic na buněčných liniích SVK-14 poukázaly na významný rozdíl mezi hodnotami IC₅₀ u nanočástic TiO₂ v porovnání s AgNPs. Nicméně, s ohledem na hodnoty mediánů velikostí studovaných nanočástic stanovené metodou AFM (tab. 2), nelze výše zmíněný trend závislosti cytotoxicity na velikosti částic potvrdit. Nebyly totiž stanoveny významné rozdíly mezi velikostí studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs.

Produkce ROS byla stanovena s využitím sondy CM-H₂DCFDA, která spolehlivě indikuje tvorbu ROS (H₂O₂, hydroxylový radikál – HO•, peroxylový radikál – ROO•, kyselina

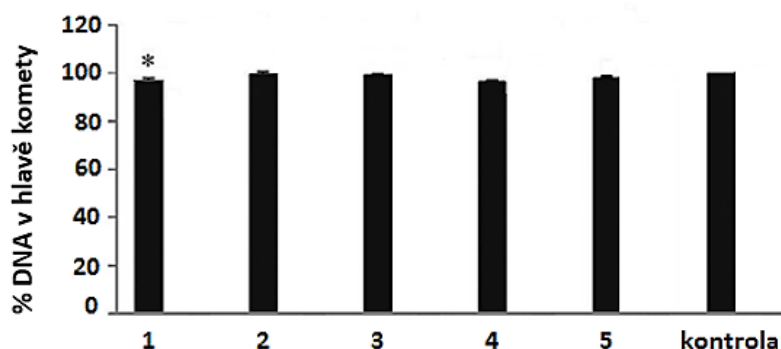
chlorná HOCl), v jejichž přítomnosti reaguje na fluorescenční CM-DCF detekovaný při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 548 nm. Výsledky kinetické produkce ROS (obr. 24) poukazují na významný vliv studovaných nanočástic TiO₂ i AgNPs v koncentraci IC₅₀ na studované buněčné linie SVK-14. V porovnání s kontrolní skupinou se významnější indukce produkce ROS projevila u vzorků nanočástic TiO₂. V případě prvního studovaného vzorku označeného výrobcem jako TiO₂ byl zaznamenán více než desetinásobný, v případě vzorku Nanorutil přibližně šestinásobný nárůst hladiny ROS v porovnání s kontrolou. Mezi jednotlivými vzorky studovaných AgNPs v koncentraci IC₅₀ nebyly pozorovány žádné významnější rozdíly v indukci produkce ROS.



Obr. 24 Kinetická produkce ROS indukovaná působením studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs v koncentraci IC₅₀/100 u buněčné linie SVK-14. Data reprezentují průměr a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých měření. Vyjádření lineárních regresních koeficientů produkce ROS monitorované po dobu 60 minut (A). Znázornění lineárního trendu nárůstu ROS (B). Statisticky významný nárůst ROS v porovnání s kontrolou je v grafu vyznačen hvězdičkou (*).

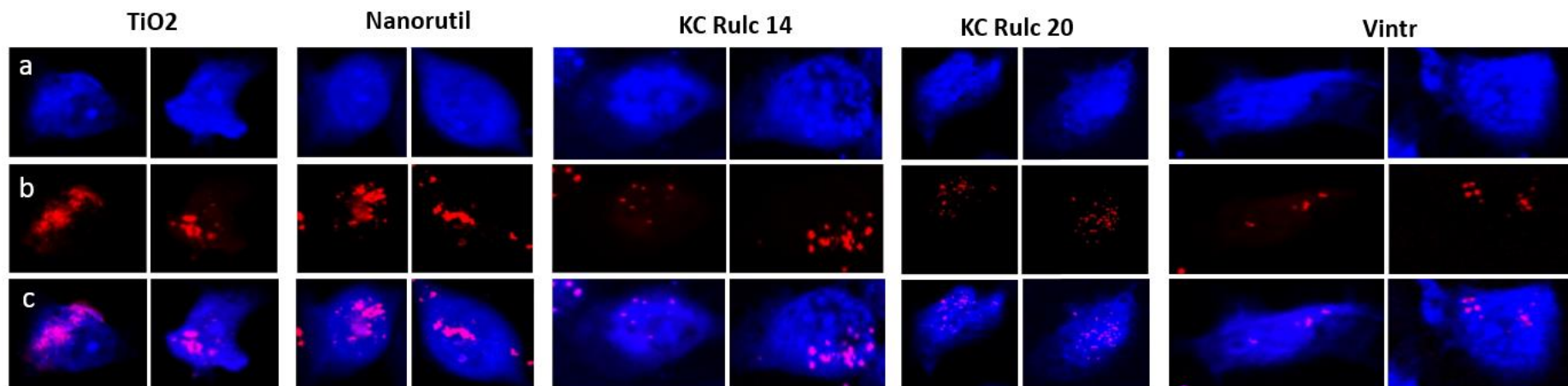
Vzorek 1 (TiO₂), Vzorek 2 (Nanorutil), Vzorek 3 (KC Rulc 14), Vzorek 4 (KC Rulc 20), Vzorek 5 (Vintr).

Kometový test byl využitý k posouzení genotoxického potenciálu studovaných vzorků nanočástic TiO₂ a AgNPs. Fragmentace DNA u jednotlivých buněk se ve výsledku testu projevila poklesem % DNA v hlavě komety. Výsledky reprezentují % DNA v hlavě komet vyhodnocované jako mediány ze 100 náhodně vybraných buněk exponovaných jednotlivým vzorkům studovaných nanočástic (obr. 25). Expozice buněk buněčné linie SVK-14 měla za následek fragmentaci DNA buněk, nicméně ani u jednoho vzorku nebyla vyhodnocena vyšší než 10% fragmentace DNA.



Obr. 25 Procento DNA v hlavě komety stanovené s využitím metody kometového testu u buněk buněčných linií SVK-14 exponovaných studovaným nanočásticím TiO₂ a AgNPs v koncentraci IC₅₀/100. Data reprezentují mediány a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých měření. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou jsou v grafu vyznačeny hvězdičkou (*). Vzorek 1 (TiO₂), Vzorek 2 (Nanorutil), Vzorek 3 (KC Rulc 14), Vzorek 4 (KC Rulc 20), Vzorek 5 (Vintr).

Výsledky vizualizace buněčného příjmu nanočástic TiO₂ a AgNPs metodou Ramanovy mikroskopie shrnuje obr. 27. Specifické vibrace nanočástic projevující se v jednotlivých Ramanových spektrech (kap. 7.1) umožnily diskriminaci oblastí jejich výskytu v cytoplasmě. V kombinaci s univariální metodou analýzy byl metodou Ramanovy mikroskopie potvrzen předpoklad buněčného příjmu studovaných nanočástic. Ze zobrazení je patrná signifikantnější aglomerace nanočástic TiO₂ ve vzorcích TiO₂ a Nanorutil v porovnání se vzorky studovaných AgNPs. Aglomerace nanočástic TiO₂ by mohla souviset se signifikantně nižší hodnotou cytotoxicity v porovnání s AgNPs, která byla stanovena. To potvrzuje předpoklad nepřímo úměrné závislosti cytotoxicity nanočástic na jejich velikosti.



Obr. 26 Výsledky univariačního zobrazení buněčného příjmu studovaných nanočástic TiO_2 a AgNPs v buňkách linie lidských keratinocytů SVK-14 po 24h inkubaci při koncentraci IC_{50} metodou Ramanovy mikroskopie. a. Univariační zobrazení buňky při volbě intenzity vibrace C-H vazby při $\sim 2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$; b. Univariační zobrazení nanočástic při volbě intenzity vibračního pásu při $\sim 440\text{ cm}^{-1}$ (TiO_2 a Nanorutil) a $1250\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ (KC Rulc 14, KC Rulc 20 a VINTR); c. Překrytí zobrazení v a. a b.

8.4 Hodnocení cytotoxicity, genotoxicity a buněčného příjmu studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs na buněčné linii lidských fibroblastů BJ

Výsledky koncentrace IC₅₀ studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs stanovené na buněčných liniích lidských fibroblastů BJ jsou shrnuty v tab.4. Souhlasně s předchozí sérií vzorků, i v tomto případě byla vyhodnocena vyšší hodnota koncentrace IC₅₀ pro nanočástice TiO₂ Eusolex® T-AVO, a to až o několik řádů. Vzhledem k vysoké koncentraci, která komplikovala přípravu vzorku i vyhodnocení experimentů, bylo v případě koncentrace vzorku nanočástic Eusolex® T-AVO v experimentech pro stanovení produkce ROS, kometovém testu i vizualizaci buněčného příjmu metodou Ramanovy mikroskopie využito stonásobného ředění.

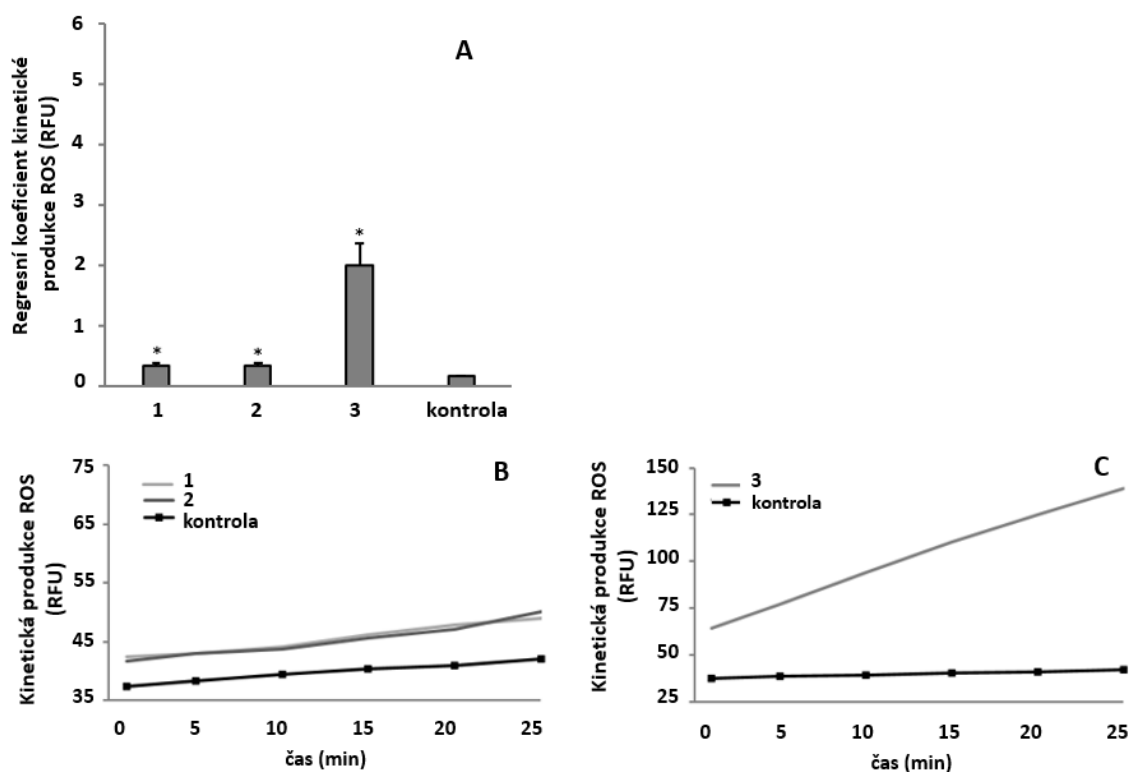
Tab. 4 Hodnoty IC₅₀ studovaných vzorků nanočástic TiO₂ a AgNPs stanovených MTT testem na buněčné linii lidských fibroblastů BJ. K vyhodnocení byl využitý program Phototox 2.0.

Nanočástice TiO ₂	
Vzorek	Hodnota IC ₅₀ (mg.l ⁻¹)
Eusolex® T-AVO	27746
AgNPs	
Vzorek	Hodnota IC ₅₀ (mg.l ⁻¹)
KC Rulc S9	4,8
KC Rulc S29	4,4

Výsledky kinetické produkce ROS u buněk buněčné linie BJ jsou znázorněny na obr. 27. Vlivem působení studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs v koncentraci IC₅₀ na buňky buněčných linií BJ došlo k signifikantnímu nárůstu produkce ROS. V případě nanočástic TiO₂ ve vzorku Eusolex® T-AVO je možné vyhodnotit více než desetinásobný nárůst hladiny ROS, a tak, souhlasně s předchozí studovanou skupinou nanočástic, vyhodnotit významnější indukci produkce ROS působením nanočástic TiO₂.

Vzorkům AgNPs KC Rulc S9 a KC Rulc S29 byla věnována větší pozornost. Zmíněné nanočástice byly připraveny stejnou metodou – elektrolyticky, vzorek byl odebrán z disperzí se shodnou koncentrací AgNPs – 20 mg.l⁻¹. Jediným rozdílem mezi disperzemi byl mezikrok v přípravě nanočástic, odpovídající odlišnému způsobu míchání při elektrolytické přípravě. Cílem bylo ověřit, zda tato varianta v postupu přípravy ovlivnila také vlastnosti připravených AgNPs. Jak je patrné z výsledků prezentovaných na obr. 28, v koncentracích AgNPs odpovídajících IC₂₅, IC₅₀ a IC₇₅ se mezi jednotlivými vzorky projevil pouze nepatrný rozdíl

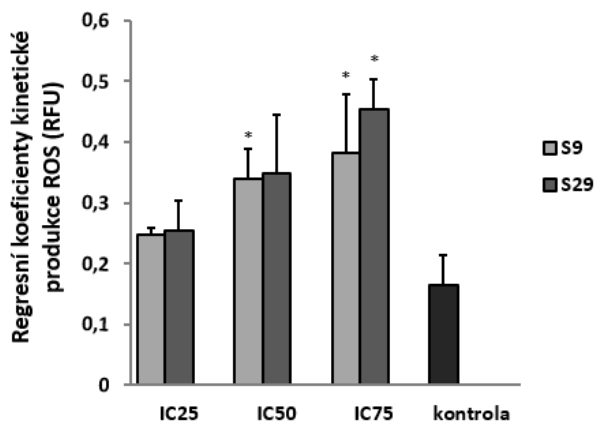
v indukcii produkce ROS. Vyšší hladina ROS byla detekována po expozici buněk vzorku KC Rulc S29 a produkce ROS narůstala s narůstající koncentrací AgNPs.



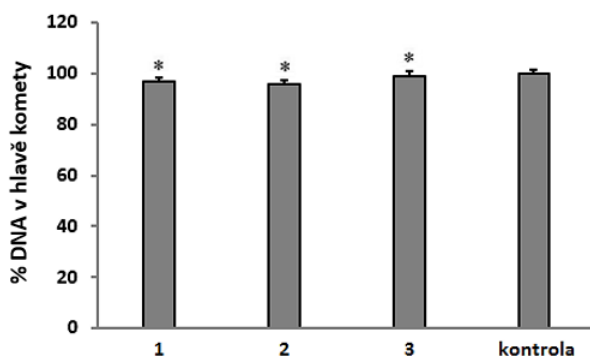
Obr. 27 Kinetická produkce ROS indukovaná působením studovaných AgNPs a nanočástic TiO₂ v koncentraci IC₅₀ u buněčné linie BJ. Data reprezentují průměr a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých měření. Vyjádření lineárních regresních koeficientů produkce ROS monitorované po dobu 60 minut (A). Znázornění lineárního trendu nárůstu ROS u vzorků AgNPs (B) a vzorku nanočástic TiO₂ (C). Statisticky významný nárůst ROS v porovnání s kontrolou je v grafu vyznačen hvězdičkou (*).

Vzorek 1 (KC Rulc S9), Vzorek 2 (KC Rulc S29), Vzorek 3 (Eusolex® T-AVO).

Výsledky *kometového testu* poukázaly na genotoxický potenciál studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs. Expozice buněk buněčné linie BJ měla za následek fragmentaci DNA buněk. Ani u jednoho vzorku však nebyla vyhodnocena vyšší než 10% fragmentace DNA (obr. 29) Porovnání výsledků pro vzorky AgNPs KC Rulc S9 a KC Rulc S29 ani v případě kometového testu nepoukázalo na významnější rozdíly (obr. 30).

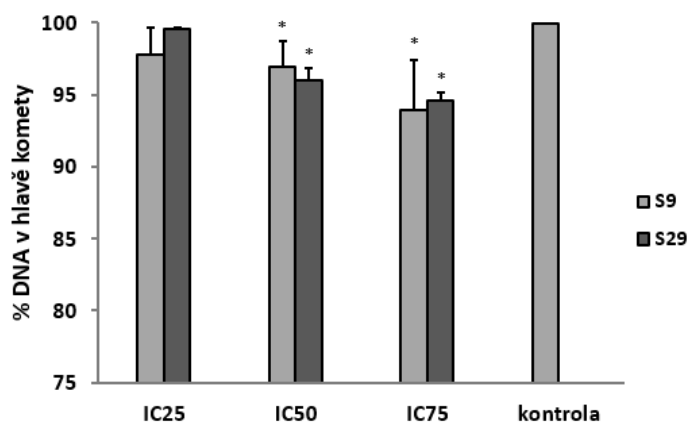


Obr. 28 Kinetická produkce ROS indukovaná působením studovaných AgNPs v koncentraci IC₂₅, IC₅₀ a IC₇₅ u buněčné linie BJ. Data reprezentují průměr a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých měření. Data jsou vyjádřena jako lineární regresní koeficienty produkce ROS monitorované po dobu 60 minut. Statisticky významný nárůst ROS v porovnání s kontrolou je v grafu vyznačen hvězdičkou (*).



Obr. 29 Procento DNA v hlavě komety stanovené s využitím metody kometového testu u buněk buněčných linií BJ exponovaných studovaným AgNPs v koncentraci IC₅₀ a nanočásticím TiO₂ v koncentraci IC₅₀. Data reprezentují mediány a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých měření. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou jsou v grafu vyznačeny hvězdičkou (*).

Vzorek 1 (KC Rulc S9), Vzorek 2 (KC Rulc S29), Vzorek 3 (Eusolex® T-AVO).

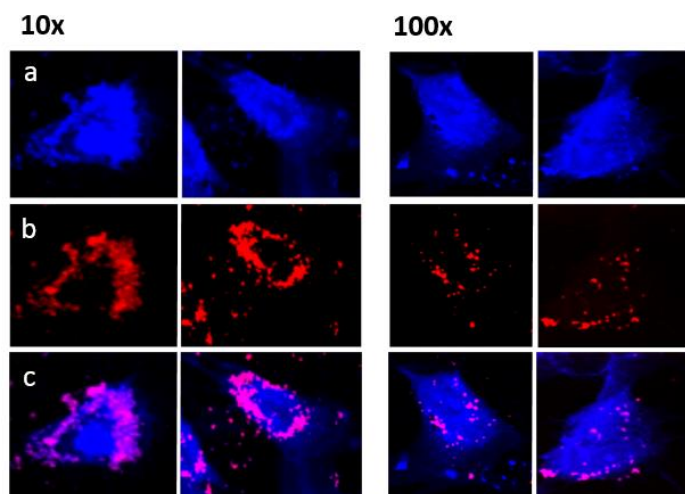


Obr. 30 Procento DNA v hlavě komety stanovené s využitím metody kometového testu u buněk buněčných linií BJ exponovaných studovaným AgNPs v koncentraci IC₂₅, IC₅₀ a IC₇₅ u buněčné linie BJ. Data reprezentují mediány a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých měření. Statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou jsou v grafu vyznačeny hvězdičkou (*).

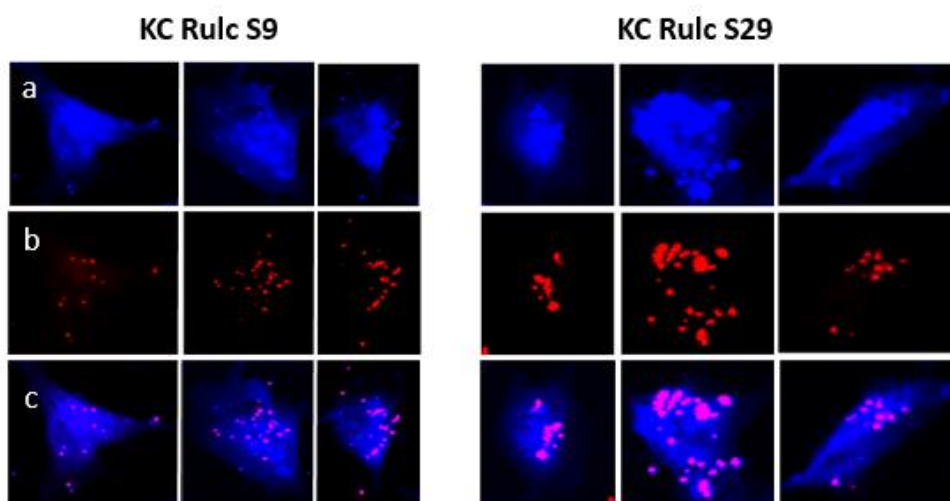
Vyhodnocení vizualizace buněčného příjmu nanočástic metodou Ramanovy mikroskopie poskytlo obdobné výsledky jako v případě předchozí skupiny vzorků. Byl potvrzen předpoklad penetrace studovaných nanočástic TiO₂ a AgNPs do buněk. Současně se u vzorku nanočástic TiO₂ Eusolex® T-AVO projevila signifikantnější aglomerace nanočástic, než v případě studovaných AgNPs. Buněčný příjem nanočástic TiO₂ byl studován při desetinásobně, a následně při stonásobně nižší koncentraci IC₅₀. Výsledky poukázaly na to, že při vyšší koncentraci nanočástic je agregace v buňkách signifikantnější (obr. 31). I v tomto případě lze uvažovat, že vysoká hodnota koncentrace IC₅₀ a s ní související nižší cytotoxicita v porovnání s AgNPs může souviset s aglomerací nanočástic, ke které pravděpodobně dochází během transportu přes buněčnou membránu. Pravděpodobně povrchové vlastnosti nanočástic TiO₂ jsou důvodem vyšší vzájemné afinity částic a jejich větší tendence shlukovat se během buněčného transportu. Je možné uvažovat, že právě tato skutečnost se může odrážet v nízké cytotoxicitě nanočástic TiO₂.

Vizualizace buněčného příjmu pro vzorky AgNPs KC Rulc S9 a KC Rulc S29 (obr. 32) poukazuje na odlišné chování nanočástic v buňkách. Jak již bylo zmíněno, dodané disperze obsahovaly stejnou koncentraci AgNPs v ultračisté vodě bez příměsí stabilizačních látek. Jediným rozdílem mezi vzorky AgNPs byl mezikrok v elektrolytické přípravě částic zahrnující odlišný způsob míchání. Výsledky Ramanovy spektroskopie nanočástic nepoukázaly na odlišné vlastnosti nanočástic, ani ve výsledcích měření produkce ROS a kometového testu nebyly vyhodnoceny významné odlišnosti v jejich působení. Výsledky vizualizace buněčného příjmu nanočástic však poukázaly na odlišnou aglomeraci studovaných vzorků AgNPs v cytoplasmě. Modifikace v postupu přípravy mohla ovlivnit povrchové vlastnosti vzorku AgNPs, které mohli

mít za následek odlišnou afinitu nanočástic k buněčné membráně nebo odlišnou vzájemnou afinitu nanočástic.



Obr. 31 Výsledky univariačního zobrazení buněčného příjmu studovaných nanočástic TiO₂ Eusolex® T-AVO v buňkách linie lidských fibroblastů BJ po 24h inkubaci metodou Ramanovy mikroskopie. Koncentrace nanočástic odpovídaly deseti- (10x) a stonásobně (100x) nižší koncentraci IC₅₀. a. Univariační zobrazení buňky při volbě intenzity vibrace C-H vazby při ~2800-3100 cm⁻¹; b. Univariační zobrazení nanočástic při volbě intenzity vibračního pásu ~455 cm⁻¹; c. Překrytí zobrazení v a. a b.

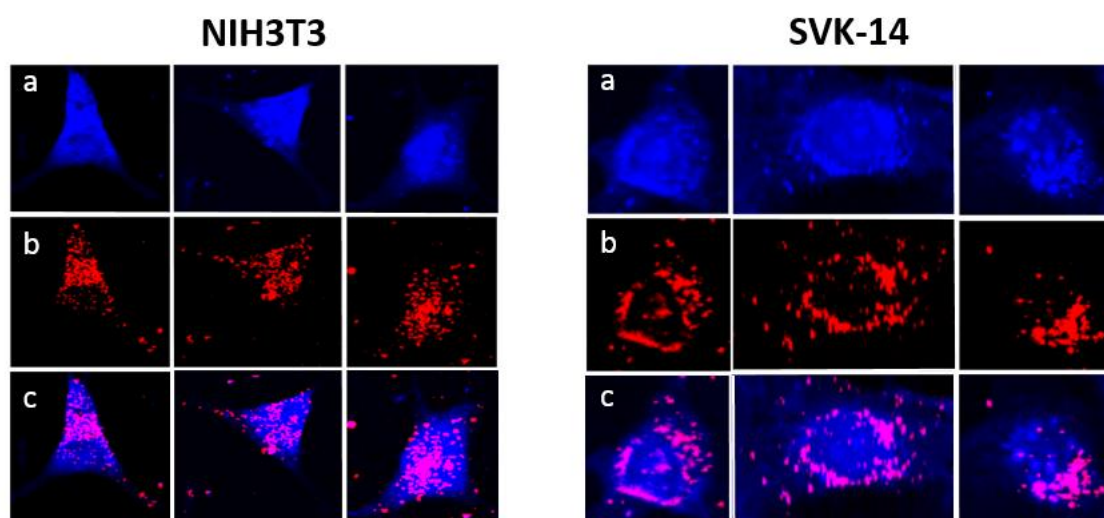


Obr. 32 Výsledky univariačního zobrazení buněčného příjmu studovaných AgNPs KC Rulc S9 a KC Rulc S29 v buňkách linie lidských fibroblastů BJ po 24h inkubaci při koncentraci IC₅₀ metodou Ramanovy mikroskopie. a. Univariační zobrazení buňky při volbě intenzity vibrace C-H vazby při ~2800-3100 cm⁻¹; b. Univariační zobrazení nanočástic při volbě intenzity vibračního pásu 1250-1650 cm⁻¹; c. Překrytí zobrazení v a. a b.

8.5 Vyhodnocení buněčného příjmu AgNPs u buněčných linií SVK-14 a NIH3T3

Součástí experimentální práce bylo také zhodnocení buněčného příjmu AgNPs připravených Tollensovou metodou na Přírodovědecké fakultě UPOL u buněk buněčných linií SVK-14 a NIH3T3. Výsledky zobrazení buněčného příjmu jsou prezentovány na obr. 33.

Studované nanočástice měly průměr 27 nm a byla stanovena mnohem vyšší hodnota cytotoxicity v porovnání s předchozími studovanými AgNPs – 55,6 mg.l⁻¹ u buněčné linie SVK-14 a 46,9 mg.l⁻¹ u buněčné linie NIH3T3. V cytoplasmě buněk obou buněčných linií byly, vzhledem k vysoké koncentraci IC₅₀ využitě v experimentech při expozici buněk, detekovány početné shluky nanočástic.



Obr. 33 Výsledky univariačního zobrazení buněčného příjmu studovaných AgNPs v buňkách linie lidských keratinocytů SVK-14 a myších fibroblastů NIH3T3 po 24h inkubaci při koncentraci IC₅₀ metodou Ramanovy mikroskopie. a. Univariační zobrazení buňky při volbě intenzity vibrace C-H vazby při ~2935 cm⁻¹; b. Univariační zobrazení nanočástic při volbě intenzity vibračního pásu 1250-1650 cm⁻¹; c. Překrytí zobrazení v a. a b.

Z výsledků zobrazení je patrné, že se AgNPs u buněk SVK-14 akumulovali zejména v perinukleární oblasti, kde vytvářely větší shluky. V případě buněk NIH3T3 byly vizualizovány menší shluky v cytoplasmě, ale také v oblastech jádra. Výsledky zobrazení korespondovaly s publikovanými výsledky, které poukázaly na vyšší cytotoxický a genotoxický potenciál studovaných AgNPs na buňky buněčné linie NIH3T3 (Jiravová et al., 2016).

9 Diskuze

Výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic jsou důvodem jejich častého využití v různých produktech, od přípravků pro povrchové úpravy materiálů až po aplikace v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Otázka bezpečnosti a potenciálních rizik spojených s užíváním nanočástic je aktuální a široce rozebírána v oblasti vlivu na prostředí i na lidské zdraví. Využití nanomateriálů v kosmetických přípravcích, které jsou určeny pro přímý kontakt s organismem, otevírá diskusi o jejich potenciálním zdravotním riziku spojeném se schopností pronikat do buněk a způsobit negativní metabolické změny a poškození DNA. Nanočástice vstupují do organismu různými dráhami, které jsou specifikovány typem expozice organismu nanočásticím. Jedná se o příjem dýchacím systémem, perorální nebo kožní cestou. V souvislosti s kosmetickými přípravky určenými pro přímou aplikaci na kůži, je tedy relevantní diskuze o vstupu nanočástic do organismu kůží. Ačkoliv pokožka představuje účinnou bariéru pro vstup exogenních látek do hlubších vrstev kůže a snižuje potenciál jejich absorpce a systémových toxických projevů, riziko se značně zvyšuje s aplikací na poraněnou nebo poškozenou pokožku.

Nanočástice TiO_2 patří do skupiny nanočástic vyráběných ve velkém měřítku a jejich aplikaci v kosmetických produktech reprezentují zejména opalovací přípravky, v nichž je využíváno výhodných optických vlastností souvisejících s filtrací UV záření. Výsledky studií cytotoxicity nanočástic TiO_2 prezentují signifikantní negativní, na koncentraci závislý vliv na životnost buněk u studovaných buněčných linií, avšak tento efekt byl pozorován až při koncentraci studovaných nanočástic TiO_2 v násobcích stovek $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Současně, výsledky poukazují na signifikantní produkci ROS indukovanou nanočásticemi TiO_2 v růstovém médiu (Hamzeh & Sunahara, 2013; Jugan et al, 2011). Bylo prokázáno, že produkce ROS indukovaná působením nanočástic TiO_2 má vliv na integritu DNA (Bhattacharya et al., 2009). Výsledky studií genotoxicity s využitím kometového testu se shodují na tom, že nanočástice TiO_2 mají vliv na poškození DNA u buněk různých buněčných linií (Bernardeschi et al., 2010; Botelho et al., 2013; Demir et al., 2013). V této práci prezentované výsledky studia cytotoxicity a genotoxicity nanočástic TiO_2 poskytly s výše zmíněnými poznatky souhlasné informace. Stanovené hodnoty koncentrace IC_{50} MTT testem u studovaných nanočástic TiO_2 naznačují, že k negativnímu ovlivnění proliferace a buněčného metabolismu docházelo až při koncentracích odpovídajících stovkám $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Indukce produkce ROS při koncentraci IC_{50} byla v porovnání s kontrolou signifikantní u všech studovaných vzorků nanočástic TiO_2 a nárůst produkce ROS byl statisticky významný. Rovněž bylo prokázáno, že studované nanočástice TiO_2 způsobují poškození DNA, nicméně, prezentované výsledky neprokazují více než 10% fragmentaci DNA v buňkách. Tento výsledek je shodný s vyhodnocením kometového testu pro studované AgNPs, co je překvapivé vzhledem k tomu, že u nanočástic TiO_2 byl stanoven několikanásobně vyšší

nárůst produkce ROS než v případě AgNPs, a dalo by se předpokládat, že zvýšená indukce produkce ROS se bude odrážet i v poškození DNA. Z uvedeného je možné předpokládat, že nanočástice TiO₂ sice indukují produkci ROS a způsobují poškození DNA buněk, nicméně, zmíněné projevy spolu pravděpodobně nesouvisí a produkce ROS není hlavní příčinou buněčné smrti exponovaných buněk. Studium buněčného příjmu nanočástic TiO₂ potvrdilo předpoklad jejich penetrace přes buněčnou membránu u všech tří studovaných vzorků. Vizualizace nanočástic v buňkách metodou konfokální Ramanovy mikroskopie poukázala na jejich značnou aglomeraci, ke které docházelo pravděpodobně v růstovém médiu a na buněčné membráně. Presentovaná zobrazení buněčného příjmu nanočástic TiO₂ jsou vizualizací aglomerátů nanočástic na buněčné membráně a v cytoplasmě, a pravděpodobně souvisí s různými fázemi intracelulární dráhy nanočástic v průběhu RME. Značná aglomerace nanočástic TiO₂ může mít souvis s povrchovými vlastnostmi částic a jejich vzájemnou afinitou, a to i navzdory stabilizaci nanočástic, která dle výrobců byla provedena u vzorků Nanorutil a Eusolex® T-AVO. Je možné pracovat s hypotézou, že zvyšující se koncentrace nanočástic přispívá k jejich signifikantnější aglomeraci v růstovém médiu, na buněčné membráně i v cytoplasmě a teprve větší aglomeráty jsou příčinou poškození buněk, při kterém mohou mechanicky působit na membrány buněčných kompartment. To by mohlo souviset s vysokými hodnotami IC₅₀.

Zobrazení v případě buněčného příjmu vzorku Nanorutil v buňkách SVK-14 naznačuje, že by nanočástice TiO₂ mohly být distribuovány do jádra, výsledky zobrazení však nekorrespondují s výsledky kometového testu, který neprokázal signifikantnější poškození DNA v porovnání se vzorkem TiO₂ nebo Eusolex® T-AVO. Na druhou stranu, byly publikovány výsledky mikroskopické studie, podle které nanočástice TiO₂ o velikosti 20-80 nm mohou být transportovány komplexem nukleárních pórů (Ahlander et al., 2013), což bylo u nanočástic TiO₂ potvrzeno metodou Ramanovy mikroskopie i TEM.

TiO₂ je oxidem titanu, v přírodě se běžně vyskytujícím ve dvou krystalických formách – rutil a vzácnější anatas. Charakterizace studovaných vzorků nanočástic s využitím metody Ramanovy spektroskopie poukázala na výskyt obou krystalových modifikací mezi studovanými vzorky nanočástic TiO₂. Bylo prokázáno, že cytotoxické působení krystalové formy anatasu je vyšší v porovnání s formou rutilu (Kakinoki et al., 2004; Sayes et al., 2006). O této skutečnosti je možné diskutovat i v této práci. Vzorek označený výrobcem jako TiO₂ v krystalové formě anatasu indukoval u buněk buněčných linií lidských keratinocytů SVK-14 vyšší nárůst tvorby ROS než vzorek Nanorutil (v krystalové formě rutilu). Podobně, v případě kometového testu byl v případě vzorku TiO₂ v porovnání s relevantní kontrolou vyhodnocen statisticky významný pokles % DNA v hlavě komety, zatímco v případě vzorku Nanorutil nikoliv. Presentované výsledky se však týkají pouze dvou vzorků, a pro relevantnost porovnání by bylo potřebné hodnotit a porovnávat reprezentativnější počet vzorků.

Nanočástice TiO₂ jsou klasifikovány v rámci skupiny látek potenciálně karcinogenních pro člověka (skupina 2B). Poznatky o cytotoxicitě a genotoxicitě nanočástic TiO₂ jsou důležitým faktorem majícím vliv na hodnocení rizik souvisejících s jejich použitím. Experimentální výsledky publikované v této práci doplňují poznatky související s hodnocením toxicity nanočástic TiO₂, a zároveň nabízejí náměty k dalšímu studiu. Ačkoliv cíl zhodnotit cytotoxický a genotoxický potenciál studovaných nanočástic TiO₂ byl splněn, k diskuzi se nabízí i možnost vlivu technologického postupu a příměsí při zpracování nanočástic v kosmetickém přípravku. Použité složky soustavy při výrobě kosmetického přípravku, ingredience typu konzervantů nebo barviv, to všechno může mít vliv na povrchové vlastnosti nanočástic a ovlivnit jejich buněčný příjem a další intracelulární osud a vliv na metabolismus buněk.

Větší pozornost byla v práci věnována vzorkům AgNPs, které byly součástí přípravků určených na přímé upotřebení k aplikaci na kůži. Všechny studované vzorky byly disperzemi AgNPs v ultračisté vodě neobsahujícími konzervanty ani jiné příměsí. Výsledky poukázaly na riziko související s aplikací přípravku na kůži, jelikož buněčný příjem, signifikantní indukce produkce ROS a poškození DNA byly prezentovány u všech studovaných vzorků AgNPs na buňkách buněčných linií SVK-14 i BJ. Cytotoxické působení AgNPs související s produkcí ROS bylo prezentováno v různých studiích. Množství publikovaných prací diskutuje o oxidativním stresu jako o hlavní příčině smrti buněk exponovaných AgNPs (Carlson et al., 2008; Johnston et al. 2010; Kim et al., 2011; Volker et al., 2013). Ty se opírají o výsledky různých *in vitro* studií, jenž poukazují na značný pokles životnosti buněk vlivem AgNPs. Buněčný příjem AgNPs a jejich distribuce v cytoplasmě může mít za následek narušení metabolismu mitochondrií a poškození DNA (AshaRani et al., 2009; Sahu et al., 2014). Kometový test využitý pro stanovení poškození DNA vlivem AgNPs v studovaných vzorcích poukázal na fragmentaci DNA u buněk buněčných linií SVK-14 i BJ ($\leq 10\%$). I když mechanismus poškození DNA působením AgNPs není zcela vysvětlen, dle publikovaných zdrojů souvisí poškození struktury nukleové kyseliny s její přímou nebo nepřímou interakcí s nanočásticemi (Asare et al., 2012). Principem nepřímé interakce je působení ROS indukovaných vlivem AgNPs a Ag⁺ iontů v cytoplasmě, které jsou hlavním zdrojem spontánního poškození struktury DNA (Beer et al., 2012). Nestabilita DNA souvisí s vytvářením mutagenních struktur vlivem reakce s vysoce reaktivním hydroxylovým radikálem OH[•]. Vznikající 8-hydroxyadenin a 8-hydroxyguanin indukují nestabilitu repetitivních sekvencí v DNA (AshaRani et al., 2009). Předpokladem přímé interakce nanočástice s DNA je její nukleární transport. Nukleární póry jsou komplexem membránových kanálů, které umožňují pasivní a aktivní transport molekul. U nanočástic je předpokládána schopnost difúze nukleárním komplexem pórů při jejich průměru menším než 10 nm (Barua & Mitragotri, 2014), nicméně, nukleární příjem byl prokázán i u větších nanočástic. AshaRani et al. (2009) studovali buněčný příjem a distribuci AgNPs v buňkách linií plicních fibroblastů o průměrech blízkých 20 nm

metodou TEM. Výsledky poukázali na přítomnost nanočástic na buněčné membráně a v cytoplasmě, nicméně také na jaderné membráně a v jádře. Na druhou stranu, studie Grulich et al. (2011), zaměřená na zobrazení buněčného příjmu a distribuce AgNPs o průměru 80 nm s využitím fluorescenční mikroskopie a mikroskopie fázového kontrastu, jaderný příjem nepotvrdila. AgNPs byly vizualizovány v perinukleárních oblastech buněk. Podobné výsledky prezentují i Butler et al. (2015) ve studii buněčného příjmu AgNPs o průměrech 20-100 nm. Aglomeráty AgNPs byly detekovány v oblastech odpovídajících buněčné membráně a vezikulám v cytoplasmě. Vizualizace buněčného příjmu AgNPs v této práci potvrdila buněčný příjem nanočástic, které byly lokalizovány v oblastech odpovídajících buněčné membráně a cytoplasmě v perinukleární oblasti. Metodou AFM stanovený medián velikosti částic v disperzích AgNPs odpovídal rozmezí 10,2-30,6 nm. Porovnáním s výsledky výše uvedených studií by tedy mohla být možnost jejich jaderného příjmu a přímé interakce s DNA brána v úvahu. Nicméně, ze zobrazení buněčného příjmu metodou konfokální Ramanovy mikroskopie, nebyly aglomeráty AgNPs v jádrech buněk linií SVK-14 a BJ zobrazeny a detekované poškození DNA je možné uvažovat v souvislosti s oxidativním stresem vlivem indukce produkce ROS.

Jiná situace však byla popsána u vzorku AgNPs připraveného na Přírodovědecké fakultě UPOL. Zobrazení a porovnání buněčného příjmu u buněk buněčných linií lidských keratinocytů SVK-14 a myších fibroblastů NIH3T3 metodou konfokální Ramanovy mikroskopie bylo součástí studie cytotoxického a genotoxického potenciálu studovaných AgNPs o průměru 27 nm (Jiravová et al., 2016). Výsledky zobrazení buněčného příjmu u buněk buněčných linií SVK-14 poukázaly na výskyt AgNPs zejména v perinukleární oblasti, kde nanočástice vytvářely větší shluky. Na druhou stranu, u buněk buněčné linie NIH3T3 byly vizualizovány menší shluky AgNPs v oblastech cytoplasmy a jádra. Jaderný příjem AgNPs by mohl souviset s vyšším genotoxickým potenciálem, který byl prezentován na základě vyhodnocení kometového testu.

Bylo prokázáno, že kinetika buněčného příjmu i intracelulární dráha nanočástic může být ovlivněna typem buněčných linií použitých v experimentu (Yurong et al., 2008), a to konkrétně i u AgNPs (AshaRani et al., 2009; Bartłomiejczyk et al., 2013). I metoda přípravy může ovlivnit chování nanočástic a jejich vzájemnou afinitu, či interakce s transportéry nebo membránovými strukturami. Modifikace metody přípravy u AgNPs KC Rulc S9 a KC Rulc S29 neměla zásadní vliv na cytotoxický a genotoxický potenciál nanočástic, nicméně, odlišnosti se projeví na buněčné úrovni různou úrovní aglomerace AgNPs. Jestli tento jev může významně ovlivnit vliv nanočástic na buněčný metabolismus nebo jejich zpracování a exocytotické vyloučení, není na základě provedených experimentů možné vyhodnotit. Avšak, vedle ovlivnění příjmu a intracelulárního chování typem buněčných linií a velikostí nanočástic je možné uvažovat také vliv výrobních podmínek na povrchové vlastnosti nanočástic a jejich aglomeraci nejen v disperzích, ale také na buněčné úrovni.

Studia buněčného příjmu a distribuce nanočástic v buněčném prostředí využívají zejména tradiční mikroskopické techniky reprezentované fluorescenční mikroskopií a TEM. Fluorescenční mikroskopie umožňuje vizualizaci nanočástic v buňkách, nicméně, nanočástice musí být konjugovány s fluorescenční značkou, příp. fluorescence musí být jejich přirozenou schopností. Bylo navíc prokázáno, že nanočástice mohou fluorescenční značku uvolňovat do cytoplasmy, a tím přispívat k falešné pozitivě výsledků zobrazení (Salvati et al., 2011; Win et al., 2005). TEM patří k nejpoužívanějším mikroskopickým metodám pro zobrazení buněk, studia buněčných kompartment a distribuce exogenních látek, jako jsou nanočástice v buňkách. Nicméně, metoda se vyznačuje náročnou přípravou vzorku a sofistikovanými přístupy pro odlišení oblastí nanočástic od cytoplasmy (Ahlinger et al., 2013). Poslední dvě dekády zaznamenaly významný pokrok v rozvoji a možnostech využití metody Ramanovy mikroskopie pro studium buněk a procesů na buněčné úrovni. Po představení možností zobrazení buněk a buněčných kompartment (např. Krafft et al., 2005; Matthäus et al., 2007; Uzunbajakava et al., 2003 B) a zobrazení distribuce léčiv (např. Harada et al., 2008; Ling et al. 2002) je konfokální Ramanova mikroskopie v poslední dekádě pořád častěji prezentovaným nástrojem zobrazení nanočástic v buňkách. Na rozdíl od jiných mikroskopických technik nabízí Ramanova mikroskopie výhody spočívající v minimálních nárocích na přípravu vzorku a absenci nutnosti využití externího značení. Metoda byla úspěšně využita pro zobrazení buněčného příjmu a lokalizaci různých nanomateriálů, jako jsou uhlíkové nanotrubičky, lipidové nanonosiče léčiv, polystyrenové, zlaté nanočástice nebo nanočástice TiO_2 či $\text{FeO}(\text{OH})$ (Ahlinger et al., 2013; Dorney et al., 2012; Chernenko et al., 2009; Lamprecht et al., 2012; Shah et al., 2011). Byly publikovány práce zahrnující lokalizaci AgNPs po jejich buněčném příjmu např. s využitím fluorescenční mikroskopie, mikroskopie fázového kontrastu (Greulich et al., 2011) a TEM (Butler et al., 2014). Využití konfokální Ramanovy mikroskopie pro zobrazení buněčného příjmu a distribuce AgNPs v této práci představuje zcela nový přístup.

Univariační metoda analýzy obrazu založená na vizualizaci hodnoty jediné proměnné, kterou je intenzita zvolené vibrace, umožnila rychlou a nenáročnou vizualizaci buněk a buněčného příjmu nanočástic. Univariační zobrazení buněk umožnilo především diskriminaci jádra a perinukleárních oblastí s výskytem membránových organel, jako jsou endoplasmatické retikulum či mitochondrie, a to na základě odlišné intenzity vibrace vazby C-H. Přítomnost intenzivních specifických vibračních pásů nanočástic projevujících se v Ramanových spektrech buněk byla předpokladem jejich úspěšného odlišení od lipid-proteinového prostředí buňky. Studované nanočástice byly lokalizovány na plasmatické membráně buňky, v cytoplasmě, na membráně jádra nebo v jádře. Detailnější pohled na organizaci buněčného prostředí a lokalizaci nanočástic v buňkách nabízí multivariační metody zobrazení, jejichž využití reprezentují i výše zmíněné studie. Mimo jiných, Chernenko et al. (2009) využili sofistikovaných algoritmů (VCA, NFINDR) k vizualizaci deuterovaných lipidových nanonosičů léčiv v buňkách modelových

buněčných linií. Dorney et al. (2012) a Ahlinder et al. (2013) využili k distribuci polystyrenových nanočástic a nanočástic TiO_2 a $\text{FeO}(\text{OH})$ shlukových analýz (KMCA a HCA). Na druhou stranu, Lamprecht et al. (2012) vizualizací uhlíkových nanotrubic a Shah et al. (2011) vizualizací zlatých nanočástic v buňkách poukázali na to, že i univariační metoda je účinnou metodou studia buněčného příjmu a zobrazení nanočástic v buňkách. Konfokální Ramanova mikroskopie v kombinaci s univariační metodou analýzy v této práci umožnila zobrazení buněčného příjmu studovaných nanočástic TiO_2 a AgNPs. Je tak možné souhlasně přispět do diskuze autorů výše zmíněných studií o tom, že Ramanova mikroskopie je vhodným nástrojem studia buněčného příjmu nanomateriálů.

Závěr

Diskuze o negativních vlivech spojených s působením nanočástic na buněčné i molekulární úrovni *in vitro* nejsou ojedinělé. Vedle studia výhodných vlastností a benefitů, které využití nanočástic v přípravcích a výrobcích nabízí, je tedy na místě také hodnocení rizik spojených s jejich používáním v přípravcích určených k přímé aplikaci na kůži nebo v těch, u nichž kontakt s kůží není vyloučen. V této práci bylo zhodnoceno působení nanočástic TiO₂ a AgNPs z komerčně dostupných přípravků na buňky buněčných linií lidských keratinocytů SVK-14 a lidských fibroblastů BJ. Jak bylo prokázáno, u všech studovaných nanočástic docházelo k jejich buněčnému příjmu a negativní vliv studovaných nanočástic související s indukci oxidativního stresu a poškozením DNA v buňkách, nebyl zanedbatelný. Výsledky rovněž otevřely diskuzi o vlivu výrobního procesu na intracelulární chování nanočástic, a také přispěly k úvahám o odlišném vlivu nanočástic na různé buněčné linie.

Závěrem, disertační práce splnila své cíle a výsledky experimentální práce přispěla do souboru poznatků souvisejících se studiem toxických účinků nanočástic TiO₂ a AgNPs. Hodnotné jsou zejména poznatky o intracelulárním chování nanočástic, získané s využitím metody konfokální Ramanovy mikroskopie, která se stala vhodným nástrojem pro rychlou a na přípravu vzorku nenáročnou vizualizaci buněčného příjmu nanočástic a jejich lokalizaci v buněčném prostředí.

Seznam použité literatury:

- 1) Abbot L.C., Maynard A.D. (2010) Exposure, uptake and barriers In Houdy P., Kajmani M., Marano E.: *Nanoethics and Nanotoxicology*, 37-61, Springer
- 2) Ahamed M. , Alsalhi M. S., Siddiqui M. K. (2010), Silver nanoparticles applications and human health, *Clin. Chim. Acta*, 2010, 411, 1841–1848
- 3) Ahlinder L., Hammarstrom B.E., Geladi P., Osterlud L. (2013) Large uptake of titania and iron oxide nanoparticles in the nucleus of lung epithelial cells as measured by Raman imaging and multivariate classification, *Biophys. J.*, 105, 310-319
- 4) Albanese A, Chan WC. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity, *ACS Nano*. 2011, 5, 5478–5489
- 5) Almarashi J. F. M., Kapel N., Wilkinson S. T., Telle H. H. (2012) Raman spectroscopy of bacterial species and strains cultivated under reproducible conditions, *Spectrosc.-Int. J.*, 27, 5-6, 316-365
- 6) Asare, N., Instances, C., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Schwartz, P., Kruszewski, M. et al. (2012). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 291, 65 – 72
- 7) Asharani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M. P., Valiyaveetil, S., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3, 279-290
- 8) Balss K. M., Llanos G., Papandreou G., Maryanoff C. A. (2007) Quantitative spatial distribution of sirolimus and polymers in drug-eluting stents using confocal Raman microscopy, *J. Biomed. Mater. Res.*, 85(1), 257-270
- 9) Bartolmiejczyk T., Lankoff A., Kruszewski M., Szumiel M. (2013) Silver nanoparticles – allies or adversaries?, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 20, 48-54
- 10) Barua S. & Mitragotri S. (2014) Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects, *Nano Today*, 9, 223-243

- 11) Blazi M. P., Jaganjac M., Zarkovic N. (2011) Cell oxidative stress: Risk of metal nanoparticles In Handbook of nanophysics: Nanomedicine and nanorobotics, Klaus D. Sattler ed., CRC Press, ISBN: 978-1-4200-7549-6
- 12) Baroli B. (2010) Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality?, *J. Pharm. Sci.*, 99(1), 21-50
- 13) Beer C., Foldbjerg R., Hayashi Y., Sutherland S. D., Autrup H. (2012) Toxicity of silver nanoparticles – nanoparticle or silver ion? *Toxicol. Lett.* 208, 286-292
- 14) Benson H. A. E. (2005) Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques, *Curr. Drug. Discov.*, 2(1), 23-33
- 15) Bernardeschi M., Guidi P., Scarcelli V. (2010) Genotoxic potential of TiO₂ on bottlenose dolphin leukocytes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 619-623
- 16) Bhattacharya K., Davoren M., Boertz J. (2009) Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA breakage in human lung cells, *Part Fibre. Toxicol.*, 6, 17
- 17) Bocklitz T., Putsche M., Stuber C., Käs J., Niendorf A., Rosch P., Popp J. (2009) A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis, *J. Raman spectrosc.*, 40, 1759-1765
- 18) Bolzinger M. A., Briancon S., Pelletier J., Chevalier Y. (2012) Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane, *Curr. Opin. Colloid. In.*, 17(3), 156-165
- 19) Bota A., Benaumer L. (2011): Nanoparticle toxicity mechanisms – genotoxicity In Houdy P., Kajmani M., Marano E.: *Nanoethics and Nanotoxicology*, 111–146, Springer.
- 20) Brar S. K. & Verma M. (2011) Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques, *Trends Analyt. Chem.*, 30(1), 4-17
- 21) Botelho M. C., Costa C., Silva S. (2013) Effects of titanium dioxide nanoparticles in human gastric epithelial cells in vitro, *Biomed. Pharmacoter.*, 68, 59-64

- 22) Brown D. M., Donaldson K., Borm P. J., Schins R. P., Dehnhardt M., Gilmour P., Jimenez L. A., Stone V. (2004) Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles, *J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 286, 344-353
- 23) Burgio L. & Clsrk J. H. (2001) Library of FT-Raman spectra of pigments, minerals, pigment media and varnishes, and supplement to existing library of Raman spectra of pigments with visible excitation, *Spectrochim. Acta A*, 57, 1494-1521
- 24) Bushberg T. J., Seibert A. J., Leidholdt E. M., Boone J. M. (2002) *The Essentials physics of medical imaging*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadepphia, USA
- 25) Butler S. K., Peeler J. D., Casey J., Dair J. B., Elespuru K. R. (2014) Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity, *Mutagenesis*, 2015, 30, 577-591
- 26) Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B*. 112, 13608-13619
- 27) Campbell, C.S.J., Contreras-Rojas, L.R., Delgado-Charro, M.B. and Guy, R.H. (2012) Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. *J Controlled Release*, 162, 201-207
- 28) Carlson C., Hussain S. M., Schrand A. M, Braydich-Stolle L. K, Hess K. L., Jones R.L., Schlager J. J. (2008), *J. Phys. Chem. B*, 112, 13608–13619
- 29) Carter C.B., Williams D.B. eds. *Transmission Electron Microscopy. Diffraction, Imaging and Spectrometry*, Springer, 2016, ISBN: 978-3-319-26649-7
- 30) Cartiera, M. S., Johnson, K. M., Rajendran, V., Caplan, M. J., & Saltzman, W. M. (2009). The uptake and Intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials*, 30, 14, 2790–2798
- 31) Demir E., Burgucu D., Tuma F. (2013) Determination of TiO₂, ZrO₂ and Al₂O₃ nanoparticles on genotoxic responses in human peripheral blood lymphocytes and cultured embryonic kidney cells, *J. Toxicol. Environ. Health*, 76, 990-1002

- 32) Dieing T., Ibach W. (2010) Software requirements and data analysis in confocal Raman microscopy In *Confocal Raman microscopy*, pp. 61-89, Springer series in optical sciences, Springer, Berlin
- 33) Dorney, J., Bonnier, F., Garcia, A., Casey, A., Chambers, G., Byrne, H. J., 2012. Identifying and localizing intracellular nanoparticles using Raman spectroscopy. *Analyst* 137, 1111 – 1119
- 34) Delhaye M., Barbillat J., Aubard J., Bridoux M., Da Silva E. (1996) Instrumentation in Raman microscopy: Developments and applications, G. Turrel and J. Corset, eds., Academic Press London
- 35) Dhaksinamoorthy A., Alvaro M., Navalon S., Garcia H. (2012) Metal nanoparticles as heterogeneous fenton catalysts, *Chem. Sus. Chem.*, 5(1), 46 – 64
- 36) Dieing T., Ibach W. (2010) Software requirements and data analysis in confocal Raman microscopy In *Confocal Raman microscopy*, pp. 61-89, Springer series in optical sciences, Springer, Berlin
- 37) Diem M., Griffiths P., Chalmers J. (2008) Infrared and Raman spectra of cellular components In *Vibrational spectroscopy for Medical diagnosis*, pp. 325-333, John Wiley and sons Ltd.
- 38) Dietzick B., Cialla D., Schmitt M., Popp J. (2010) Introduction to the fundamentals of Raman spectroscopy In *Confocal Raman microscopy*, pp. 21-27, Springer series in optical sciences, Springer, Berlin
- 39) Donaldson K., Stone V., Tran C., Kreyling W., Borm P. J. A. (2004) Nanotoxicology, *Occup. Environ. Med.*, 61(9), 727-728
- 40) Dorney, J., Bonnier, F., Garcia, A., Casey, A., Chambers, G., Byrne, H. J., 2012. Identifying and localizing intracellular nanoparticles using Raman spectroscopy. *Analyst* 137, 1111 – 1119
- 41) Draux F., Gobinet C., Sulé-Suso J., Trussardi A., Manfait M., Jeannesson P., Sockalingum D.G. (2012) Raman spectral imaging of single cancer cells: probing the impact of sample fixation methods, *Anal. bioanal. chem.*, 397, 2727-2737

- 42) Eaton P. & West P. (2005) Atomic force microscopy, Oxford University Press, ISBN 978-0-19-957045-4
- 43) El-Mashtoly S. F., Petersen D., Yosef H. K., Mosig A., Schick R. A., Kotting C., Gerwert K. (2014) Label-free imaging of drug distribution and metabolism in colon cancer cells by Raman microscopy, *Analyst*, 139, 1155-1161
- 44) El-Said K. S., Ali E. M., Kanehira K., Taniguchi A. (2015) Comparison of oxidative stresses mediated by different crystalline forms and surface modification of titanium dioxide nanoparticles, *J. Nanomater.*, 16(1), 1-8
- 45) Everall J. N. (2008) Confocal Raman Microscopy: Performance, Pitfalls, and Best Practice, *Appl. Spectrosc.*, 63, 9, 245 – 262
- 46) Faunce T., Watal A. (2010) Nanosilver and global public health: international regulatory issues, *Nanomedicine*, 2010, 5, 617–632
- 47) Feynman R. P. (1959) There's plenty of room at the bottom, An invitation to enter a new field of physics , Annual meeting of the American physical society, California institute of technology. Dostupné z: <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>
- 48) Feofanov A. V., Grichine A. I., Shitova A. L., Karmakova T. A., Yakubovskaya R. I., Charlier E. M., Vigny P. (2000) Confocal Raman microspectroscopy and imaging study of teraphthal in living cancer cells, *Bipphys. J.*, 78, 499-512
- 49) Filipová Z. (2012) Biosyntéza nanomateriálů, Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, ISBN: 978-80-244-3202-1
- 50) Filipová Z., Kukutschová J., Mašláň M. (2012) Rizika nanomateriálů, Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, ISBN 978-80-244-3201-4
- 51) Fissan H., Ristig S., Kaminski H., Asbach C., Epple M. (2014) Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization, *Anal. Methods*, 6, 7324-7334

- 52) Fubini B., Fenaglio I., Tomatis M., Turci F. (2011): Effect chemical composition and the state of the surface on the toxic response to high aspect ratios nanomaterial, *Nanomedicine* 6 (5), 899–920
- 53) Furukawa, F., Doi, Y., Suguro, M., Morita, O., Kuwahara, H., Masunaga, A., Hatakeyama A., Mori, M., 2011. Lack of skin carcinogenicity of topically applied titanium dioxide nanoparticles in the mouse, *Food Chem. Toxicol.* 49, 744-749
- 54) Gajbhiye S. & Sakharwade (2016) Silver nanoparticles in Cosmetics, *J. Cosm. Der. Sci. Appl.*, 6, 48-53
- 55) Gao H., Shi W., Freund L.B. (2005) Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(27) 9469-9474
- 56) Gao J., Sepúlveda M. S., Klinkhamer C., Wei A., Gao Y., Mahapatra C. T. (2015) Nanosilver-coated socks and their toxicity to zebrafish embryos, *Chemosphere*, 119, 948-952
- 57) George S., Lin S. J., Jo Z. X., Thomas C. R., Li L. J., Mecklenburg, M. Meng H., Wang X., Zhang H. Y., Xia T., Hohman J. N., Lin S., Zink J.I., Weiss P.S., Nel A.E. (2012) Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish gill cell line and zebrafish embryos, *ACS Nano*, 6, 3745–3759
- 58) Goel A., Kumar P. (2014) Characterisation of nanoparticle emissions and exposure at traffic intersections through fast–response mobile and sequential measurements, *Atm. Environ.*, 107 (94), 374-390
- 59) Gordon O., Slenters V. T., Brunetto P. S., Villaruz A. E., Sturdevant D. E., Otto M., Landmann R., Fromm K. M. (2010) Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction, *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 54, 4208 – 4218
- 60) Guix M., Carbonell C., Comenge J., Garcia-Fernandez L., Alacrón A., Casals E. (2008) Nanoparticles for cosmetics. How safe is safe?, *Contrib. Sci.*, 4(2), 213-217

- 61) Hadegaard M., Matthäus C., Hassing S., Krafft C., Diem M., Popp J. (2011) Spectral unmixing and clustering algorithms for assesment of single cell by Raman microscopic imaging, *Theor. chem. acc.*, 130, 1249-1260
- 62) Hamzeh M. & Sunahara G. (2013) In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibriblasts cells, *Toxicol. In Vitro*, 27(2), 864-873
- 63) Harada Y, Ota T., Ping D., Yamaoka Y., Hamada K., Fujita K., Takamatsu T. (2008) Imaging of anticancer agent distribution by a slit scanning Raman microscope, *P. soc. photo-opt . ins.*, 6853, 1-5
- 64) Hardcastle F. D. (2011) Raman spectroscopy of titania (TiO₂) nanotubular water-splitting catalyst, *J. Ark. Acad. Sci.*, 65, 43-48
- 65) He D., Miller C. J., Waite T. D. (2014), Fenton-like zero-valent silver nanoparticle-mediated hydroxyl radical production, *J. catal.*, 317, 198 – 205
- 66) Hollricher O. (2010) Raman instrumentation for confocal Raman microscopy In *Confocal Raman microscopy*, pp. 43-60, Springer series in optical sciences, Springer, Berlin
- 67) Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss, K. T., Schlager J. J. (2005), *Toxicol. in Vitro*, 19, 975–983
- 68) Hussain I., Singh N. B., Singh A., Singh S. C. (2016) Green synthesis of nanoparticles and its potential application, *Biotechnol. Lett.* 38(4), 545-560
- 69) Chernenko T., Buyukozturk F., Miljkovic M., Carrier R., Diem M., Amiji M. (2013) Label-free Raman microspectral analysis for Comparison of cellular uptake and distribution between non-targeted and EGFR-targeted biodegradable polymeric nanoparticles, *Drug Deliv. Transl. Res.* 3 (6), 575-586
- 70) Chernenko, T., Matthäus, C., Milane, L., Quintero, L., Amiji, M., Diem, M., 2009. Label-free Raman spectral imaging of intracellular delivery and degradation of polymeric nanoparticle systems. *ACS Nano* 3, 3552 – 3559

- 71) Chithrani, B. D., & Chan, W. C. W. (2007) Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Letters*, 7(6), 1542–1550
- 72) Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., Chan, W.C. W. (2006) Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters*, 6(4), 662–668
- 73) Choi J., Choo J., Chung H., CHil-Hwan O. (2005) Direct observation of spectral differences between normal and basal carcinoma (BCC) tissues using confocal Raman microscopy, *Biopolymers*, 77(5), 264-272
- 74) Jackson K. a Ch. Johann (2007) Dynamický rozptyl světla - Co, jak, proč?, *CHE-Magazín*. 17(1)
- 75) Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*, 3(3), 145–150
- 76) Jin H., Heller, D. A., Sharma, R., & Strano, M.S. (2009) Size-Dependent Cellular Uptake and Expulsion of Single-Walled Carbon Nanotubes: Single Particle Tracking and a Generic Uptake Model for Nanoparticles. *ACS Nano*, 3(1), 149–158
- 77) Jiravová J., Tománková K., Harvanová M., Hradilová S., Mašek V., Malohlava J., Malina L., Manišová B., Kejlová K., Jírová D., Kolářová H. (2014) Study of the Penetration of Silver Nanoparticles into SVK14 Cells. In: *Microscopy : advances in scientific research and education*. 6. vyd. Badajoz, Spain: A. Méndez-Vilas, Ed., Formatex, 2014. 173-178. ISBN: 978-84-942134-3-4
- 78) Jiravová J., Tománková K., Harvanová M., Malina L., Malohlava J., Luhová L., Panáček A., Manišová B., Kolářová H. (2016) The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro, *Food. Chem. Toxicol.*, 96, 50-61
- 79) Johnston H. J., Hutchinson G., Christensen F. M., Peters S., Hankin A., Stone V. (2010) A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold nanoparticulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity, *Crit. Rev. Toxicol.*, 40, 328-346

- 80) Jugan M. L., Barillet S., Simon-Deckers A. et al. (2012) Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells, *Nanotoxicology*, 2012(6), 501-513
- 81) Kakinoki K., Yamane K., Teraoka R., Otsuka M., Matsuda Y. (2004) Effect of relative humidity on the photocatalytic activity of titanium dioxide and photostability of famotidine, *J. Pharm. Sci.*, 93, 582-589
- 82) Kam, N. W. S., Liu, Z., & Dai, H. (2006). Carbon Nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA: An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 45(4), 577–581,
- 83) Kang, B., Mackey, M. K., & El-Sayed, M. A. (2010) Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis, *J. Am. Chem. Soc.*, 132(5), 1517–1519
- 84) Kast R. E., Tucker S. C., Kilian K., Trexler M., Honn K. V., Auner G. W. (2014) Emerging technology: applications of Raman spectroscopy for prostate cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 33, 673-693
- 85) Kaszuba M., McKnight D., Connah M. T., McNeil-Watson F. K., Nobbmann U. (2008) Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering , *J. Nanopart. Res.*, 10, 823-829
- 86) Kim H. R., Jim M. J., Lee Y. S., Oh M. A. Chung H. K. (2011) Genotoxic effects of silver nanoparticles simulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells, *Mutat. Res.*, 726, 129-135
- 87) Kim S., Ryu D. Y. (2013) Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues, *J. Appl. Toxicol.*, 33, 78–89
- 88) Kirubakaran S. & Thiruvengatam (2014) Diverse applications of nanotechnology in biomedicine, chemistry and engineering In *Handbook of research n diverse applications of nanotechnology in biomedicine*, ACME Book series, 2014, ISSN: 2327-5448
- 89) Krafft C., Beleites C, Schie I. W., Clement H. J., Popp J. (2016) Raman-based identification of circulating tumor cells for cancer diagnosis, *Proceedings of SPIE, Biomedical*

Vibrational Spectroscopy 2016: Advances in Research and Industry, 970408, doi: 10.1117/12.2217781

- 90) Krafft C., Knetschke T., Funk RHW, Salzer R. (2005) Identification of organelles and vesicles in single cells by Raman microscopic mapping, *Vib. spectrosc.*, 38, 85-93
- 91) Kokura, S., Handa, O., Takagi, T., Ishikawa, T., Naito, Y. and Yoshikawa, T. (2010) Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetic. *Nanomed. Nanotechnol.*, 6, 570-574
- 92) Labouta H. I., El-Khordagui L. K., Kraus T., Schneider M. (2011) Mechanisms and determinant of nanoparticles penetration through human skin, *nanoscale*, 3(12), 4989-4999
- 93) Labouta H. I., Schneider M. (2013) Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review, *Nanotechnol. Biol. Med.*, 9, 39, 39-54
- 94) Lamprecht, C., N. Gierlinger, A. Ebner (2012) Mapping the intracellular distribution of carbon nanotubes after targeted delivery to carcinoma cells using confocal Raman imaging as a label-free technique. *J. Phys. Condens. Matter.* 24, 164206
- 95) Lasch P., Diem M., Hänsch W., Naumann D. (2006) Artificial neuronal network as supervised techniques for FT IR microspectroscopic imaging, *J. chemometr.*, 20, 209-220
- 96) Lasch P., Naumann D. (1998) FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques, *Cell. mol. biol.*, 44, 189-202
- 97) Ledvina M. Stoklasová A., Cerman J.: *Biochemie pro studující medicíny*, 1. vydání, Praha: Karolinum 2004, ISBN: 80-246-0851-0
- 98) Le Ouay B. & Stellacci F. (2015) Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight, *Nanotoday*, 10(3), 339-354
- 99) Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Semf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A. (2003) Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage, *Environ. Health Persp.*, 111, 455-460
- 100) Li Y. F. and Chen C. (2011), Fate and toxicity of metallic and metal-containing nanoparticles for biomedical applications, *Small*, 7(21), 2965–2980

- 101) Liang M., Lin I. C., Whittaker M. R., Minchin R.F., Monteiro M. J., Toth I. (2010) Cellular uptake of densely packed polymer coatings on gold nanoparticles, *ACS Nano*, 4(1), 403-413
- 102) Limbach L. K., Wick P., Manser P., R. N. Grass, A. Bruinink and W. J. Stark, (2007) Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress, *Environ. Sci. Technol.*, 2007,41, 4158–4163
- 103) Ling J., Weitman S. D., Miller M. A., Moore V. R., Bovik A. C. (2002) Direct Raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of drug, *Appl. optics*, 41, 28, 6006-6017
- 104) Lohani A., Verma A., Joshi H., Yadav N., Karki N. (2014) Nanotechnology-Based Cosmeceuticals, *ISRN Dermatology*, 2014, 1-14
- 105) López-Serrano A., Olivas R.M., Landaluz J.S., Cámara C. (2014) Nanoparticles: a global vision. Characterisation, separation and quantification methods. Potential environmental and health impact, *Anal Methods*, 6 (1), 38-56
- 106) Lu P. J., Huang S. C., Chen Y. P., Chiueh L. C., Shih D. Y. C. (2015) Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics, *J. Food Drug Anal.*, 23, 587-594
- 107) Ling J., Weitman S. D., Miller M. A., Moore V. R., Bovik A. C. (2002) Direct Raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of drug, *Appl. optics*, 41, 28, 6006-6017
- 108) Lague R. & Varma R. S. (2012) Sustainable preparation of metal nanoparticles: Methods and applications, RSC Publishing, ISBN: 978-1-84973-428-8
- 109) Lynch I. (2007) Are there generic mechanisms governing interactions between nanoparticles and cells? Epitope mapping on outer layer of the protein-material interface, *J. Phys.*, 373, 511-520
- 110) Marquis, B. J., S. A. Love, C. L. Haynes (2009) Analytical methods to assess nanoparticle toxicity, *Analyst*, 134, 425–439

- 111) Martínez F., Calleja G., Melero J. A., Molina R. (2007): Iron species incorporated over different silica supports for the heterogeneous photo-Fenton oxidation of phenol. *Appl. Catal. B*, 70, 454 - 460
- 112) Matthäus C., Bird B., Miljković M., Chernenko T., Romeo M. (2008) Infrared and Raman microscopy in cell biology, *Method cell. biol.*, 89, 275-308 A
- 113) Matthäus C., Chernenko T., Quintero L., Milan L., Kale A., Amij M., Torchilin V., Diem M. (2008) Raman microscopic imaging of cells and applications monitoring the uptake of drug delivery systems, *P. soc. photo-opt. ins.* , 6991, 699106-1-7 B
- 114) Mıhranyan A., Ferraz N., Stromme M. (2012) Current stats and future prospects of nanotechnology in cosmetics, *Prog. Mater. Sci.*, 57(5), 875-910
- 115) Miljkovic M., Chernenko T., Romeo M. J., Bird B., Matthäus C., Diem M. (2010) Label-free imaging of human cells: algorithms for image reconstruction of Raman hyperspectral datasets, *Analyst*, 2002-2013,135
- 116) Monterio-Riviere N. A., Riviere J. (2009) Interaction of nanomaterials with skin: aspects of absorption and, *Nanotoxicology*, 3, 188-193
- 117) Münchberg U., Rösch P., Bauer M., Popp J. (2014) Raman microscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence, *Anal. Bioanal. Chem.*, 406(13), 3041-3050
- 118) Nascimento J. M. P., Bioucas Dias J. M. (2005) Vertex component analysis: A fast algorithm to unmix hyperspectral data, *IEEE*, 43, 898-910
- 119) Nel A., Xia T., Madler L., Li N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science*, 311, 622-627
- 120) Neugebauer U., Kurz C., Bocklitz T., Berger T., Velten T., Clement H. J., Krafft C., Popp J. (2014) Raman-spectroscopy based cell identification on a microhole array chip, *Micromachines*, 5, 204-2015
- 121) Numano T., Xu J, Fukutachi M., Alexander D. B., Furukawa F., Kanno J., Hirose A., Tsuda H. M., Suzui M. (2014) Comparative study of toxic effect of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15(2), 929-935

- 122) Oberdöster G., Oberdöster E., Oberdöster J. (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ. Health. Perspect.*, 113, 823-839
- 123) Oh N. & Park J. H. (2013) Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells, *Int. J. Nanomed.*, 9(1), 51-63
- 124) Osmond M. J & McCall (2010) Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: An analysis of potential exposure and hazard, *Nanotoxicology*, 4(1), 15-41
- 125) Oyelere, A. K., Chen, P. C., Huang, X., El-Sayed, I.H., & El-Sayed, M. A. (2007) Peptide-Conjugated Gold Nanorods for Nuclear Targeting, *Bioconjugate Chem.*, 18(5), 1490–1497
- 126) Pal L. S., Jana U., Manna P. K., Mohanta P. G., Manavalan R. (2011) Nanoparticle: an overview of preparation and characterization, *J. App. Pharm. Sci.*, 6, 229-234
- 127) Pan Z., Lee W., Slutsky L., Vlark R. A. F., Pernodet N., Rafailovich M. H. (2009) Adverse effect of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells, *Small*, 5(4), 511-520
- 128) Peters A., Veronesi B., Claderon-Garciduenas L., Gehr P., Chen L. C., Geiser M., Reed W., Rothen-Rutishauer B., Schurch S., Schultz H. (2006) Translocation of potential neurological effects on fine and ultrafine particles, *Part. Fibre Toxicol.*, 3, 13
- 129) Porter A. E., Müller K., Skepper J., Midgley P., Welland M. (2006) Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for cytotoxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography, *Acta Biomater.*, 2, 409-419
- 130) Prabhu S. & Poulouse E. K. (2012) Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, *Synthesis, Medical applications and Toxicity Effect, Nano Lett.*, 2(32), 1-10
- 131) Raman C.V., Krishnan K. S. (1928) A new type of secondary radiation, *Nature*, 121 (3048), p. 501

- 132) Richhariya N., Prajapati S. K., Sharma U. K. (2015) An updated review on: Preparation and application of nanoparticles, *World J. Pharm. Sci.*, 4(8), 461-473
- 133) Risom L., Moller P., Loft S. (2005) Oxidative stress-induced DNA damage by particulating air pollution, *Mutat. res.*, 592, 119-137
- 134) Sahu, S.C., Zheng, J., Graham, L., Chen, L., Ihrie, J., Yourick, J.J., Sprando, R.L., 2014. Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells in culture. *J Appl Toxicol* 34, 1155–1166
- 135) Salvati A., Aberg C., Dos Santos T., Varela J., Pinto P., Lynch I., Dawson K. A. (2011), Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: toward models of uptake kinetics, *Nanomedicine*, 7, 818-826
- 136) Saptarshi S. R., Duschl A., Duncan P. (2013) Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle, *Nanotechnology*, 11, 26
- 137) Sayes C. M., Wahi R., Kurian P. A., Liu Y., West J. L., Ausman K. D., Warheit D. B., Colvin V. L. (2006) Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells, *Toxicol. Sci.*, 92, 173 – 185
- 138) Scalfi-Haap C., Jauss A., Ibach W., Hollricher O. M., Fulda S., Hauser C., Steiner R., Ruck A. (2007) Confocal Raman microscopy as a diagnostic tool for investigation of living neuroblastoma tumour cells, *Med. laser appl.*, 22, 157-164
- 139) Shah, N. B., J. Dong, Bischof, J.C., 2011. Cellular uptake and nanoscale localization of gold nanoparticles in cancer using label-free confocal Raman microscopy. *Mol. Pharm.* 8, 176-184
- 140) Seltenrich N. (2013) Nanosilver: weighting the risks and benefits, *Environ. Health Perspect.*, 121, A220–A225
- 141) Shi J., Sun X., Lin Y., Zou X., Li Z., Liao Y., Du M., Zhang H. (2014) Endothelial cell injury and dysfunction induced by silver nanoparticles, *Biomaterials*, 6657 – 6666

- 142) Simon M., Barberet P., Delville M. H., Moretto P., Seznec H. (2011): Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Nanotoxicology* 5 (2): 125–139
- 143) Singh M., Manikandan S., Kumaraguru A. K. (2011) Nanoparticles: A new technology with wide applications, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 1(1), 1-11
- 144) Singh N., Manshian B., Jenkins G. J. S., Griffiths S. M., Williams M. P. B., Maffei T. G. G., Wright Ch. J., Doak S. H. (2009): Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30, 3891–3914
- 145) Singh R. P. & Ramaro P. (2012) Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles, *Toxicol. Lett.*, 213, 249-259
- 146) Smith E., Dent G. (2005) *Modern Raman spectroscopy: A practical approach*, John Wiley and sons Ltd, Chichester, England
- 147) Strambeanu N., Demetrovici L., Dragos D., Lungu M. (2014) Nanoparticles: Definition, Classification and general physical properties In *Nanoparticles' promises and risks; Characterization, Manipulation, and Potential Hazards to Humanity and the Environment*, Springer, ISBN: 978-3-319-11727-0
- 148) Taketani A., Hariyani R., Ishigaki M., Adriana B. B., Sato H. (2013) Raman endoscopy for the in situ investigation of advancing colorectal tumors in live model mice, *Analyst*, 138, 4183-4190
- 149) Taylor, U., Klein, S., Petersen, S., Kues, W., Barcikowski, S., & Rath, D. (2010). Nonendosomal cellular uptake of ligand-free, positively charged gold nanoparticles. *Cytometry A*, 77, 439–446
- 150) Tománková K., Kejlová K., Binder S., Dašková A., Zapletalová J., Bendová H., Kolářová H., Jírová D. (2011) In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetic colorants, *Toxicol. in vitro*, 25(2011), 1242-1250
- 151) Tománková, K., Jiravová J., Harvanová M., Malina L., Soukupová J., Hradilová S., Kejlová K., Malohlava J., Licman L., Dvořáková M., Jírová D., Kolářová H., (2015)

Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 106-115. ISSN 0278-6915

- 152) Uboldi C., Urbán P., Gilliland D., Bajak E., Valsami-Jones E., Ponti J., Rossi F. (2016) Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts, *Toxicol. In Vitro*, 31, 137-145
- 153) Uzunbajakava N., Lenferic A., Kraan Y., Volokhina E., Vrensen G., Greve J. (2003) Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells, *Biophys. j.*, 84, 3968-3981 A
- 154) Uzunbajakava N., Lenferic A., Kraan Y., Willekens B., Vrensen G., Greve J. (2003) Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells, *Biopolymers*, 72, 1-9 B
- 155) Vogel U., Savolainen K.W., Tongeren M., Brwer D., Berges M. (2014) *Handbook of nanosafety: Measurement, exposure and toxicology*, Elsevier, London
- 156) Volker C., Oetken M., Oehlmann J. (2013) The biological effect and possible modes of action of nanosilver, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2013, 223, 81–106
- 157) Zhang Y., Harris X. C., Wallenmeyer P., Murowchick J., Chen X. (2013) Assymmetric lattice vibrational characteristics of rutile TiO₂ as revealed by laser power dependent Raman spectroscopy, *J. Phys. Chem.*, 117, 24015-24022
- 158) Wang W., Mao Q., He H., Zhou M. (2013) Fe₃O₄ nanoparticles as an efficient heterogenous Fenton catalyst for phenol removal at relatively wide pH values, *Water Sci. Technol.*, 68, 11, 2367-2373
- 159) Wang Z., Xia T., Liu S. (2015) Mechanism of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effect, *Nanoscale*, 7, 7470-7481
- 160) Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., von Goetz N. (2012) Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products, *Environ. Sci. Technol.*, 46(4), 2242-2250
- 161) Wiechers J. W. & Musee N. (2010) Engineered Inorganic Nanoparticles and Cosmetics: Facts, Issues, Knowledge Gaps and Challenge. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 6, 408-431

- 162) Win K. Y., Feng S. S. (2005) Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 26(15), 2713-2722
- 163) Winter M. E. (1999) N-FINDR: an algorithm for fast autonomous spectral end-member determinative in hyperspectral data, *Imaging spectrometry*, 3753, 266-275
- 164) Wu C. C., Chen H. M., Chang C. I. (2012) Real time N-FINDR processing algorithms for hyperspectral imagery, *J. real-time image pr.*, 7, 105-129
- 165) Zhang M. (2013) Au natural nanoparticles sun protection, *Cosmet. Toiletries* , 128, 440
- 166) Xia T., Kovovich M., Brant J., hotze M., Semf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J., Wiesner M. R., Nel A. E. (2004) Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm, *Nano Lett.*, 6, 1794-1807
- 167) Xia T., Kovovich M., Liang M., Zink J. I., Nel A. E. (2008), Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways, *ACS Nano*, 2, 85-96
- 168) Xie H., Mason M. M., Wise J. P. (2011): Genotoxicity of metal nanoparticles. *Rev. Environ. Health*, 26 (4), 251–268
- 169) Yang H. (2002) Discriminant analysis by neural network, *Handbook of vibrational spectroscopy*, Jon Wiley & Sons
- 170) Yang E. J., Kim S., Kim J. S., Choi H. I. (2012) Inflammasome formation and IL-1 β release by human blood monocytes in response to silver nanoparticles, *Biomaterials*, 33, 6858 – 6867
- 171) Yu C., Gestl E., Eckert K., Allara D., Irudayaraj J. (2006) Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy, *Cancer detect. prev.*, 30, 515-522

172) Yourong L., Po-Chang C., Blom J. D., Shevlin K., Brayman T. G., Hu Y., Selbo J. G., Hu L. (2008) Comparison of in vitro nanoparticles uptake in various cell lines and in vivo pulmonary cellular transport in intratracheally dosed rat model, *Nanoscale Res. Lett.*, 9, 321-329

173) Doporučení komise ze dne 18. října 2011 o definici nanomateriálů 2011/696/EU, 2011. Dostupné z <http://www.mpo.cz/dokument91738.html>

Publikační činnost autora:

Vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF:

1. **Perlovská Harvanová M.**, Malohlava J., Jiravová J., Bartoň Tománková K., Kolářová H. (2017) Raman imaging of cellular uptake and studies of silver nanoparticles effect in BJ human fibroblasts cell lines, *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1-2), ISSN 0378-5173, IF: 3.649
2. Jiravová J., Bartoň Tománková K., **Harvanová M.**, Malina L., Malohlava J., Luhová L., Panáček A., Manišová B., Kolářová H. (2016) The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro, *Food And Chemical Toxicology*, 96(-), 50-61, ISSN 0278-6915, IF: 3.584
3. Bartoň Tománková, K., Jiravová J., **Harvanová M.**, Malina L., Soukupová J., Hradilová Š., Kejlová K., Malohlava J., Licman L., Dvořáková M., Jírová D., Kolářová H. (2015) Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles invitro, *Food And Chemical Toxicology*, 85(-), 20-30. ISSN 1873-6351. IF: 2.895

Vědecké publikace uveřejněné v recenzovaných časopisech:

1. **Harvanová M.**, Mašek V., Jírová D., Kolářová H. (2016) Raman label-free visualisation of TiO₂ nanoparticles in BJ cell lines, *Clinician and technology Journal*, 1 (46), 25-28, ISSN: 0301-5491
2. Kolářová H., Tománková K., **Harvanová M.**, Horáková J., Malohlava J., Cenklová V., Bajgar R., Kejlová K., Jírová D. (2015) Cell Uptake Of Titanium Dioxide Nanoparticles, V: *Int'l Conf. On Medical Genetics, Cellular & Molecular Biology, Pharmaceutical & Food Sciences*, 114-116, ISBN: 978-93-84422-23-3
3. Jiravová, J., Bartoň Tománková K., **Harvanová M.**, Hradilova S., Mašek V., Malohlava J., Malina L., Manišová B., Kejlová K., Jírová D., Kolářová H. (2014) Study of the penetration of silver nanoparticles into SVK14 cells. V: *Microscopy : advances in scientific research and education*. 6. Vyd. Badajoz, Spain: A. Méndez-Vilas, Ed., *Formatex*, 2014. 173-178. ISBN: 978-84-942134-3-4

Publikace v abstraktech a sbornících:

1. **Harvanová M.**, Bartoň Tománková K., Kolářová H.: *Ramanova mikroskopická detekce buněčného příjmu TiO₂ a Ag nanočástic v buňkách linie SVK-14*, XXXIX. Dny Lékařské Biofyziky, Piešťany, SR, 30.5.- 1. 6. 2016, Sborník abstrakt, s. 31
2. **Harvanová M.**, Palacký J., Matthäus C., Grüner B., Holub J., Šícha V., Mašek V.: *Cellular uptake of metallocarborane complexes monitored using confocal Raman microscopy*, XXIV. International conference of Raman spectroscopy, Jena, Německo, 10.- 15. 8. 2014, Sborník abstrakt, s. 857