



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Studium rozpouštění křemičitých nanovláken ve vybraných tělních tekutinách v závislosti na podmínkách jejich zpracování

Diplomová práce

Studijní program: N3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942T002 Nanomateriály

Autor práce: Bc. Markéta Paprčková

Vedoucí práce: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.





Study on dissolution of inorganic silicon dioxide nanofibers in chosen body fluids in relation to conditions of their treatment

Master thesis

Study programme: N3942 Nanotechnology
Field of study: 3942T002 Nanomaterials
Author: Bc. Markéta Paprčková
Supervisor: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Paprčková**
Osobní číslo: **M15000218**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Studium rozpouštění křemičitých nanovláken ve vybraných tělních tekutinách v závislosti na podmínkách jejich zpracování**
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Provedte literární rešerši o chování a biologických účincích SiO_2 v živých organismech.
2. Změřte rychlost rozpouštění tepelně zpracovaných vzorků křemičitých nanovláken ve vybraných tělních tekutinách.
3. Získané výsledky zpracujte do tabulek a grafů, vyhodnoťte a porovnejte s výsledky získanými rozpouštěním křemičitých nanovláken ve fyziologickém roztoku a destilované vodě.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

1. PAPERČKOVÁ, Markéta. Studium rozpouštění anorganických nanovláken na bázi oxidu křemičitého ve vodném prostředí v závislosti na jejich tepelné stabilizaci. Liberec, 2016. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.
2. ŠLAMBOROVÁ I., ZAJÍCOVÁ V., EXNAR P., et al. Nanofiber structure with immobilized organic agens and the method of its preparation. WO2014026656 A1, 9.4. 2014.
3. STUDNIČKOVÁ, J. et al. Thermal properties of silicon oxide nanofibers. 6th Int. Conference - TEXSCI 2007: Liberec, Czech Republic [online]. Dostupné z: <http://www.kch.tul.cz/publications/sb15.pdf>
4. WANG, Lin, Kemin WANG, Swadeshmukul SANTRA, Xiaojun ZHAO, Lisa R. HILLIARD, Joshua E. SMITH, Yanrong WU a Weihong TAN. Watching Silica Nanoparticles Glow in the Biological World. Analytical Chemistry 2006, 78(3), 646-654.
5. SCHNEIDER, Mandy, Fabian MEDER, Annette HAI, Laura TRECCANI, Kurosch REZWAN a Klaus KÜMMERER. Physicochemical properties and biodegradability of organically functionalized colloidal silica particles in aqueous environment. Chemosphere 2014, Vol. 99, 96-101.

Vedoucí diplomové práce: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání diplomové práce: 10. října 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 15. května 2017

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan



prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 10. října 2016

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí vloženou do IS STAG.

Datum: 5.5.2017

Podpis: Paříčková

Poděkování

Děkuji doc. Mgr. Ireně Lovětinské-Šlamborové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytla při psaní této práce. Mé poděkování patří též doc. Ing. Petru Exnarovi, CSc. za vstřícnost při konzultacích a za spolupráci při získávání údajů pro experimentální část práce.

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na testování rozpustnosti křemičitých nanovláken v simulovaných tělních tekutinách a příbuzných roztocích v závislosti na jejich tepelné stabilizaci. Cílem práce bylo stanovit rychlosti rozpouštění křemičitých nanovláken jakožto ukazatele jejich biodurability. Za tímto účelem byly provedeny statické a dynamické testy rozpustnosti. Křemičitá nanovlákná byla připravena na Technické univerzitě v Liberci metodou elektrostatického zvlákňování solu připraveného metodou sol-gel. Termické vlastnosti nanovláken byly zkoumány pomocí TG analýzy. Dále bylo provedeno měření specifického měrného povrchu metodou BET. Morfologie nanovláken byla zkoumána pomocí SEM. Množství křemíku v jednotlivých vzorcích bylo stanoveno pomocí ICP/OES. Z výsledků testů rozpustnosti vyplynul velmi výrazný rozdíl v rychlosti rozpouštění křemičitých nanovláken v závislosti na použitém médiu a teplotě stabilizace. Bylo zjištěno, že čím je vyšší hodnota pH, vyšší obsah organických látek a vyšší iontová síla média, tím je rychlost rozpouštění vyšší. Dále bylo zjištěno, že vyšší teplota stabilizace nanovláken vede ke snížení rychlosti jejich rozpouštění. Na základě dosažených výsledků byl vypočten poločas rozpouštění křemičitých nanovláken pro jednotlivé tělní tekutiny a teploty stabilizace.

Klíčová slova

Oxid křemičitý, nanovlákná, rozpustnost, tělní tekutiny, toxicita

Abstract

The thesis investigates the effects of thermal stabilization and treatment of silica nanofibers on their solubility in simulated body fluids and similar solutions. The aim of this study is to determine the dissolution rates of silica nanofibers as the indicator of their biodegradability. For this purpose, static and dynamic solubility tests were performed. Silica nanofibers were prepared via electrospinning and sol-gel methods at the Technical University of Liberec. The thermal properties of the nanofibers were analyzed using TG analysis. Krypton adsorption/desorption measurements were employed to measure the specific surface area. The morphology of nanofibers was examined by SEM. In order, to quantify the dissolved silica, the amount of silicon in the samples was monitored using ICP/AES. The results show a strong dependence of silica nanofiber dissolution rates on the type of medium and the temperature of stabilization. It is identified that silica nanofiber dissolution rates are significantly enhanced by higher ionic strength, higher content of organic matter, and higher pH of medium. Furthermore, the higher temperature of silica nanofiber stabilization leads to reduction of their dissolution rates. The correlation between the half-lives of silica nanofibers and stabilization temperature were calculated for all simulated body fluids.

Key words

Silica dioxide, nanofibers, solubility, body fluids, nanoparticles, toxicity

OBSAH

1	ÚVOD	12
2	TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1	Testy rozpustnosti a biodurabilita	13
2.1.1	Metody určování biodurability	14
2.1.2	In vitro testování v simulovaných tělních tekutinách	14
2.1.3	Kinetika rozpouštění nanovláken.....	17
2.2	Tělní tekutiny	18
2.2.1	Simulované tělní tekutiny	19
2.3	Toxicita nanočástic.....	20
2.3.1	Vstup nanočástic do organismu	20
2.3.2	Imunitní odpověď organismu na vstup nanočástic	21
2.3.3	Mechanismy toxického účinku nanočástic	22
2.4	Křemičité nanomateriály	24
2.4.1	Toxicita křemičitých nanočástic	24
2.4.2	Biodegradabilita křemičitých nanočástic	26
2.4.3	Příjem a distribuce křemičitých nanočástic v organismu	27
2.4.4	Eliminace křemičitých nanočástic z organismu.....	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Výchozí produkty.....	29
3.1.1	Křemičitá nanovláknna	29
3.1.2	Simulované tělní tekutiny	29
3.2	Popis experimentů.....	31
3.2.1	Statické testy rozpustnosti	31
3.2.2	Dynamické testy rozpustnosti.....	32

3.3	Metody charakterizace	34
3.3.1	Termogravimetrická analýza	34
3.3.2	Optická emisní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou.....	34
3.3.3	Skenovací elektronová mikroskopie.....	34
3.3.4	Měření měrného povrchu adsorpcí kryptonu.....	35
3.4	Výsledky a diskuze	36
3.4.1	Charakterizace křemičitých nanovláken.....	36
3.4.2	Statické testy rozpustnosti	38
3.4.3	Dynamické testy rozpustnosti.....	53
3.5	Závěr	57
4	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	58

Seznam zkratek a symbolů

A	Simulovaná krevní plazma
B	Simulovaná synoviální tekutina
BET	Brunaer-Emmet-Teller
C	Simulovaná tekutina tlustého střeva
CNS	Centrální nervová soustava
CTV	Celková tělesná voda
D	Extracelulární plicní tekutina (pH = 7,4)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E	Intracelulární plicní tekutina (pH = 4,5)
ECT	Extracelulární tekutina
F	Simulovaný pot pH = 4,5
G	Simulovaný pot pH = 5,4
H	Simulovaná moč
I	Fyziologický roztok
ICP/ AES	Atomová emisní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou
ICP/ OES	Optická emisní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou
ICT	Intracelulární tekutina
IgG	Imunoglobulin G
In vitro	Za laboratorních podmínek
In vivo	V živém organismu
M	Destilovaná voda
R_c	Rychlost rozpouštění [$\text{ng}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$]
PET	Polyethylentereftalát
pH	Vodíkový exponent
pKa	disociační konstanta kyseliny
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SNP	Křemičité nanočástice
$t_{1/2}$	Poločas rozpouštění
TG	Termogravimetrická analýza

Seznam příloh

Přílohy jsou k dispozici pouze v elektronické podobě na přiloženém CD.

- Příloha č. 1 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium A, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 2 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium B, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 3 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium C, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 4 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium D, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 5 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium E, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 6 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium F, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 7 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium G, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 8 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium H, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 9 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium I, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 10 Statické testy rozpustnosti: tabulky hodnot a SEM snímky (médium M, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod. nebo 550 °C/2 hod.)
- Příloha č. 11 Křemičitá nanovlákna (standart, 180 °C/2 hod.), SEM snímky, výsledky TG analýzy
- Příloha č. 12 Dynamické testy rozpustnosti: tabulky hodnot (médium A, nebo D, teplota stabilizace: 180 °C/2 hod.)
- Příloha č. 13 Simulované tělní tekutiny – chemikálie a navážky

1 ÚVOD

V medicínských aplikacích jsou stále široce používána krytí ran ve formě textilních obvazů nebo náplastí. Tyto zdravotnické prostředky postačují pro léčbu běžných poranění pokožky jako jsou odřeniny a malé popáleniny. Problém nastává ve chvíli, kdy dojde k infekci rány. Akutní a chronické rány jako jsou bércové vředy, proleženiny (dekubity), nádory s vředovitým rozpadem, těžké popáleniny a další komplikovaně se hojící rány jsou v průběhu dlouhotrvající léčby často opakovaně napadány infekcí. Další nevýhodou těchto krytí je nutnost převazů, která způsobuje opakovanou traumatizaci rány, zvýšení rizika zanesení infekce a zpomalení procesu hojení.

Velmi slibný materiál pro tyto aplikace představují nanovláknenné substráty na bázi oxidu křemičitého, které mají kromě velkého měrného povrchu řadu terapeutických výhod, mezi které patří schopnost kopírovat povrch rány, možnost imobilizace různých typů biomolekul (desinfekční látky, antibiotika, enzymy), biologická kompatibilita a biologická rozložitelnost. Další výhodou je možnost řízení rychlosti jejich degradace teplotou stabilizace. Tyto vlastnosti by v budoucnu mohly odstranit nutnost převazů a usnadnit tak léčbu těžce se hojících ran.

Před samotnou aplikací nového materiálu ve zdravotnictví je nutné prokázat jeho zdravotní nezávadnost, která může být posuzována jako schopnost materiálu odolávat fyziologickým podmínkám organismu. Firma Johns Manville Corporation provedla rozsáhlou studii bioperzistence skleněných vláken, kde byla stanovena hodnota poločasu rozpouštění 40 dní, při které lze materiál považovat za bezpečný. Dosud však nebyla provedena ucelená studie, která by se zabývala bioperzistencí nanovláken na bázi oxidu křemičitého. Stanovení poločasu rozpouštění křemičitých nanovláken v simulovaných tělních tekutinách by umožnilo posoudit jejich zdravotní nezávadnost a učinilo tak krok vpřed pro jejich aplikaci v medicínské praxi.

Teoretická část práce se zabývá metodami testování rozpustnosti materiálů a určování jejich bioperzistence, dále jsou probrány tělní tekutiny a jejich význam v organismu, poslední část je věnována toxicitě nanočástic na bázi oxidu křemičitého a jejich metabolismu v organismu. Cílem experimentální části této práce je stanovit poločasy rozpouštění křemičitých nanovláken v simulovaných tělních tekutinách v závislosti na jejich tepelné stabilizaci jakožto ukazatele jejich bioperzistence.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Testy rozpustnosti a biodurabilita

Bioperzistence a biodurabilita má vliv na toxicitu a patogenitu částic, které se vyskytují v organismu. Proto jsou bioperzistence a biodurabilita důležitými parametry, které je nutno zvážit při odhadování toxicity částic a vláken. Rozpustnost, míra biodurability, je závislá na fyzikálních a chemických vlastnostech nanovláken (velikost, měrný povrch), ale také na vlastnostech média, ve kterém se rozpouštějí (iontová síla, pH, teplota apod.) [1].

In vitro testy rozpustnosti mohou poskytnout užitečné informace o tom, jak nanovlákná reagují v daném biologickém prostředí. U nanovláken, která při *in vitro* testech v simulovaných tekutinách rychle uvolňují složky, lze obdobné chování čekat v podobném biologickém prostředí při *in vivo* testech. Rozpouštění nanovláken závisí především na jejich fyzikálně chemických vlastnostech a probíhá podle reakční kinetiky různých řádů [1], [2].

Rozpouštění většiny nanomateriálů probíhá podle kinetiky prvního řádu, díky tomu je možné odhadnout poločas rozpouštění nanovláken jako míru jejich biodurability. Dále je možné určit rychlost jejich rozpouštění [1].

Bioperzistence je definována jako schopnost materiálů, tedy i nanovláken, odolávat fyzikálním, chemickým a fyziologickým podmínkám v organismu. Bioperzistence je považována za jednu z hlavních příčin toxicity a patogenity materiálů. Biodurabilita je definována jako schopnost materiálů odolávat chemickým a fyziologickým změnám, je velkým přispěvatelem bioperzistence [1], [3].

Rozpustnost, definována jako uvolnění molekul a iontů z nanovláken, je využívána pro měření biodurability. Stanovení rychlosti rozpouštění nebo poločasu rozpouštění umožňuje odhadnout, jak bude daný materiál interagovat s biologickým prostředím [1], [2].

2.1.1 Metody určování biodurability

Rychlost rozpouštění nanomateriálů může být určena testy *in vivo* (krátkodobými nebo dlouhodobými) a *in vitro* (buněčnými nebo nebuněčnými).

In vivo testy jsou využívány ke stanovení čistoty a biodurability nanočástic. Evropská komise povoluje dva typy testů, endotracheální intubaci a inhalační testy [2].

Změna částic je stanovena po třech měsících, kdy dojde k usmrcení pokusných zvířat, ze kterých jsou vypláchnuty makrofágy pro další analýzu. Biodurabilita je stanovena z poklesu průměru nanovláknů [1], [2].

Buněčné *in vitro* testy biodurability zahrnují kultivaci buněk v médiu se zkoumaným materiálem, po které následuje analýza materiálu pomocí mikroskopu a určení změny průměru vláken. U buněčných testů se vyskytuje řada problémů a omezení. Například to, že testované buňky se nevyskytují ve svém přirozeném prostředí a objemy kultivačního média jsou velmi malé v porovnání s reálnými *in vivo* systémy.

Nebuněčné *in vitro* testy stanovují stupeň rozpuštění mikročástic i nanočástic a nanovláken v simulovaných tělních tekutinách. Tyto testy jsou zpravidla využívány pro sledování rozpouštění a poskytují informaci o tom, jak by se dané nanočástice nebo nanovláknů mohly chovat v reálných biologických systémech.

Dále se budu věnovat pouze nebuněčným *in vitro* testům.

2.1.2 In vitro testování v simulovaných tělních tekutinách

Existuje velké množství simulovaných tělních tekutin používaných při *in vitro* testování, např.: krevní plazma, plicní tekutina, tekutina tlustého střeva apod. Simulovaným tělním tekutinám bude věnována pozornost v praktické části této práce.

Rychlost rozpouštění testovaných nanovláken je určována na základě změny jejich hmotnosti v čase, koncentraci iontů uvolněných do simulované tekutiny během rozpouštění nebo na základě změny fyzikálně chemických vlastností (změna průměru vláken v čase apod.).

Ve studii provedené firmou Johns Manville Corporation, byly provedeny testy rozpustnosti několika typů vláken. Ze studie vyplývá, že vlákna mající poločas rozpouštění nižší než 40 dní, lze považovat za zdravotně nezávadná. Následující tabulka

(viz. Tabulka 1) uvádí hodnoty poločasů – $t_{1/2}$ a rychlostí rozpouštění – R_c pro vlákna rozpouštěná v simulované plicní tekutině při pH 7,4. Pomocí symbolů +/- je označena potenciální patogenita vláken. Znaménko + značí patogenní vlákna, znaménko - značí nepatogenní vlákna [4]. *In vitro* testy rozpustnosti lze dále rozdělit na statické a dynamické.

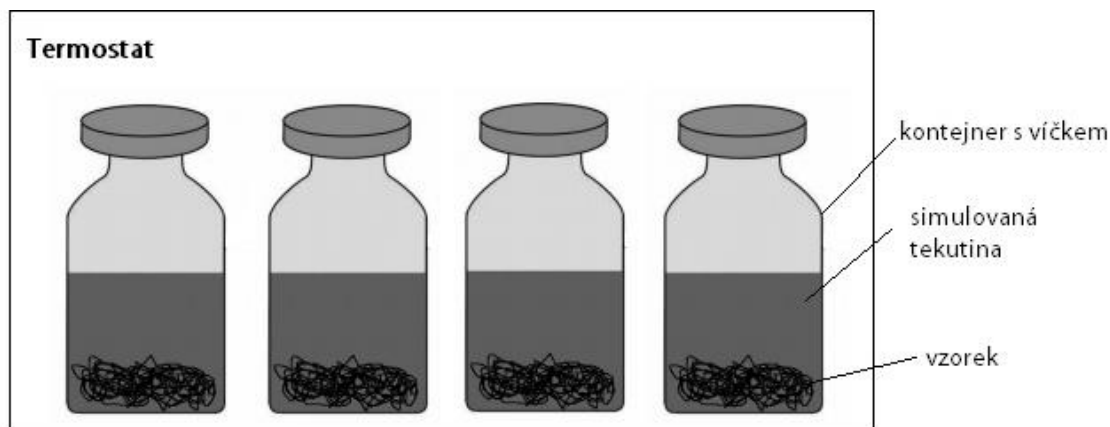
Tabulka 1 Bioperzistence skleněných vláken, *In vitro* rozpouštění a patogenita [4].

Testovaná vlákna		Vyloučení z plic	Rozpustnost	Plicní patogenita	
Typ	Kategorie	$t_{1/2}$ [dny]	R_c , pH 7,4 [ng/cm ² ·h]	Fibróza	Tumory
Crocidolite	Azbestos	817	<1	+	+
Amosite	Azbestos	418	<1	+	+
E Glass	FG Special App.	79	9	+	+
RCF1	Refractory Ceramic	55	3	+	+
475 Glass	FG Special App.	49	12	+	+/-
Rock Wool	MW, MMVF12	67	20	+	-
JM 901	FG Bldg. Insulation	14,5	300	-	-
Certain Teed	FG Bldg. Insulation	9	100	-	-
Slag Wool	MW, MMVF11	9	400	-	-
HT Stonewool	MW	6	59	-	-

2.1.2.1 Statické testy rozpustnosti

Statické testy rozpustnosti jsou založeny na rozpouštění známého množství částic nebo vláken v definovaném množství tekutiny. Celý systém je většinou uzavřen v kontejneru. Testovaný materiál může být od tekutiny oddělen polopropustnou membránou nebo filtrem, nebo může být volně ponechán v simulované tekutině (viz. Obrázek 1). Pokud jsou vlákna přidána přímo do tekutiny a jsou rozpouštěna po určitou dobu, pak se po odebrání vzorků provádí filtrace za účelem oddělení částic od rozpuštěných molekul a iontů.

Problémem statických testů, díky omezenému objemu simulované tekutiny, je možnost saturace tekutiny. V takovém případě mohou probíhat zpětné reakce a srážení rozpouštěného materiálu, dále dochází ke zpomalení procesu rozpouštění, což může vést ke zkreslení výsledků testů rozpustnosti [1], [5].

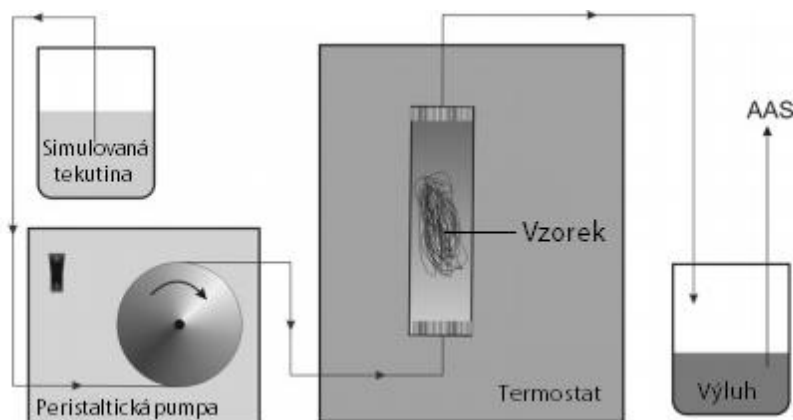


Obrázek 1 Možné uspořádání statického testu rozpustnosti. Převzato a upraveno z [5].

2.1.2.2 Dynamické testy rozpustnosti

Dynamické testy rozpustnosti jsou založeny na rozpouštění částic nebo vláken v průtokové komoře, přes kterou protéká simulovaná tekutina stanovenou rychlostí. Testovaný materiál je od proudící tekutiny v komoře oddělen pomocí membrány nebo filtru. Tekutina poté protéká skrz komoru s testovaným materiálem a strhává s sebou rozpouštěné molekuly a ionty, které jsou následně sbírány na frakčním kolektoru (viz. Obrázek 2).

Dynamické testy rozpustnosti lépe reprezentují reálnou situaci v organismu. Jejich další výhodou je to, že díky průtoku většího objemu simulované tekutiny předcházejí vzniku nasyceného roztoku a zpomalení rychlosti rozpouštění. Nevýhodou dynamických testů je potřeba poměrně velkého objemu simulovaných tekutin, aby bylo možné zajistit konstantní rychlost průtoku skrz testovací komoru [1], [5].



Obrázek 2 Schématické uspořádání dynamického testu. Převzato a upraveno z [5].

2.1.3 Kinetika rozpouštění nanovláken

Stanovení biodurability nanovláken při in vitro testech rozpustnosti je založeno na určení rychlosti jejich rozpouštění. Všeobecně platí, že rozdílné chemické procesy mají rozdílnou reakční kinetiku, která může být nultého, prvního nebo druhého řádu. Rychlost reakce je dána rovnicí (2.1), která říká, že úbytek hmotnosti nebo látkového množství látky dM v čase t je roven rychlostní konstantě k a řádu reakce $n = 0, 1, 2$. Řád kinetické reakce lze stanovit pouze na základě experimentálních dat.

$$\text{rychlost} = -\frac{dM}{dt} = k \cdot [\text{reaktant}]^n \quad (2.1)$$

Na rychlost rozpouštění nanovláken má vliv řada parametrů, mezi které patří vlastnosti samotných nanovláken (měrný povrch, struktura, morfologie apod.) a vlastnosti rozpouštědla (pH, iontová síla, koncentrace, teplota) [1], [3].

Brázda a kol. provedl statické i dynamické in vitro testy rozpouštění křemičitých nanovláken v simulované plicní tekutině [6]. Rychlost rozpouštění křemičitých nanovláken pro statické in vitro testy byla vypočtena dle vzorce (2.2) a pro dynamické in vitro testy dle vzorce (2.3).

$$R_c = \frac{c_{SiO_2}}{x_{SiO_2} \cdot A \cdot t} \cdot V \quad (2.2)$$

$$R_c = \frac{m_t}{A \cdot t}; \text{ kde } m_t = m_{t-\Delta t} + \frac{c_{SiO_2}(t)}{x_{SiO_2}} \cdot F \cdot t \quad (2.3)$$

Kde R_c je rychlost rozpouštění křemičitých nanovláken [$\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$], c_{SiO_2} je koncentrace oxidu křemičitého v roztoku [$\text{ng} \cdot \text{cm}^{-3}$], A je měrný povrch nanovláken [cm^2], V je objem roztoku [cm^3], F je rychlost průtoku simulované plicní tekutiny skrz testovací komoru [$\text{cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$], t je čas expozice [h]. Hodnota x_{SiO_2} reprezentuje hmotnostní podíl oxidu křemičitého v nanovlákněch, pro čistá křemičitá nanovlákná je x_{SiO_2} roven jedné.

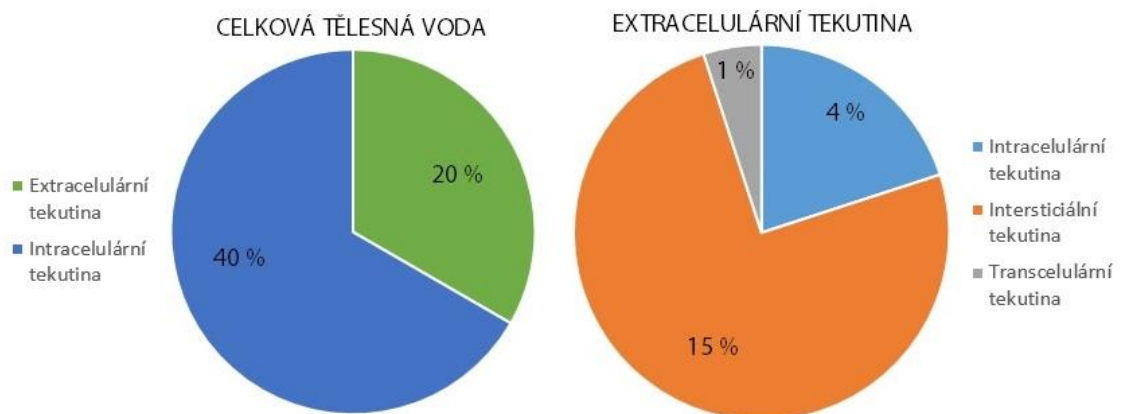
2.2 Tělní tekutiny

Voda je hlavní složkou vnitřního prostředí a u dospělého člověka tvoří celková tělesná voda (CTV) přibližně 60 % celkové hmotnosti [7], [8], [9].

Voda je v organismu kompartmentalizovaná do několika oddílů. Základní oddíly zahrnují extracelulární a intracelulární tekutiny [9], [7]. Intracelulární tekutina (ICT), zahrnuje vodu a v ní rozpuštěné ionty a soluty nacházející se uvnitř buněk, tvoří 2/3 CTV, tedy 40 % tělesné hmotnosti. Extracelulární tekutina (ECT) zahrnuje vodu mimo buňky, tvoří 1/3 CTV, tedy 20 % tělesné hmotnosti.

ECT se dále dělí na pododdíly: intravaskulární tekutinu neboli krevní plazmu, intersticiální tekutinu neboli tkáňový mok a transcelulární tekutinu neboli tekutinu ve třetím prostoru [7], [10]. Graf 1 znázorňuje procentuální podíl kompartmentů na celkové tělesné hmotnosti.

Graf 1 Celková tělesná voda a její kompartmenty, procentuální podíl na celkové tělesné hmotnosti. Data převzata z [10].

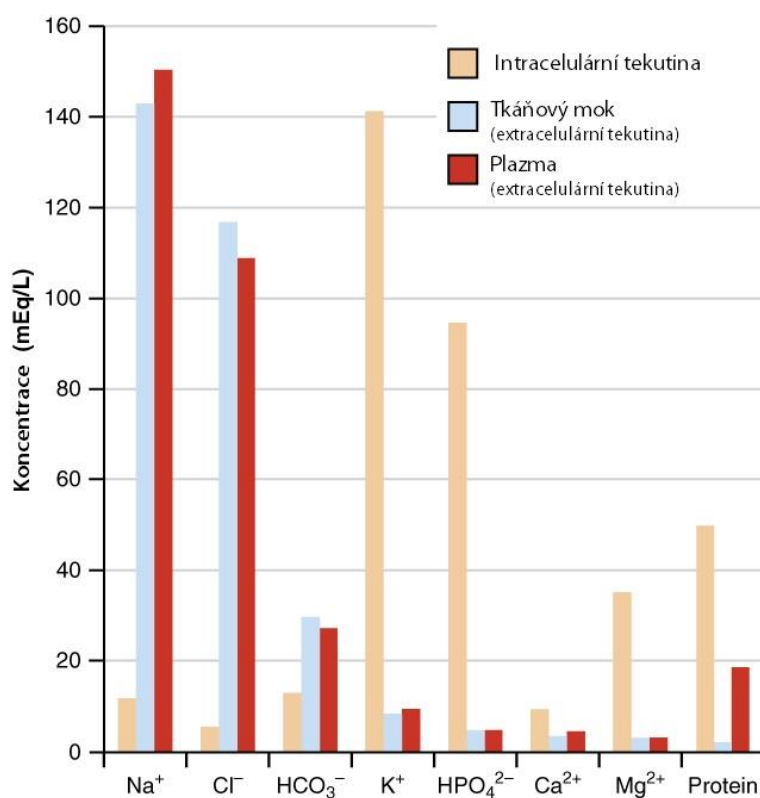


Intracelulární tekutina je od extracelulární tekutiny oddělena plazmatickou membránou. Tato membrána tvoří obal buněk, je semipermeabilní a obsahuje řadu membránových proteinů, které slouží jako přenašeče látek ven nebo dovnitř intracelulárního oddílu. Obsah iontů i makromolekul je v obou oddílech rozdílný. Graf 2 znázorňuje složení intersticiální tekutiny, ICT a plazmy.

Hlavními intracelulárními ionty jsou K^+ , Mg^{2+} , fosfátové anionty a sulfátové anionty [7], [8], [10]. Intracelulární tekutina obsahuje oproti extracelulární tekutině vyšší koncentrace nabitých makromolekul např.: bílkoviny a nukleové kyseliny [11].

Hlavními složkami extracelulární tekutiny jsou krevní plazma a tkáňový mok. Krevní plazma je od tkáňového moku oddělena vysoce propustnou kapilární membránou, proto mají obě tekutiny podobné složení lišící se především koncentrací bílkovin. Krevní plazma má vysoký podíl bílkovin, kdežto tkáňový mok má nízký podíl bílkovin. Hlavními extracelulárními ionty jsou Na^+ , Cl^- , HCO_3^- [8], [10]. Další složkou extracelulární tekutiny je transcelulární tekutina, která vznikla díky transportní a sekreční aktivitě buněk. Transcelulární tekutina zahrnuje: moč, žaludeční a střevní šťávu, žluč, sliny, komorovou vodu, synoviální tekutinu v kloubech, mozkomíšni mok, endolymfu a perilymfu ve vnitřním uchu [11].

Graf 2 Koncentrace různých elementů vyskytujících se v tělních tekutinách (intracelulární tekutině, intersticiální tekutině, krevní plazmě) [12].



2.2.1 Simulované tělní tekutiny

Použití simulovaných tělních tekutin při in vitro testech rozpustnosti umožňuje lépe porozumět mechanismu rozpouštění daného materiálu a tím usnadňuje předpovídat chování materiálu v živém organismu. Bylo provedeno několik studií, jejichž cílem bylo navrhnout správné složení simulovaných tekutin [13], [14], [15]. Konkrétnímu složení simulovaných tělních tekutin bude věnována praktická část této práce.

2.3 Toxicita nanočástic

V současné době vzrůstá produkce a využití nanočástic téměř ve všech odvětvích lidské činnosti. Nanočástice přírodního i antropogenního původu se stávají běžnou součástí našeho životního prostředí, a proto je velmi důležité věnovat zvláštní pozornost jejich chování při interakcích s živými organismy [16], [17], [18].

Při převodu látky z makro nebo mikro rozměrů do rozměrů v nano měřítku dochází k významné změně fyzikálně – chemických vlastností (optických, magnetických, mechanických a elektrických) [16], [17].

Dále dochází k významným změnám reaktivity povrchu, která má velký význam při interakcích nanočástic s živými organismy [19]. Pokles velikosti částic je spojen s nárůstem jejich celkového povrchu a významným zvýšením jeho reaktivity [16]. Další vlastnosti, které ovlivňují chování částic a jejich toxicitu, jsou povrchový náboj, chemické složení povrchu, tvar povrchu, schopnost agregace a aglomerace [16], [19], [20], [21]. Nanočástice často obsahují zbytky reziduí (stabilizátory, dispersní činidla, enkapsulovaný materiál apod.), které také ovlivňují jejich toxicitu. Důležitou vlastností nanočástic je také jejich tvar a fyzikální forma, která může být amorfní nebo krystalická.

2.3.1 Vstup nanočástic do organismu

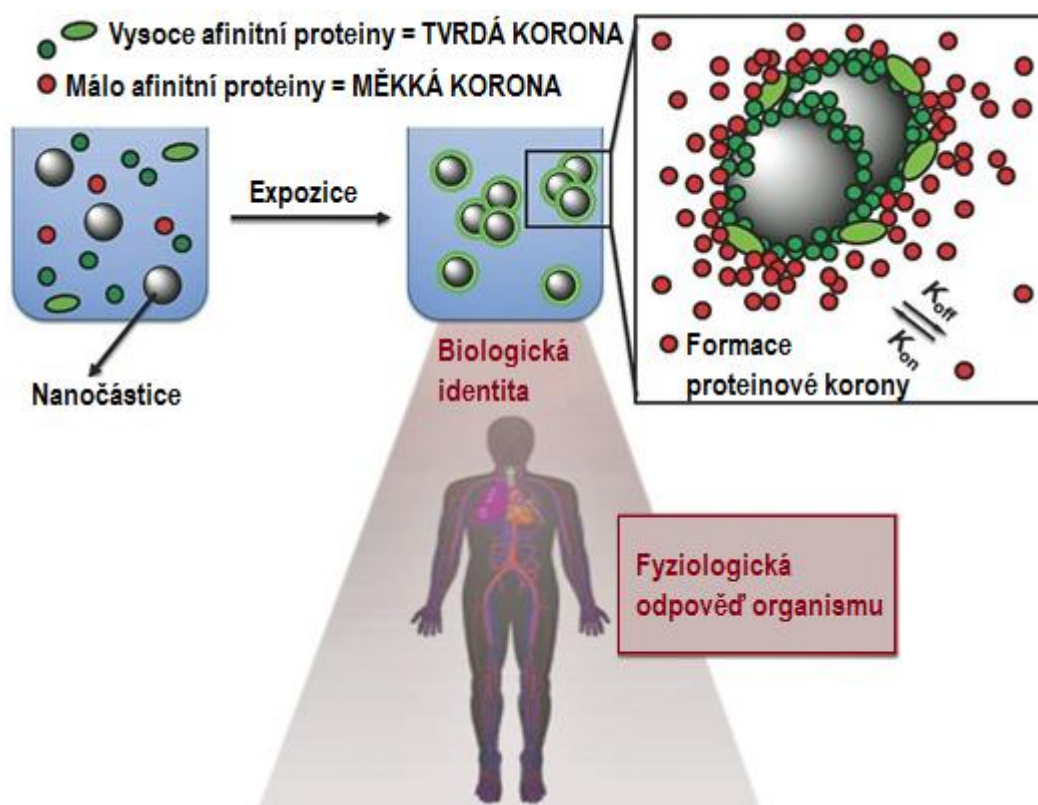
Velmi důležitý faktor, který ovlivňuje toxicitu nanočástic, je místo kudy daná nanočástice pronikne do organismu neboli druh expozice. Nanočástice do organismu nejčastěji pronikají kůží, dýchacími cestami, trávicím traktem nebo přímo do krevního řečiště [22].

Ukázalo se, že nanočástice mají schopnost translokace do jiných orgánů. V závislosti na druhu expozice mohou pronikat například do jater, sleziny, srdce, CNS apod. [16], [22].

2.3.1.1 Vznik korony

Nanočástice se v biologických systémech nikdy nevyskytují holé. Po vstupu nanočástic do organismu dochází, díky vysoké reaktivitě jejich povrchu, k interakcím s vnitřním prostředím organismu (tělními tekutinami). Důsledkem těchto interakcí je vznik tzv. proteinové korony. Korona je obal proteinů, obsažených v tělních tekutinách, který se vytváří na povrchu nanočástic. To, jaká korona vznikne, závisí na velikosti a tvaru

nanočástice, dále také na jejím chemickém složení a povrchovém náboji [19], [20]. Na nanočástici se zpočátku váží proteiny s menší afinitou, které jsou postupně vyměňovány za proteiny s vyšší afinitou tak, aby bylo dosaženo rovnováhy s vnitřním prostředím. Po čase se na povrchu nanočástice vytvoří pevně vázaný obal proteinů – tvrdá korona, který je pro každou nanočástici specifický. Na povrchu tvrdé korony jsou slabě vázané proteiny, které jsou často vyměňovány s volnými proteiny vyskytujícími se v okolním prostředí. Tyto proteiny jsou označovány jako měkká korona [20], [23]. Obrázek 3 znázorňuje vznik proteinové korony na povrchu nanočástic.



Obrázek 3 Interakce nanočástic s živým organismem – vznik korony. Převzato a upraveno z [24].

2.3.2 Imunitní odpověď organismu na vstup nanočástic

Osud nanočástice v organismu závisí především na její velikosti a chemické povaze povrchu. Malé nanočástice snadno migrují do tkání a mohou vyvolávat toxický účinek mnohem dál od místa vstupu než větší nanočástice. Malé nanočástice jsou zároveň snadněji vylučovány.

Nanočástice je, v ideálním případě, po vstupu do organismu rozpoznána jako cizorodá látka a dochází k její opsonizaci. Jedná se o proces navázání určitých látek – opsoninů (imunoglobuliny, např.: IgG) na povrch antigenu – nanočástice, který zvyšuje účinnost fagocytózy imunitními buňkami [16], [17], [25]. Další možností je obalení nanočástic specifickými proteiny, které jsou rozeznávány dalšími buňkami. Druh interagujícího proteinu obvykle závisí na velikosti a tvaru nanočástice. U nerozpustných nanočástic může dojít při vhodném pH k jejich rozpuštění [17]. Tyto interakce mají význam před začátkem zánětlivé reakce organismu.

Při vzniku zánětu jsou vylučovány cytokiny. Tyto látky patří mezi základní regulátory imunitního systému, jedná se o proteiny vylučované leukocyty a jinými buňkami, které působí pomocí specifických receptorů na buňky imunitního systému nebo mimo něj [26].

2.3.3 Mechanismy toxického účinku nanočástic

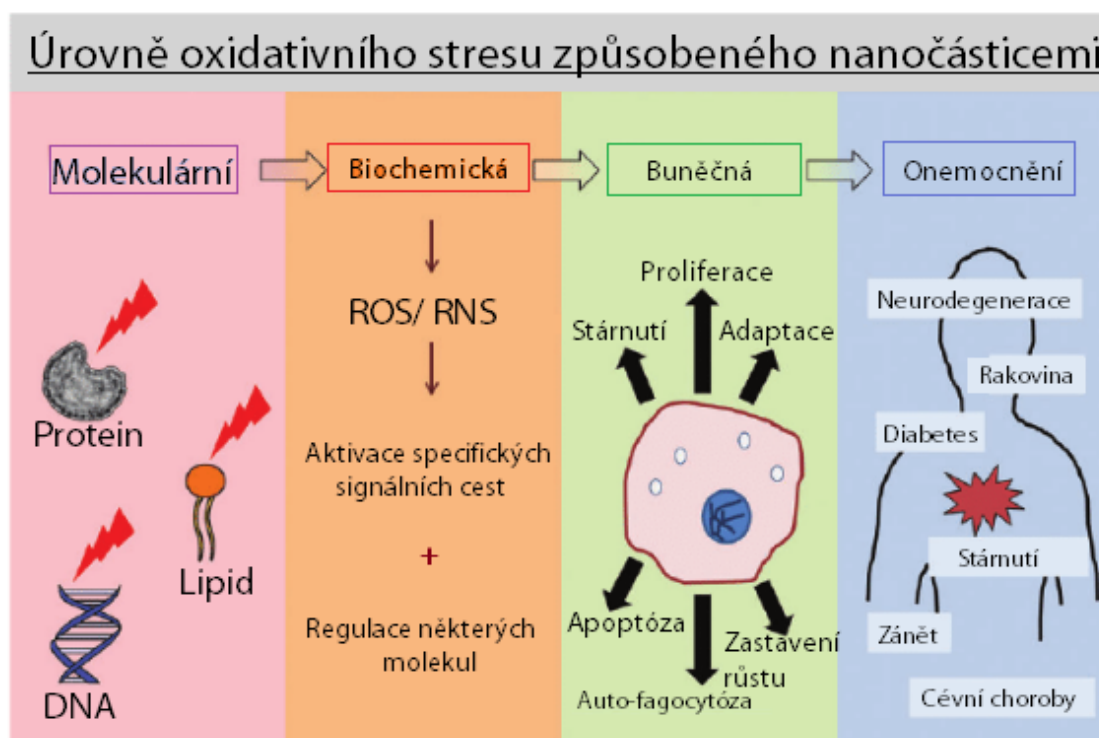
Již bylo zmíněno, že nanočástice mají schopnost pronikat do organismu a transportovat se do různých tkání a orgánů. V případě, že se tak stane, mohou nanočástice pronikat v závislosti na velikosti skrz buněčnou membránu do buněk a působit řadou různých mechanismů vedoucích k jejich poškození. Tyto mechanismy zahrnují produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), reaktivních forem dusíku (RNS) a zánětlivé odpovědi buněk vedoucí k poškození buněčných membrán, poškození DNA, dysfunkci mitochondrií, narušení buněčného cyklu nebo buněčné smrti – apoptóze. Některé nanočástice mohou ovlivňovat signalizační dráhy buňky a způsobovat tak specifickou buněčnou odpověď. Jiné nanočástice zvyšují produkci ROS tak, že aktivují buňky zajišťující zánětlivé odpovědi – neutrofilů a makrofágy [17], [27], [28].

2.3.3.1 Oxidativní stres

Pokud se organismus nachází v homeostázi, pak existuje rovnováha mezi antioxidanty a oxidanty (ROS, RNS). Při porušení této rovnováhy vzniká oxidativní stres, který je způsoben nadměrnou produkcí oxidantů nebo snížením antioxidantních schopností organismu [27], [28].

Dostupné studie poukazují na úzkou souvislost mezi expozicí nanomateriálů a stimulací produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku, které vedou ke vzniku oxidativního stresu ve tkáních. ROS a RNS zahrnují látky, které mají ve své valenční sféře alespoň jeden nespárovaný elektron, např.: superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$, peroxid H_2O_2 , hydroxidový radikál OH^{\cdot} , oxid dusnatý NO^{\cdot} , nitroxid NO , peroxyinitrit $ONOO^-$ a další. Díky své vysoké reaktivitě nespecificky atakují bio makromolekuly (nukleové kyseliny, proteiny, sacharidy a lipidy) a způsobují poškození na molekulární úrovni [27], [28]. Toto poškození stimuluje další produkci oxidantů. Podle míry oxidativního stresu jsou aktivovány signalizační dráhy (např. signalizační dráha vedoucí k apoptóze buňky) nebo dochází k transkripci genů (např. anti-oxidační enzymy, cytokiny).

Oxidativní stres vyvolán nanočásticemi může způsobovat poškození organismu na několika úrovních v závislosti na jeho míře (viz. Obrázek 4).



Obrázek 4 Úrovně oxidativního stresu vyvolaného nanočásticemi. Převzato a upraveno z [27].

2.4 Křemičité nanomateriály

Materiály na bázi oxidu křemičitého jsou již desetiletí využívány ve zdravotnictví při výrobě doplňků stravy, bandáží, katétrů a implantátů, zubních výplní a kontaktních čoček. Všechny tyto aplikace jsou všeobecně považovány za bezpečné a biokompatibilní [29], [30].

Křemičité nanomateriály jsou biokompatibilní, netoxické a snadno funkcionalizovatelné, dále jsou hydrolyticky nestabilní a v čase se rozpouští na slabou vodorozpustnou kyselinu tetrahydrogenkřemičitou (H_4SiO_4 , pKa 9,6) [31]. Díky těmto vlastnostem představují velmi slibný materiál pro farmaceutické a biomedicínské aplikace. V posledních letech jsou prováděny intenzivní výzkumy pro aplikace křemičitých nanomateriálů v systémech dopravování léčiv [32], v genové terapii [33], v molekulárním zobrazování [34] a v tkáňovém inženýrství pro regeneraci kostní tkáně [35]. Vzhledem k rostoucímu počtu biomedicínských aplikací křemičitých nanomateriálů je nezbytně nutné zabývat se jejich potenciálními riziky a chováním v biologických systémech.

2.4.1 Toxicita křemičitých nanočástic

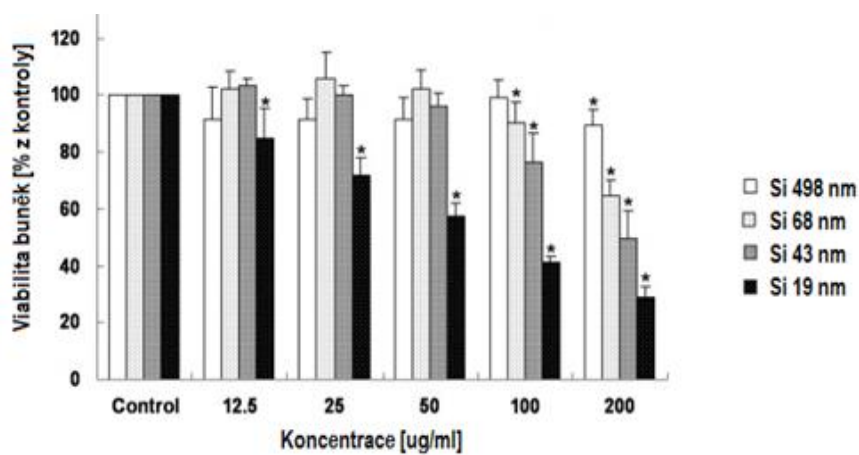
Potenciál toxického účinku křemičitých nanočástic, dále jen SNP, je závislý především na: krystalinitě, velikosti, tvaru, chemické čistotě a rozpustnosti, toto potvrzuje několik studií [29], [36], [37], [38].

Ještě do nedávna byl výzkum toxicity SNP věnován především jejich krystalickým formám. Ty jsou v odborné literatuře shodně spojovány se vznikem chronických onemocnění plic, jako je silikóza, pneumokonióza, fibróza a rakovina [36], [37], [39], [40].

Amorfní křemičité nanočástice jsou považovány za netoxické a v současné době jsou využívány např. v kosmetice, potravinářských aditivech i v systémech pro dopravování léčiv. Stále však neexistují jasná ustanovení týkající se jejich cytotoxicity, genotoxicity a karcinogenity. Provedené *in vitro* studie se shodují, že jejich cytotoxický nebo genotoxický účinek je závislý na velikosti, dávce, čase působení a typu buněčné linie [41], [42], [43], [44], [45].

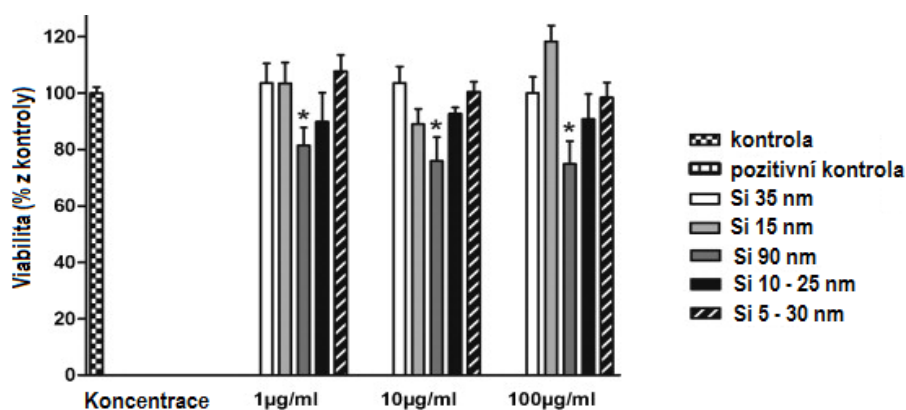
Li a kol. [45] provedl studii cytotoxického účinku amorfních SPN o velikostech v rozmezí 19 nm – 498 nm na lidské hepatické buňky. Výsledek jejich studie je shodný s ostatními *in vitro* studii cytotoxicity. Graf 3 znázorňuje závislost viability lidských hepatických buněk (HepG2) na velikosti a koncentraci amorfních SPN po 24 hodinách expozice. Viabilita buněk byla měřena pomocí WST-8 testu. Výsledkem studie byl důkaz, že viabilita buněk HepG2 klesá s rostoucí koncentrací nanočástic. Dále se ukázalo, že při koncentraci 200 µg/ml jsou toxické všechny typy testovaných SPN [45].

Graf 3 Viabilita lidských hepatických buněk HepG2 po 24 hodinách v závislosti na velikosti a koncentraci SNP [45].



Uboldi a kol. [46] provedl studii cytotoxického účinku amorfních SPN o velikostech v rozmezí 17 nm – 80 nm na buněčných kulturách myších fibroblastů Balb/3T3. Výsledek jejich studie je, že amorfní SPN nevyvolaly cytotoxický ani genotoxický účinek. Graf 4 znázorňuje závislost viability myších fibroblastů Balb/3T3 na velikosti a koncentraci amorfních SPN po 72 hodinách expozice. Viabilita buněk byla měřena pomocí MTT testu.

Graf 4 Viabilita myších fibroblastů Balb/3T3 po 72 hodinách v závislosti na velikosti a koncentraci amorfních SNP [46].



Z těchto dvou studií je patrné, že velmi záleží na designu prováděného experimentu. Uboldi a kol. nepracoval s koncentrací 200 µg/ml, která se ukázala být toxická pro všechny velikosti SNP ve studii týmu Li a kol. [45]. Nejednotnost testů toxicity nanomateriálů je všeobecným problémem.

SNP mohou proniknout do buňky různými cestami a rozptýlit se v cytoplazmě nebo v buněčném jádře. Bylo zjištěno, že mechanismus jejich toxického účinku je založený na produkci ROS [45], [47], [48].

2.4.2 Biodegradabilita křemičitých nanočástic

Křemičité nanočástice hydrolyticky degradují ve vodě nebo ve fyziologickém prostředí za vzniku primárně vodorozpustné kyseliny tetrahydrogenkřemičité H_4SiO_4 , která se přirozeně vyskytuje v organismu. Tato kyselina je však nestabilní (mimo extrémně alkalického prostředí) a rychle polykondenzuje na vyšší kyseliny polykřemičité až koloidní hydratovaný oxid křemičitý. Kyselina tetrahydrogenkřemičité se v organismu podílí na mineralizaci kostní tkáně, syntéze kolagenu, dále se její stopové množství nachází v kůži, vlasech a nehtech [31].

Rychlost degradace SNP je obvykle stanovena pomocí přímé kvantifikace obsahu křemíku v degradačním médiu pomocí atomové emisní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou (ICP/ AES) nebo pomocí optické emisní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou (ICP/ OES) [31], [49], [50].

2.4.3 Příjem a distribuce křemičitých nanočástic v organismu

Křemičité nanočástice do organismu nejčastěji pronikají kůží, dýchacími cestami, trávicím traktem nebo nitrožilně. V závislosti na způsobu vstupu do organismu se SNP mohou dále distribuovat do ostatních tkání a orgánů. Mechanismus distribuce a vzdálenost, kterou SNP urazí v organismu od místa vstupu, závisí na jejich fyzikálně – chemických vlastnostech a velikosti.

Několik *in vivo* studií prováděných na potkanech ukazuje, že SNP aplikované nitrožilně mají tendenci se akumulovat v játrech, slezině, ledvinách a plicích [51], [52], [53]. Majoritní množství SNP je akumulováno v játrech a slezině. Tato skutečnost je za prvé dána vlnitou strukturou endotelu jater a sleziny, který umožňuje pasivní zachycení cizích částic, a za druhé hojnou přítomností makrofágů v těchto orgánech. Ukázalo se, že akumulace nanočástic je závislá na typu buněk s tím, že makrofágy vykazují mnohem vyšší afinitu k nanočásticím než buňky epitelu, což je hlavním důvodem vyšší akumulace SNP v játrech a slezině [52], [54].

Podobné výsledky distribuce SNP přinášejí *in vivo* studie, kde došlo k orálnímu podávání nanočástic. Orálně podávané SNP jako první vstupují do trávicího traktu, kde jsou v závislosti na velikosti a povrchovém náboji absorbovány nebo vylučovány. Absorbované SNP poté vstupují do krevního řečiště, kde dochází k jejich následné distribuci do ostatních orgánů (játra, slezina, ledviny a plíce) [50], [55].

Kůže je největší orgán lidského těla a odděluje vnitřní prostředí organismu od vnějšího. Několik *in vivo* studií prováděných na potkanech ukazuje, že SNP mohou pronikat kůží. Například u SNP o velikosti 70 nm aplikovaných na kůži po dobu 3 dnů došlo k jejich průniku a usazení v lymfatických uzlinách [56]. Aplikace SNP po dobu 28 dnů vedla k jejich distribuci do mozku a jater [57]. Aplikace SNP o velikosti 20 nm po dobu 90 dnů se ukázala být bezpečná, bez vedlejších účinků a bez známek akumulace v orgánech [58].

2.4.4 Eliminace křemičitých nanočástic z organismu

Křemičité nanočástice, stejně jako ostatní cizorodé látky, mohou podléhat a podléhají v organismu biotransformacím, přičemž produktem biotransformačních procesů je biokompatibilní kyselina tetrahydrogenkřemičitá a produkty její polykondenzace. Křemičité nanočástice a jejich produkty rozkladu mohou být z těla vylučovány močí a stolicí [54]. Mechanismus eliminace SNP z organismu je závislý na jejich velikosti, tvaru a způsobu vstupu do organismu.

Orálně přijaté SNP vstupují do zažívacího traktu, tudíž je většina vyloučena stolicí. Menší část, která byla vstřebána přes sliznici střeva do krve, se dostává do ledvin a močových cest a je následně vyloučena močí [50].

Křemičité nanočástice, které rovnou vstupují do krevního řečiště, jsou vylučovány převážně močí. Rychlost eliminace pak závisí na velikosti. Bylo ukázáno, že menší SNP (<50 nm) se v moči i ve stolici vyskytují ve vyšších koncentracích a jsou eliminovány z organismu rychleji než větší SNP (>100 nm). Větší SNP jsou totiž zachycovány makrofágy, a tudíž dochází ke zpomalení jejich eliminace z organismu. Ke kompletní eliminaci SNP z organismu došlo po 4 týdnech [54].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Výchozí produkty

3.1.1 Křemičitá nanovlákna

Při testech jsem používala křemičitá nanovlákna s označením S01/ 6-1 vyrobená na Technické univerzitě v Liberci. Nanovlákna byla připravena metodou elektrostatického zvlákňování solu připraveného metodou sol – gel a následně byla tepelně stabilizována při teplotách 180 °C v elektrické sušárně nebo 550 °C po dobu 2 hodin v muflové peci s teplotním rozptylem ± 3 °C. Po dvou hodinách byla tepelně stabilizovaná nanovlákna vložena do pouzdra z pevného alobalu, aby nedošlo k jejich kontaminaci.

3.1.2 Simulované tělní tekutiny

Simulované tělní tekutiny umožňují lépe porozumět mechanismům rozpouštění a potenciálnímu chování křemičitých nanovláken *in vivo*, a tedy umožňují lépe odhadnout jejich biodurabilitu. Simulované tělní tekutiny byly zvoleny z hlediska aplikací křemičitých nanovláken v medicíně, a to především jako obvazový materiál pro léčbu ran a jako materiál určený k eliminaci srůstů (např. v břišní dutině).

Pro testování byly vybrány následující simulované tělní tekutiny: krevní plazma, synoviální tekutina, tekutina tlustého střeva, extracelulární plicní tekutina (pH 7,4), intracelulární plicní tekutina (pH 5,4), simulovaný pot (pH 4,5; pH 5,4), fyziologický roztok. Jako standardizační testy jsem provedla testy rozpustnosti křemičitých nanovláken v destilované vodě.

Všechny uvedené simulované tělní tekutiny jsem připravovala podle souhrnné studie, kde je uveden podrobný návod na jejich přípravu [13]. Použité chemikálie jsou uvedeny v tabulce (viz. Tabulka 2). Konkrétní složení a navážky pro přípravu simulovaných tělních tekutin jsou k dispozici v příloze (viz. Příloha č. 13).

Všechny potřebné navážky jsem vážila na laboratorních vahách s přesností na čtyři až pět desetinných míst. Simulované tělní tekutiny jsem připravila smícháním navážek v čerstvé destilované vodě.

Tabulka 2 Seznam použitých chemikálií.

Název	Chemický vzorec	Dodavatel
Citronan sodný dihydrát	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$	Chemapol
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH_2PO_4	Penta
Glycin ≥ 99 %	$C_2H_5NO_2$	Sigma-Aldrich
Hovězí sérový albumin (BSA) $M_w=66$ kDa		Sigma-Aldrich
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a.	$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	Penta
Hydrogenfosforečnan disodný p.a.	Na_2HPO_4	Penta
Hydrogenuhličitan sodný p.a.	$NaHCO_3$	Penta
Hydroxid sodný p.a.	$NaOH$	Penta
Chlorid amonný	NH_4Cl	Lachema
Chlorid draselný p.a.	KCl	Penta
Chlorid hořečnatý hexahydrát p.a.	$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Penta
Chlorid sodný 99,5 % p.a.	$NaCl$	Roth
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	$CaCl_2$	Lachner
Chlorid vápenatý dihydrát p.a.	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	Penta
Kyselina citrónová bezvodá p.a.	$C_6H_8O_7$	Lachner
Kyselina hyaluronová	$(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$	Hugo Čapek
Kyselina chlorovodíková	1 M HCl	Lachema
L-laktát sodný ≈ 98 %	$C_3H_5NaO_3$	Sigma-Aldrich
Močovina	$CO(NH_2)_2$	Chemapol
Octan sodný p.a.	$C_2H_3NaO_2$	Lachema
Pyruvát sodný ≥ 99 %	$C_3H_3NaO_3$	Sigma-Aldrich
Síran hořečnatý	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Lachner
Síran sodný p.a.	Na_2SO_4	Penta
Šťavelan vápenatý	CaC_2O_4	Chemapol
Tris(hydroxymetyl)aminometan 99,8 %	$(HOCH_2)_3CNH_2$	Sigma-Aldrich
Vinan sodný dihydrát	$C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich

3.2 Popis experimentů

3.2.1 Statické testy rozpustnosti

Statické testy rozpustnosti křemičitých nanovláken jsem provedla s nanovláknými tepelně stabilizovanými při 180 °C nebo při 550 °C v simulovaných tělních tekutinách, fyziologickém roztoku a v čerstvé destilované vodě. Seznam všech použitých tělních tekutin s jejich kódovým označením je uveden dále (viz. Tabulka 3).

Z tepelně stabilizovaných nanovláken jsem připravila navážky o hmotnostech $m = (20,0 \pm 0,5)$ mg. Jednotlivé navážky jsem následně umístila do uzavíratelných PET lahviček o objemu $V = 250$ ml.

Do PET lahviček se vzorky tepelně stabilizovaných nanovláken jsem přidala 200 ml vybrané tekutiny předehřáté na 37 °C. Takto připravené lahvičky jsem následně vložila do předem vytemperované vodní lázně s třepačkou, přičemž teplota vodní lázně byla 37 °C.

Podle časového plánu jsem z PET lahviček pomocí injekční stříkačky odebírala vždy 10 ml média. Odebraný roztok jsem poté přefiltrovala přes nylonový filtr nasazený na injekční stříkačku (dodavatel Fisher Scientific, spol. s.r.o.) s póry o průměru 0,45 μ m do uzavíratelného plastového kontejneru o objemu $V = 15$ ml. Tím byla odstraněna případná stržená nerozpuštěná křemičitá nanovlákná. Takto odebrané vzorky jsem posílala na chemickou analýzu pomocí OES/ ICP, kde byl stanoven obsah křemíku ve vzorcích.

Po posledním odběru jsem zkontrolovala, zda v PET lahvičce zůstal nerozpuštěný zbytek vzorku nanovláken, pokud ano, vyjmula jsem nerozpuštěný vzorek z PET lahvičky, dvakrát ho propláchla v destilované vodě, jednou v izopropylalkoholu a nechala vyschnout. Suché vzorky jsem uložila do uzavíratelných plastových kontejnerů pro následné vyhodnocení pomocí SEM.

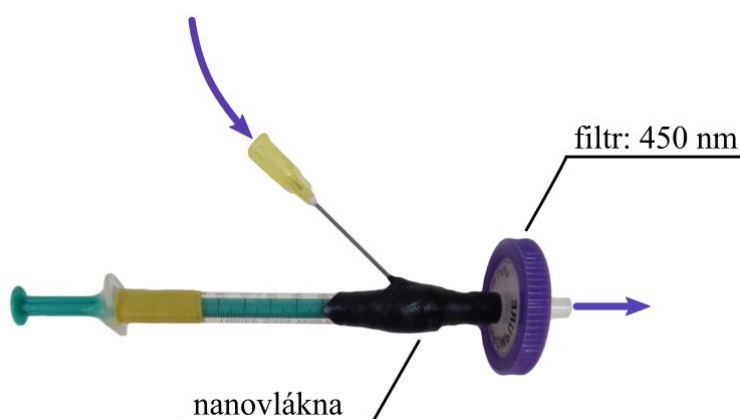
Tabulka 3 Seznam a označení simulovaných tekutin pro statické testy rozpustnosti.

Označení	Tekutina
A	Krevní plazma
B	Synoviální tekutina
C	Tekutina tlustého střeva
D	Extracelulární plicní tekutina (Gambleho roztok) pH 7,4
E	Intracelulární plicní tekutina pH 4,5
F	Pot pH 4,5
G	Pot pH 5,4
H	Moč
I	Fyziologický roztok NaCl 8,5 g/l (čerstvý)
J	Fyziologický roztok NaCl 8,5 g/l (s obsahem CO ₂)
K	Fyziologický roztok NaCl 5,0 g/l (čerstvý)
L	Tris – HCl pufr pH 7,2
M	Čerstvá destilovaná voda

3.2.2 Dynamické testy rozpustnosti

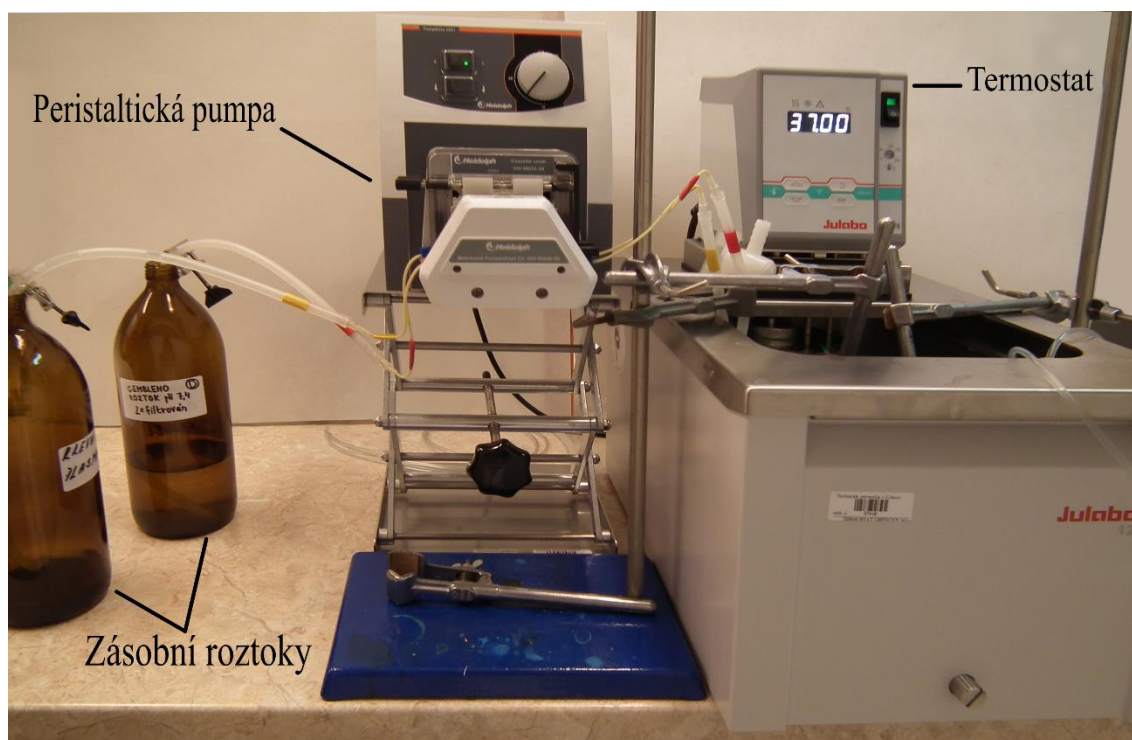
Dynamické testy rozpustnosti křemičitých nanovláken jsem provedla s nanovláknou tepelně stabilizovanými při 180 °C v simulované krevní plazmě (A) a v simulované extracelulární plicní tekutině (Gambleho roztok) pH 7,4 (D).

Z tepelně stabilizovaných nanovláken při 180 °C jsem připravila navážky o hmotnostech $m = (5,0 \pm 0,5)$ mg. Takto připravené navážky jsem umístila do speciálně připravené průtokové komory opatřené nylonovým filtrem (dodavatel Fisher Scientific, spol. s.r.o.) s póry o velikosti 450 nm. (viz. Obrázek 5), který zajišťoval odstranění případných stržených nerozpuštěných křemičitých nanovláken.



Obrázek 5 Průtoková komora

Připravené průtokové komory s nanovláknny jsem poté napojila do okruhu sestávajícího se z nádržky s příslušnou simulovanou tekutinou, peristaltické pumpy, míchané vodní lázně s ponořenou delší plastovou hadičkou pro předeřtátí simulované tekutiny napojenou na průtokovou komoru a jímacího zařízení na filtrát. Celá sestava je na Obrázek 6. Rychlost průtoku simulovaných tělních tekutin se pohybovala v rozmezí hodnot 1,6 – 26,4 ml/hod.



Obrázek 6 Aparatura dynamického testu

Jednotlivé odběry vzorků jsem prováděla v předem určených časových intervalech, doba odběru filtrátu do jímajícího zařízení (uzavíratelný plastový kontejner o objemu $V = 15$ ml) byla vždy 30 minut. Takto odebrané vzorky jsem posílala na chemickou analýzu pomocí OES/ICP, kde byl stanoven obsah křemíku ve vzorcích.

Mezi jednotlivými odběry vzorků jsem jímala filtrát do velké zásobní plastové lahve, abych byla schopná určit celkovou objemovou bilanci a celkové množství rozpuštěného SiO_2 . Po ukončení experimentu jsem takto získaný filtrát důkladně promíchala a odebrala vzorek o objemu $V = 10$ ml, který jsem poslala na chemickou analýzu pomocí OES/ICP spolu s ostatními vzorky.

3.3 Metody charakterizace

3.3.1 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza tepelně nezpracovaných křemičitých nanovláken byla provedena na přístroji Netzsch STA 449F1 na Trenčianskej univerzitě Alexandra Dubčeka v Trenčíně, Slovensko (operátor doc. Ing. Alfonz Plško, CSc.). Měření bylo provedeno v rozsahu 20 až 810 °C rychlostí 1 °C/min.

3.3.2 Optická emisní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou

Stanovení obsahu oxidu křemičitého ve vzorku bylo provedeno metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou. K analýze byl použit přístroj ICP/OES Optima 2100DV Perkin Elmer v laboratoři chemických sanačních procesů CXI (operátoři Ing. P. Parma a H. Pohreichová). Měření bylo provedeno v axiálním uspořádání, s výkonem generátoru 1500 W (pracovní frekvence generátoru je 40 MHz). Návaznost byla zajištěna prostřednictvím referenčních materiálů firmy Analytika Praha. Ke všem operacím byla pro ředění použita ultra čistá voda o rezistivitě $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ připravená na zařízení ELGA.

Na základě opakovaných pokusů s rozpouštěním křemičitých nanovláken a opakovaných analýz bylo stanoveno, že kombinovaná nejistota stanovení Si uvedeným postupem (pro $k_U = 2$) odpovídá hodnotám 0,1 mg Si/dm³ ve výluhu pro koncentrace do 0,5 mg Si/dm³ a 20 rel. % při hodnotách vyšších než 0,5 mg Si/dm³. Po přepočtu na jiná vyjádření to pro koncentrace do 0,5 mg Si/dm³ odpovídá 0,2 mg SiO₂/dm³ resp. 2000 ng/mg resp. 0,2 hmot. % rozpuštěného SiO₂.

3.3.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Snímkování křemičitých nanovláken před a po testech rozpustnosti bylo provedeno na přístroji SEM Zeiss Ultra Plus (operátor Ing. P.Kejzlar, PhD.). Na povrch vzorků byla před snímkováním naprášena velmi tenká vrstva zlata pro odvod náboje.

3.3.4 Měření měrného povrchu adsorpcí kryptonu

Měření bylo provedeno na přístroji Autosorb iQ-KR/MP, který je určen pro měření dusíkové a kryptonové adsorpce. V případě křemičitých nanovláken byl použit krypton (operátor doc. Ing. Petr Exnar, CSc.). Měřeno bylo několik vzorků křemičitých nanovláken tepelně zpracovaných v rozmezí 180 až 800 °C bez patrné závislosti naměřeného měrného povrchu na teplotě tepelného zpracování. Za nejpravděpodobnější hodnotu lze považovat $A = (8,83 \pm 0,30) \text{ m}^2/\text{g}$.

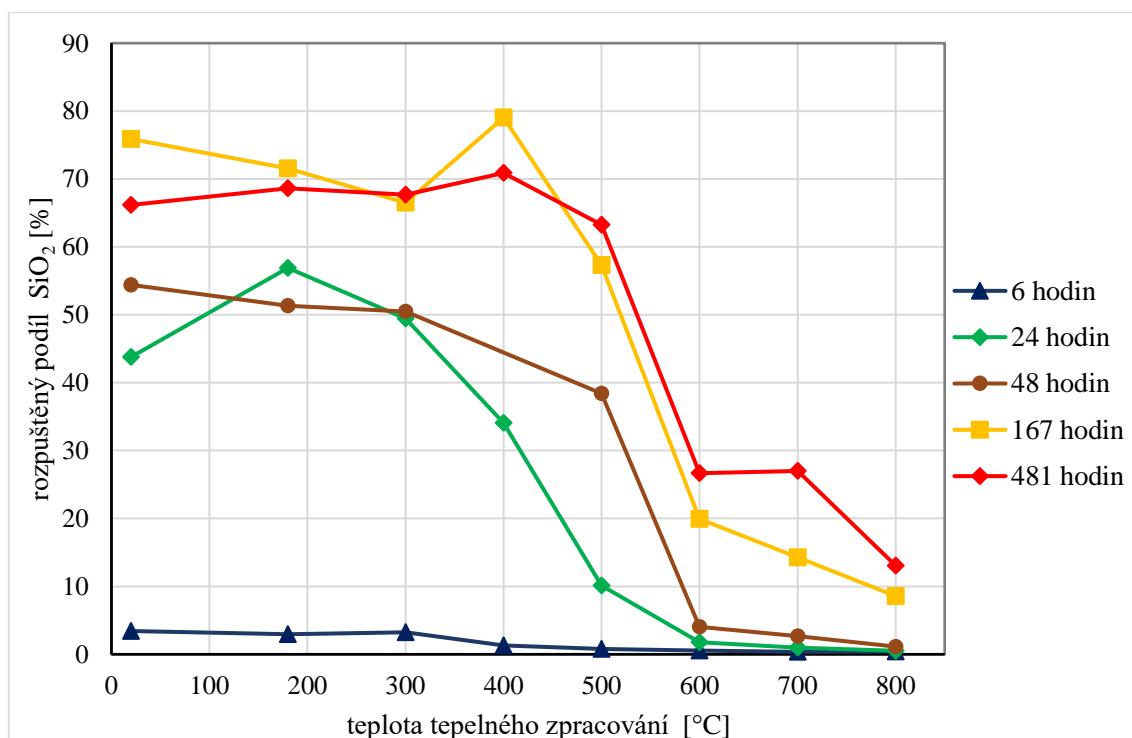
3.4 Výsledky a diskuze

3.4.1 Charakterizace křemičitých nanovláken

Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci [59], ve které jsem se zabývala rychlostmi rozpouštění křemičitých nanovláken ve vodě a fyziologickém roztoku v závislosti na jejich tepelné stabilizaci. Na základě výsledků mé bakalářské práce byly vybrány teploty stabilizace křemičitých nanovláken 180 °C a 550 °C.

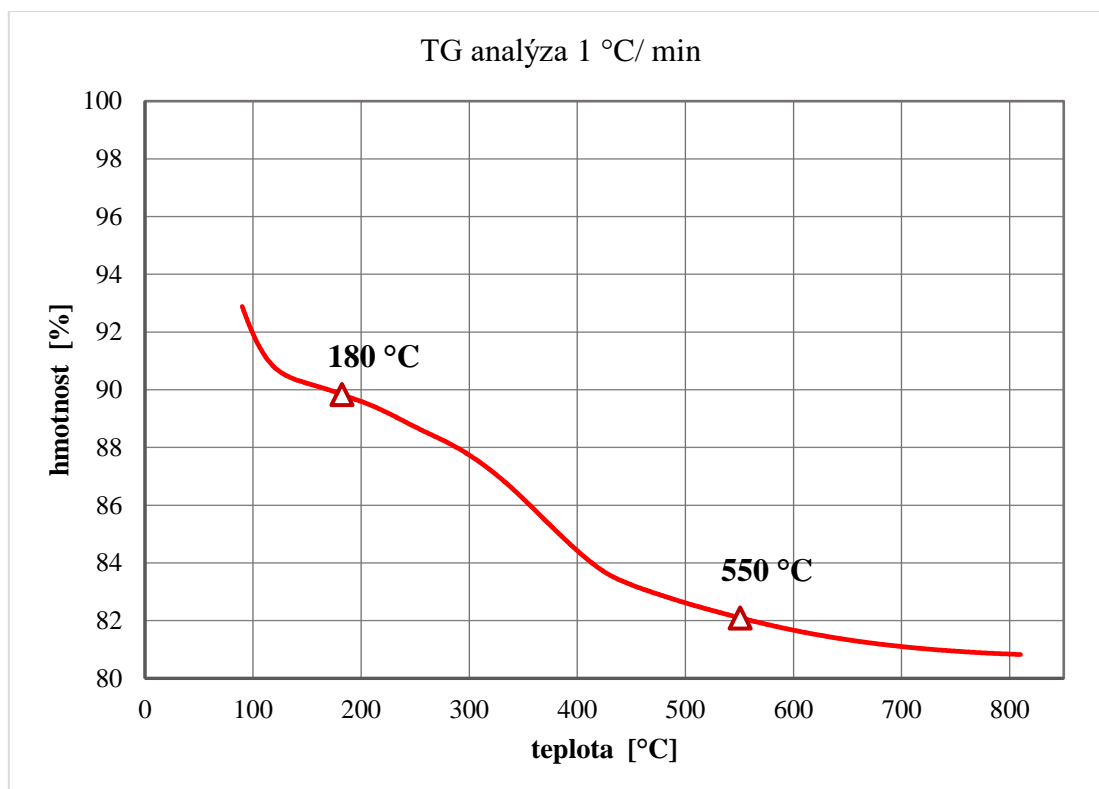
Graf 5 zobrazuje rozpuštěný podíl křemičitých nanovláken v závislosti na jejich tepelné stabilizaci. Z Grafu 5 je patrné, že v rozmezí hodnot tepelné stabilizace 20 až 300 °C se, z hlediska rychlosti rozpouštění, nic významného neděje. Proto byla vybrána teplota stabilizace 180 °C. Dále rozpustnost nanovláken mírně klesá až do 500 °C. Zlom nastává mezi 500 °C a 600 °C, přičemž došlo k významnému poklesu rychlosti rozpouštění nanovláken. Proto byla vybrána teplota stabilizace 550 °C. Při teplotách vyšších než 600 °C nebyla vybrána další teplota stabilizace křemičitých nanovláken, protože při těchto teplotách je rychlost jejich rozpouštění příliš nízká a není zde ani předpoklad jejich praktického využití pro kryty ran (a také je materiál potenciálně karcinogenní).

Graf 5 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na teplotě stabilizace (fyziologický roztok, tj. médium I, 36 °C) [59].

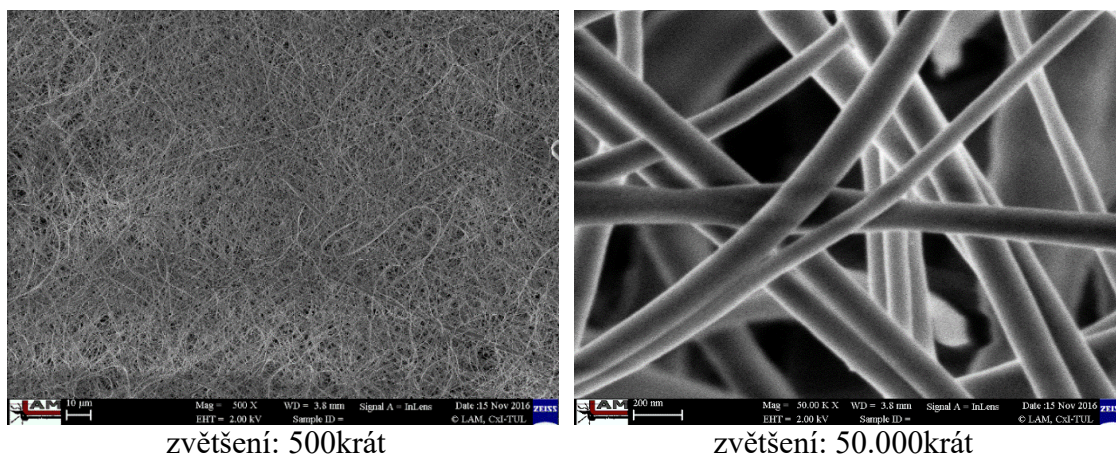


Křemičitá nanovlákna byla před testy rozpustnosti charakterizována pomocí TG analýzy a dále byl vypočítán obsah SiO₂ (při teplotě 800 °C zůstává pouze čistý oxid křemičitý). U nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C byl stanoven obsah SiO₂ 89,95 hm %. Nanovlákna tepelně stabilizována při 550 °C obsahovala 98,47 hm % SiO₂. Výsledky TG analýzy zobrazuje Graf 6.

Graf 6 Výsledky termogravimetrické analýzy křemičitých nanovláken.



Dále bylo provedeno měření specifického měrného povrchu metodou BET s použitím kryptonu, stanovený měrný povrch je $(8,83 \pm 0,30)$ m²/ g. Pro vizuální kontrolu byly pořízeny SEM snímky křemičitých nanovláken, které nebyly vystaveny působení médií (viz. Obrázek 7).



Obrázek 7 Křemičitá nanovlákná, tepelné zpracování 180 °C/2 hod, srovnávací, bez působení medií, SEM, různé zvětšení.

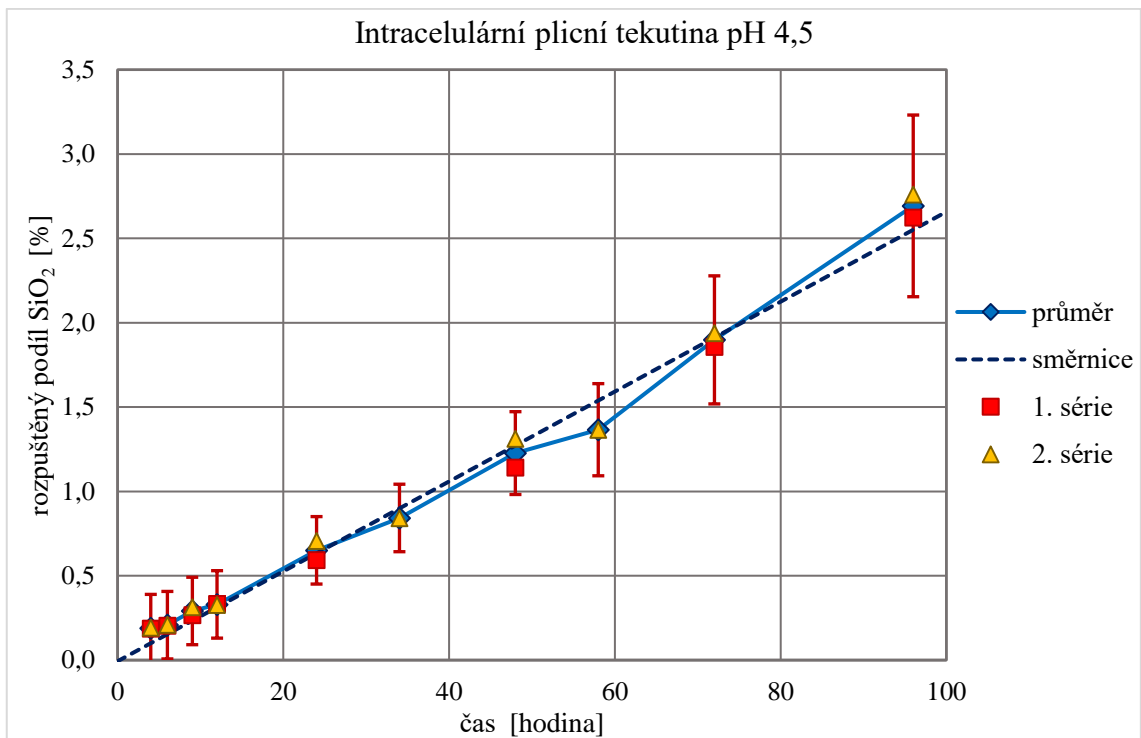
Ze SEM snímků je patrné, že nanovláknenná vrstva je tvořena nahodile uspořádanými nanovláknny jejichž průměry nejsou uniformní. V nanovláknenné vrstvě se vyskytují i silnější vlákna, která zlepšují její mechanické vlastnosti.

3.4.2 Statické testy rozpustnosti

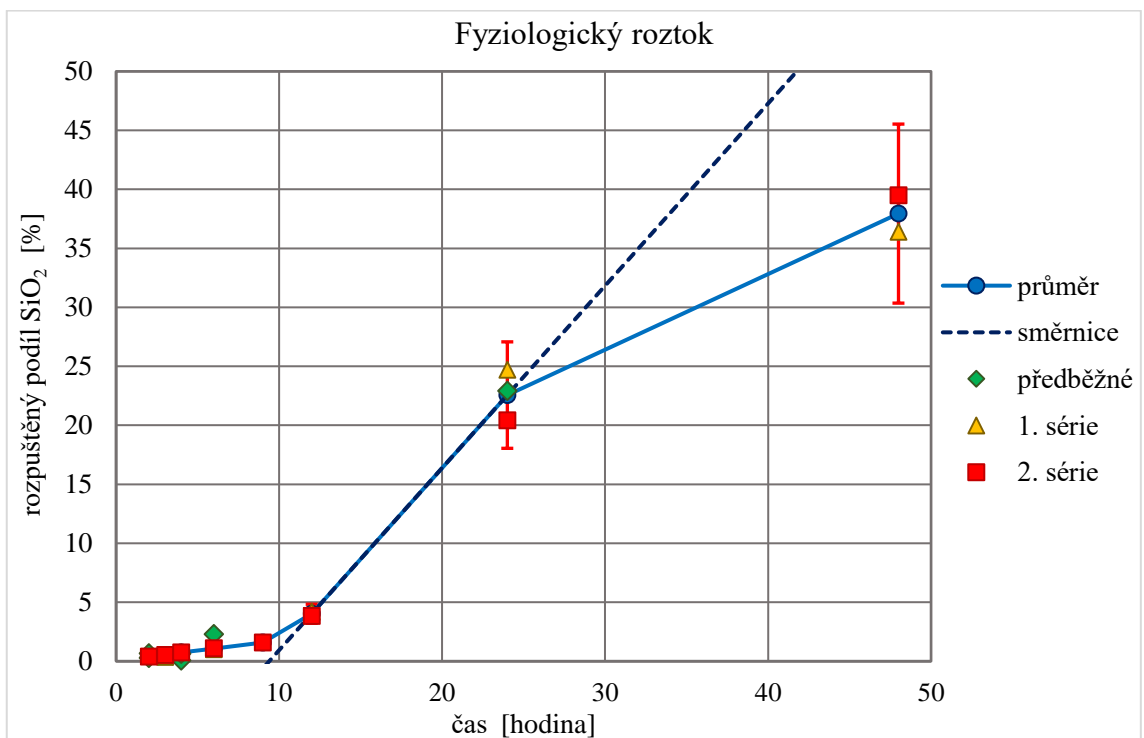
Množství křemíku v jednotlivých časových odběrech bylo stanoveno pomocí ICP/OES a přepočteno na obsah SiO_2 . Rychlosti rozpouštění křemičitých nanovláken v jednotlivých simulovaných tělních tekutinách a poločasy rozpouštění byly vypočteny ze směrnice lineární části grafu, který znázorňuje závislost rozpuštěného podílu oxidu křemičitého na čase. U řady simulovaných tělních tekutin došlo v počáteční fázi rozpouštění křemičitých nanovláken ke zpoždění rozpouštění, které je velmi pravděpodobně důsledkem nutnosti primárního narušení povrchu nanovláken tekutinou. Naopak při vyšších koncentracích SiO_2 v roztoku již dochází k omezení rychlosti vlastního rozpouštění nasycením roztoku až ke zpětnému srážení koloidního SiO_2 zpět na nanovlákná.

Statické testy rozpustnosti poskytly dobře reprodukovatelné výsledky, jejichž přesnost je uvedena v kapitole 3.3.2. Jako příklad reprodukovatelnosti výsledků uvádím Graf 7 a Graf 8, kde se získaná data z jednotlivých experimentů velmi dobře shodují. Malé odchylky výsledků jsou způsobeny náhodnými chybami. Pouze pro synoviální tekutinu nebyly získány reprodukovatelné výsledky, a proto nebyly dále zpracovávány.

Graf 7 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken (180 °C/2 hodiny) na čase, médium E.



Graf 8 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken (180 °C/2 hodiny) na čase, médium I.



Tabulka 4 obsahuje přehled získaných rychlostí rozpouštění a poločasů rozpouštění křemičitých nanovláken, tepelně stabilizovaných při 180 °C nebo 550 °C, pro jednotlivá média. Další text bude věnován výsledkům a diskuzi o chování křemičitých nanovláken v jednotlivých médiích.

Tabulka 4 Přehled vypočtených rychlostí rozpouštění a poločasů rozpouštění křemičitých nanovláken (teplota stabilizace 180 °C nebo 550 °C) pro jednotlivá média.

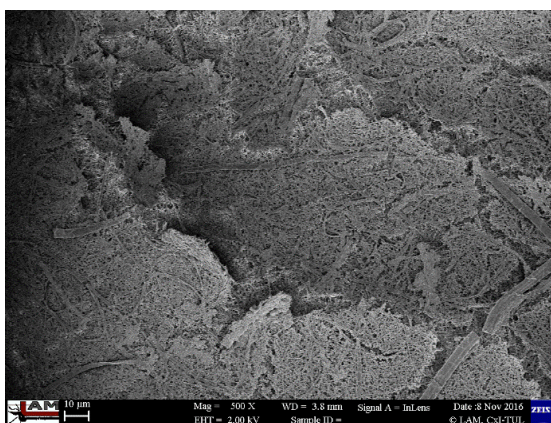
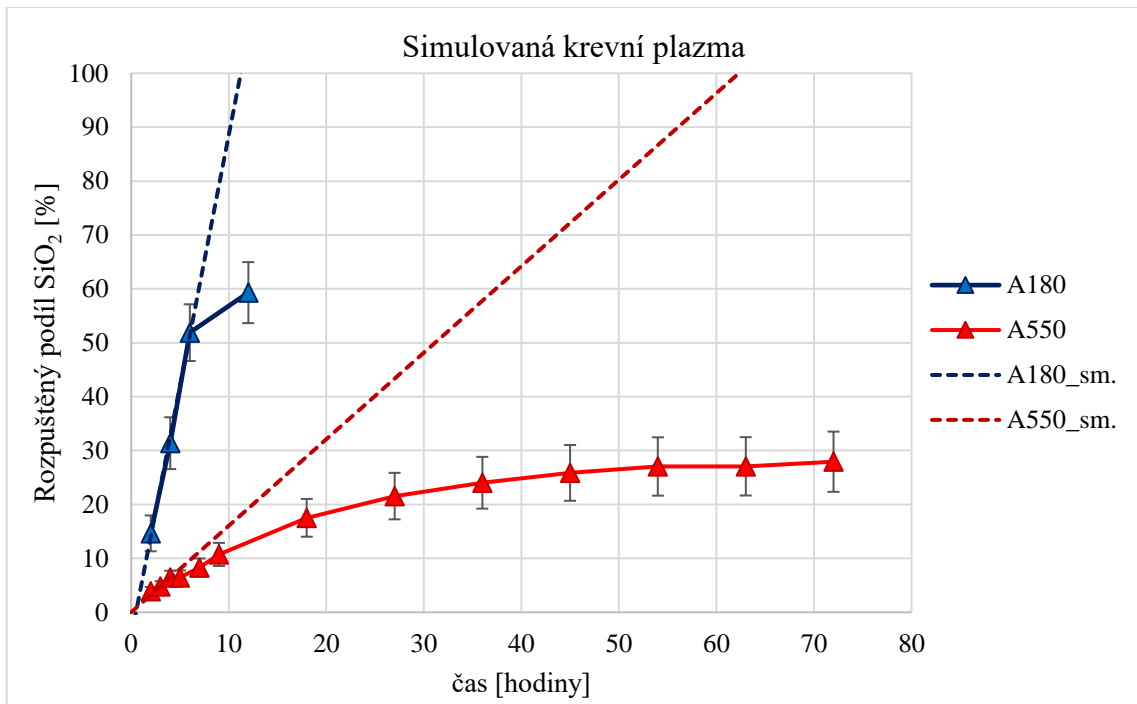
Médium	Teplota stabilizace [°C]	Rychlost rozpouštění [ng/ (cm ² ·hod)]	Poločas rozpouštění [den]
A	180	1054	0,24
	550	182	1,3
C	180	862	0,30
	550	134	1,8
D	180	918	0,26
	550	269	0,88
E	180	3,0	78
	550	0,77	313
F	180	29,2	8,8
	550	1,2	207
G	180	35,4	7,4
	550	0,68	351
H	180	52,5	5,0
	550	21,5	12
I	180	175	1,7
	550	5,8	42
M	180	0,80	295
	550	0,30	778

3.4.2.1 Simulovaná krevní plazma

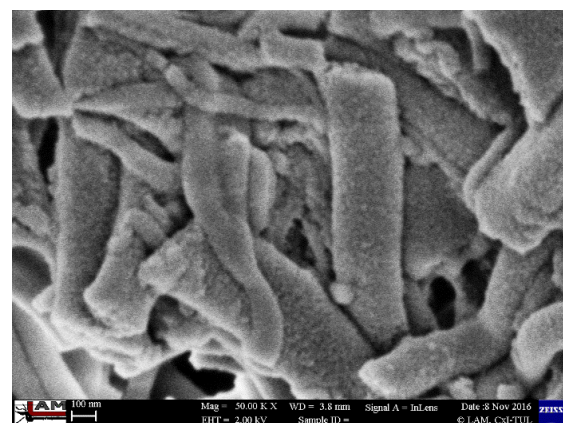
Graf 9 zobrazuje závislost rozpuštěného podílu křemičitých nanovláken na čase, která byla rozpouštěná v simulované krevní plazmě. Z Graf 9 je patrné, že poločas rozpouštění křemičitých nanovláken je závislý na teplotě tepelného zpracování. Stanovený poločas rozpouštění pro nanovlákná stabilizovaná při 180 °C je $t_{1/2} = 0,24$ dne. Nanovlákná stabilizovaná při 550 °C se rozpouštějí pomaleji a mají přibližně 5,3krát vyšší hodnotu poločasu rozpouštění, která činí $t_{1/2} = 1,3$ dne. Velmi nízké poločasy rozpouštění nanovláken v simulované krevní plazmě jsou zřejmě dány mírně zásaditým pH tohoto média, protože je známo, že zásadité pH urychluje degradaci křemičitých materiálů.

Obrázek 8 zobrazuje SEM snímky křemičitých nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C po 6 hodinách loužení v simulované krevní plazmě. Při rozpouštění křemičitých nanovláken v krevní plazmě dochází ke ztrátě integrity nanovláčkové vrstvy a dochází také k výraznému narušení morfologie nanovláken. Následně nanovláčka vlivem média degradují v celém objemu, bobtnají a rozpadají se.

Graf 9 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na čase v krevní plazmě při 180 °C a 550 °C.



zvětšení: 500krát



zvětšení: 50.000krát

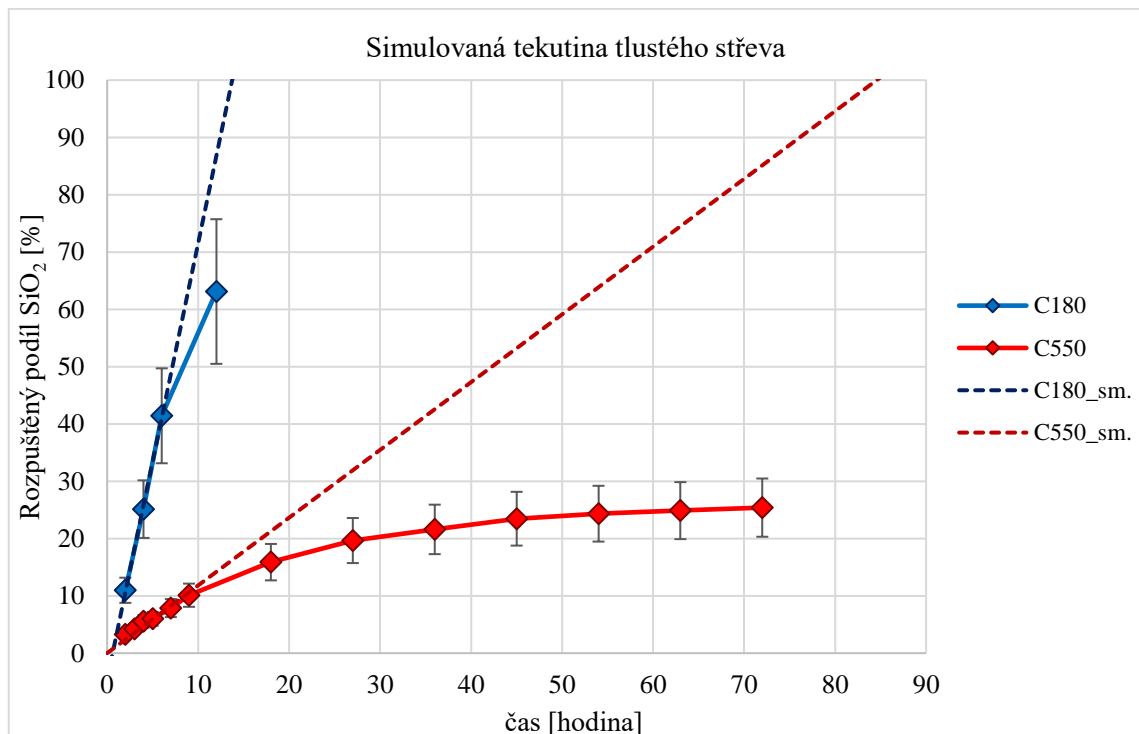
Obrázek 8 SiO₂ nanovláčka – tepelné zpracování 180 °C/2 hod, medium A (krevní plazma), 37 °C, statické působení 6 hodin.

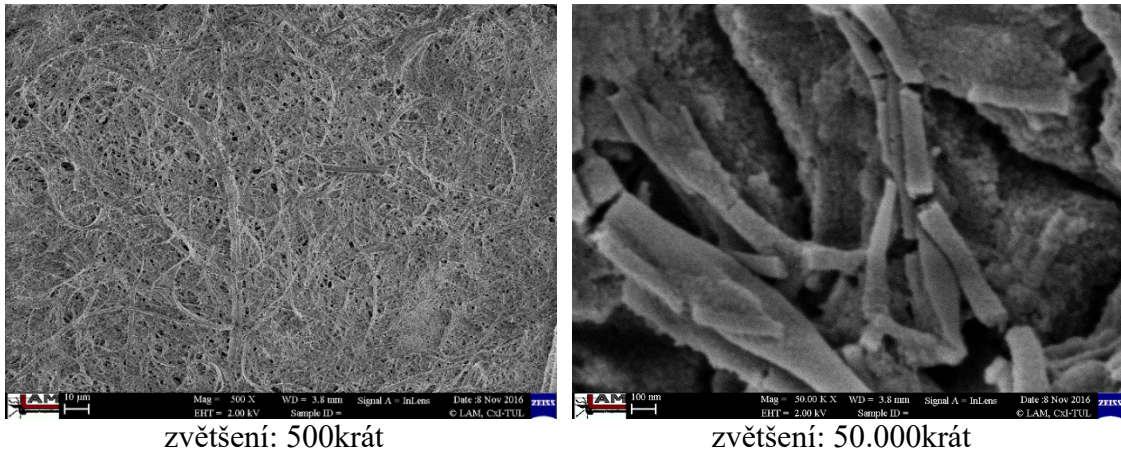
3.4.2.2 Simulovaná tekutina tlustého střeva

Graf 10 zobrazuje závislost rozpuštěného podílu křemičitých nanovláken na čase, která byla rozpouštěná v simulované tekutině tlustého střeva. Podle očekávání mají nanovlákná stabilizovaná při nižší teplotě i kratší poločas rozpouštění, který je $t_{1/2} = 0,30$ dne. Nanovlákná stabilizovaná při vyšší teplotě mají opět delší poločas rozpouštění a to $t_{1/2} = 1,8$ dne. Lze tedy očekávat, že nanovlákná stabilizovaná při 550 °C se budou v tekutině tlustého střeva rozpouštět asi 5,9krát pomaleji než nanovlákná stabilizovaná při 180 °C. Poločasy rozpouštění v simulované tekutině tlustého střeva jsou opět nízké, avšak nepatrně vyšší, než tomu bylo v simulované krevní plazmě, to je zřejmě dáno neutrálním pH tohoto média.

Obrázek 9 zobrazuje SEM snímky křemičitých nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C po 6 hodinách loužení v simulované tekutině tlustého střeva. Nanovlákná vrstva zůstala celistvá, ale vyskytují se zde malé prasklinky. Došlo k porušení morfologie jednotlivých vláken, která vlivem média degradují v celém objemu, lámou se a bobtnají.

Graf 10 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na čase v tekutině tlustého střeva při 180 °C a 550 °C.





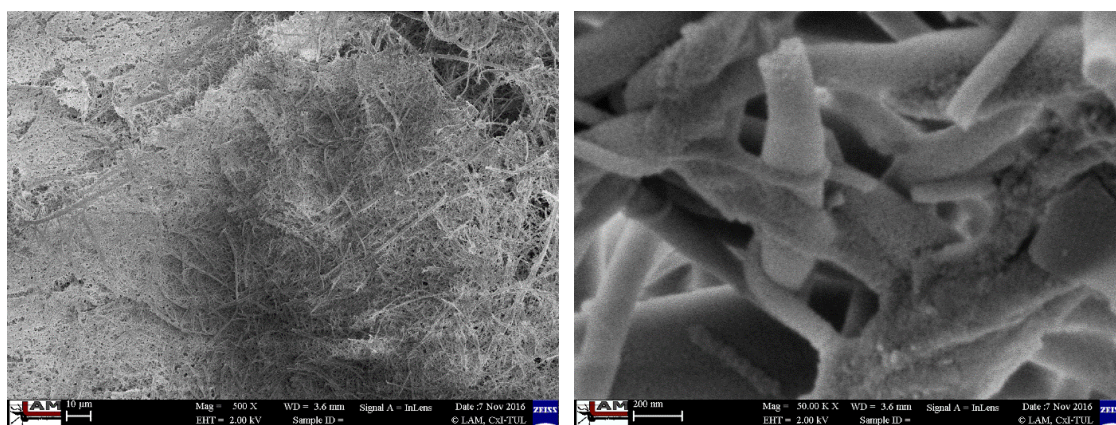
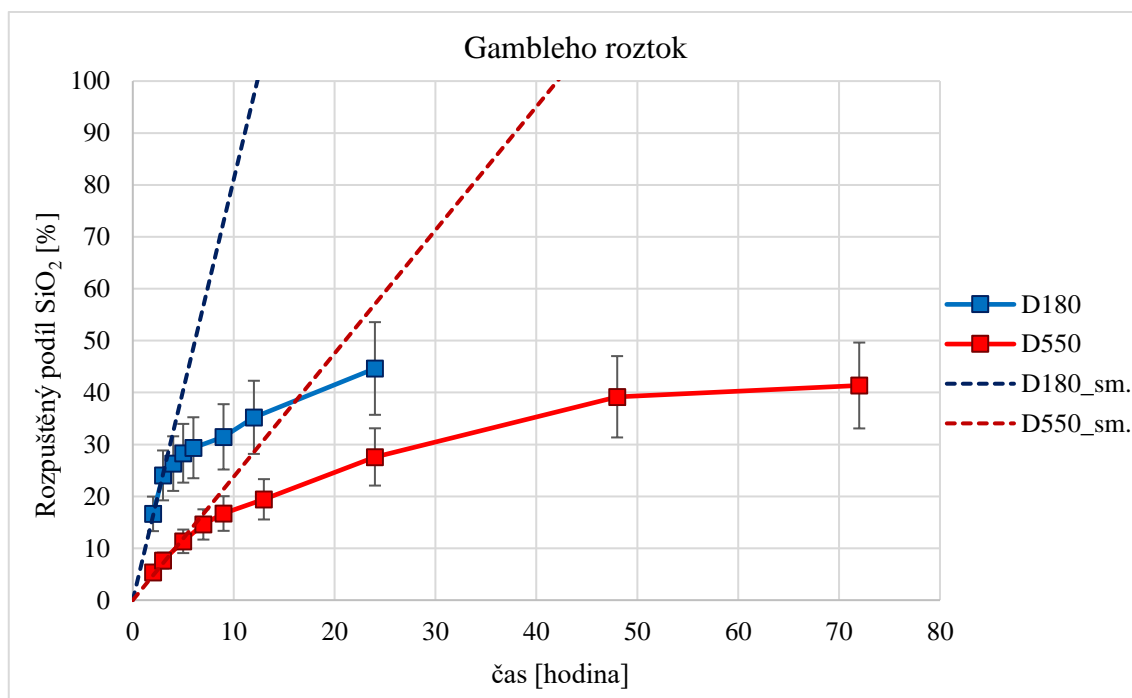
Obrázek 9 SiO₂ nanovláčna – tepelné zpracování 180 °C/2 hod, medium C (tekutina tlustého střeva), 37 °C, statické působení 6 hodin.

3.4.2.3 Extracelulární plicní tekutina (Gambleho roztok)

Graf 11 zobrazuje závislost rozpuštěného podílu křemičitých nanovláken na čase, která byla rozpouštěná v Gambleho roztoku. Nanovláčna, která byla tepelně stabilizovaná při 180 °C mají poločas rozpouštění $t_{1/2} = 0,26$ dne. Nanovláčna s vyšší teplotou stabilizace se rozpouštějí přibližně 3,4krát pomaleji a stanovený poločas rozpouštění činí $t_{1/2} = 0,88$ dne. Díky nízkým hodnotám $t_{1/2}$ dochází k rychlému nárůstu koncentrace hydratovaných forem oxidu křemičitého v médiu. Při vysokých koncentracích oxidu křemičitého v médiu dochází k jeho polykondenzaci a vzniku koloidního roztoku, přičemž může docházet ke zpětnému srážení SiO₂ na nanovláčna. Zpětně vysrážený koloidní SiO₂ lze pozorovat na mnoha SEM snímcích, které jsou uvedeny v příloze (viz. Příloha č. 4). Podobně jako tomu bylo v případě rozpouštění nanovláken v médiu A, respektive C, jsou nízké poločasy rozpouštění způsobeny mírně zásaditým pH Gambleho roztoku.

Obrázek 10 zobrazuje SEM snímky křemičitých nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C po 6 hodinách loužení v Gambleho roztoku. Při rozpouštění se uplatňují podobné mechanismy degradace jako v případě médií A a C. Dochází ke ztrátě integrity nanovláčenné vrstvy, přičemž zároveň dochází k úplnému rozpadu jednotlivých nanovláken. Nanovláčna vlivem média degradují v celém objemu, bobtnají a rozpadají se. Na nanovláčkách se vyskytuje koloidní SiO₂, který je způsoben zpětným srážením při vysokých koncentracích SiO₂ v médiu.

Graf 11 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na čase v Gambleho roztoku při 180 °C a 550 °C.



zvětšení: 500krát

zvětšení: 50.000krát

Obrázek 10 SiO₂ nanovláčna – tepelné zpracování 180 °C/2 hod, medium D (Gambleho roztok), 37 °C, statické působení 6 hodin.

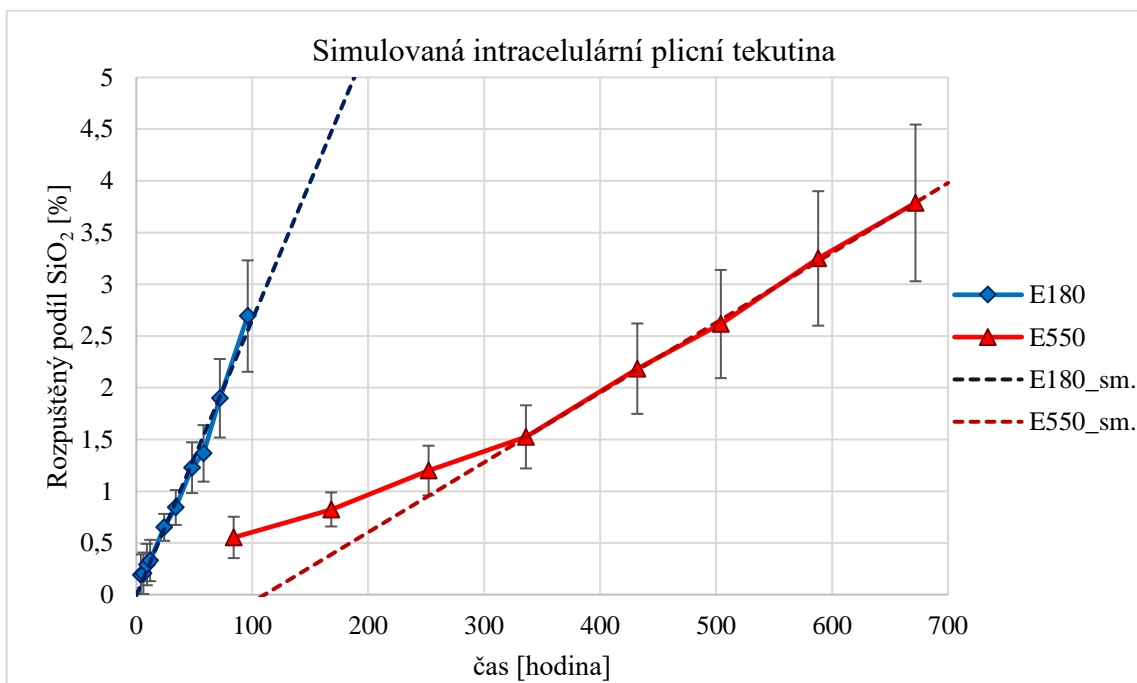
3.4.2.4 Simulovaná intracelulární plicní tekutina

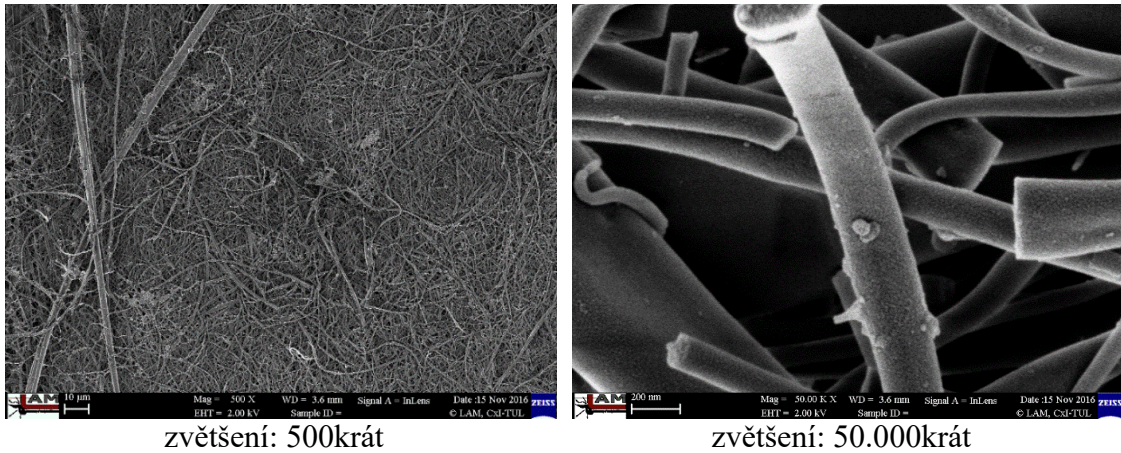
Graf 12 zobrazuje závislost rozpuštěného podílu křemičitých nanovláken na čase, která byla rozpouštěná v intracelulární plicní tekutině. Na rozdíl od extracelulární plicní tekutiny má toto médium kyselé pH, díky kterému došlo k výraznému poklesu rychlosti rozpouštění nanovláken. Tepelně stabilizovaná nanovláčna při 180 °C mají hodnotu

poločasu rozpouštění $t_{1/2} = 78$ dnů. Nanovlákná s vyšší teplotou stabilizace mají 4krát vyšší hodnotu poločasu rozpouštění a to $t_{1/2} = 313$ dnů. Dále u nich v počáteční fázi rozpouštění dochází ke zpoždění rozpouštění, které je pravděpodobně způsobeno nutností primárního narušení povrchu nanovláken.

Obrázek 11 zobrazuje SEM snímky křemičitých nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C po 48 hodinách rozpouštění v médiu E. Při rozpouštění nanovláken v intracelulární plicní tekutině se uplatňuje jiný mechanismus rozpouštění, který je pravděpodobně způsoben kyselým pH tohoto média. Dochází k povrchové degradaci jednotlivých nanovláken, přičemž morfologie zůstává zachována. Lze pozorovat úlomky velmi tenkých nanovláken s ostrými hranami, které zřejmě vznikly v důsledku povrchové degradace nanovlákná. Vzhledem k vysokým hodnotám poločasů rozpouštění a vzniku těchto úlomků je zde vysoké riziko, že by křemičitá nanovlákná mohla způsobovat negativní biologickou odezvu při průniku do intracelulárního prostředí plic. Toto potenciální riziko by bylo potřeba prověřit pomocí *in vivo* testů a výsledky konzultovat s lékaři zabývajícími se danou problematikou.

Graf 12 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na čase v intracelulární plicní tekutině (pH = 4,5) při 180 °C a 550 °C.





Obrázek 11 SiO₂ nanovlákna – tepelné zpracování 180 °C/2 hod, medium E (simulovaná intracelulární plicní tekutina pH 4,5), 37 °C, statické působení 48 hodin.

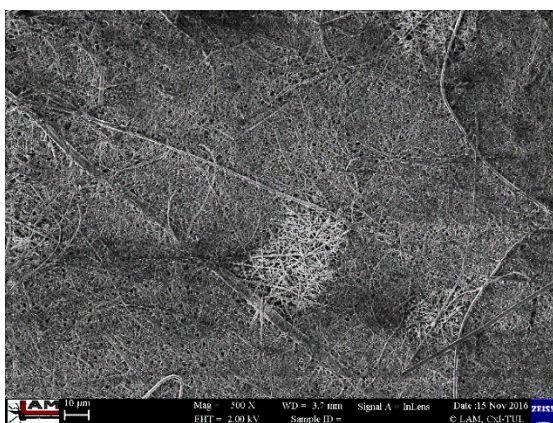
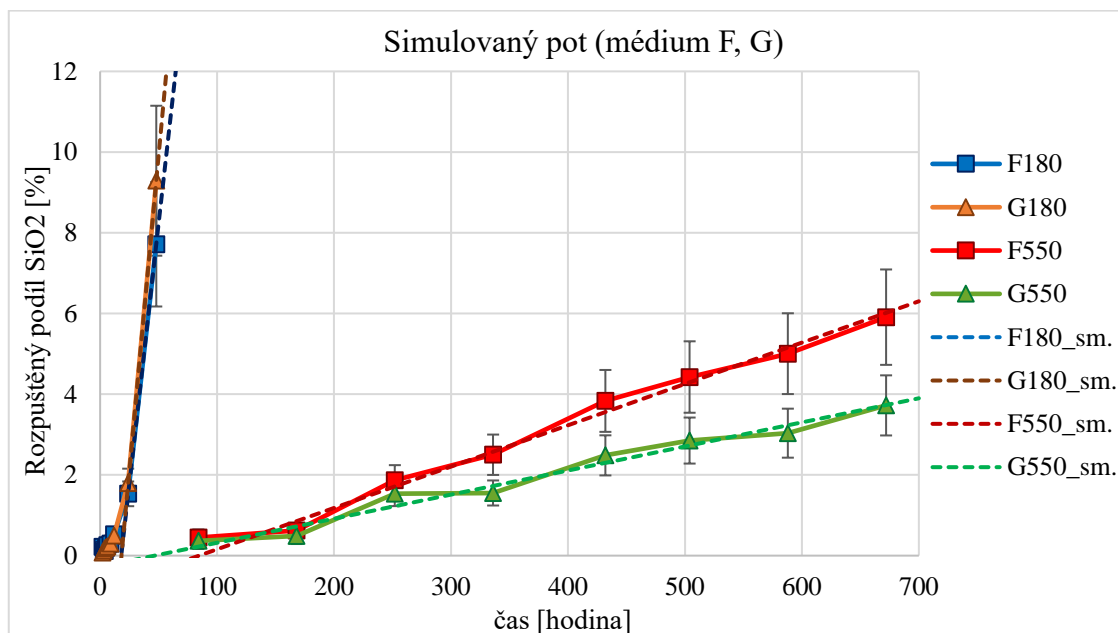
3.4.2.5 Simulovaný pot

Graf 13 zobrazuje závislost rozpuštěného podílu křemičitých nanovláken na čase, která byla rozpouštěná v simulovaném potu o pH 4,5 (medium F) a pH 5,4 (medium G). Z grafu 11 je patrné, že snížení pH média vedlo při teplotě tepelného zpracování 180 °C k určitému zpomalení rozpouštění křemičitých nanovláken. U nanovláken tepelně zpracovaných při 550 °C je však trend opačný. Rozdíly v obou případech se však blíží experimentální chybě, a proto je možné je považovat za velmi blízké. Při rozpouštění nanovláken v simulovaném potu dochází v počáteční fázi rozpouštění ke zpoždění rozpouštění, které je zřejmě způsobeno nutností primárního narušení povrchu nanovláken. Poločas rozpouštění nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C v médiu F je $t_{1/2} = 8,8$ dnů a v médiu G je $t_{1/2} = 7,4$ dnů. Nanovlákna, která byla tepelně stabilizována při 550 °C mají hodnoty poločasů rozpouštění v médiu F $t_{1/2} = 207$ dnů a v médiu G $t_{1/2} = 351$ dnů. Hodnoty poločasů rozpouštění se výrazně liší podle teplot stabilizace. V médiu F se nanovlákna s vyšší teplotou stabilizace rozpouštějí asi 23krát pomaleji, v médiu G dokonce 47krát pomaleji.

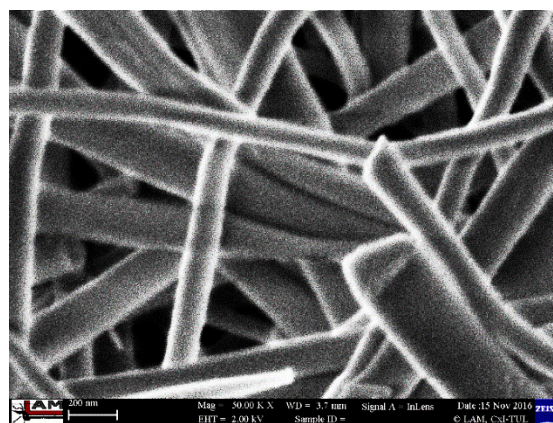
Obrázek 12 zobrazuje SEM snímky křemičitých nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C po 48 hodinách rozpouštění v simulovaném potu (pH 4,5 a pH 5,4). Při rozpouštění křemičitých nanovláken v simulovaném potu nedošlo k narušení integrity nanovláčkové vrstvy a dochází pouze k povrchové degradaci jednotlivých nanovláken. Uplatňuje se zde jiný mechanismus degradace, než tomu bylo v médiích A, C a D, který je zřejmě způsoben kyselým pH médií simulovaného potu. Podobně jako tomu bylo

v médiu E, lze pozorovat úlomky velmi tenkých nanovláken s ostrými hranami. Ukazuje se zde, že pH média nemá vliv pouze na rychlost rozpouštění, ale má zřejmě vliv i na mechanismus degradace křemičitých nanovláken.

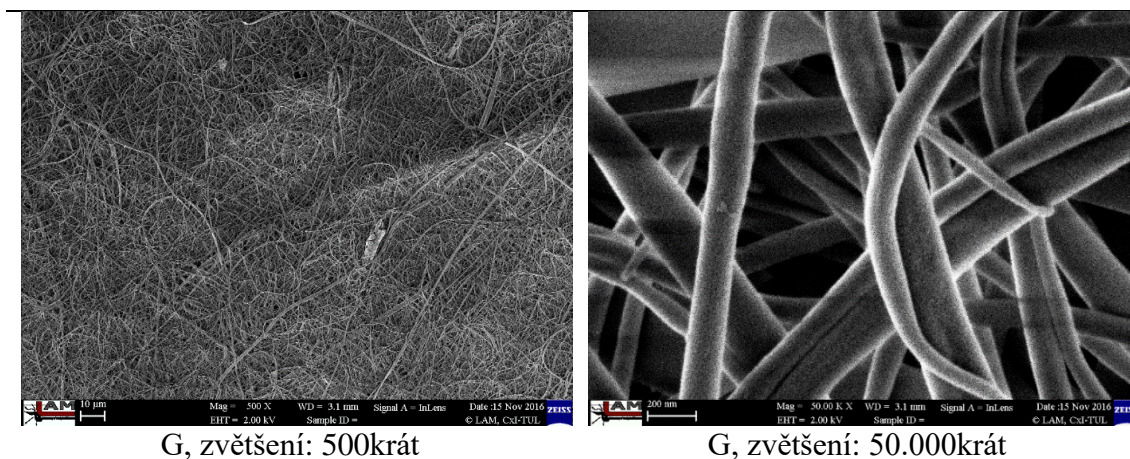
Graf 13 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na čase v simulovaném potu při 180 °C a 550 °C.



F, zvětšení: 500krát



F, zvětšení: 50.000krát



Obrázek 12 SiO₂ nanovláčna – tepelné zpracování 180 °C/2 hod, medium F (simulovaný pot pH 4,5) a medium G (simulovaný pot pH 5,4), 37 °C, statické působení 48 hodin.

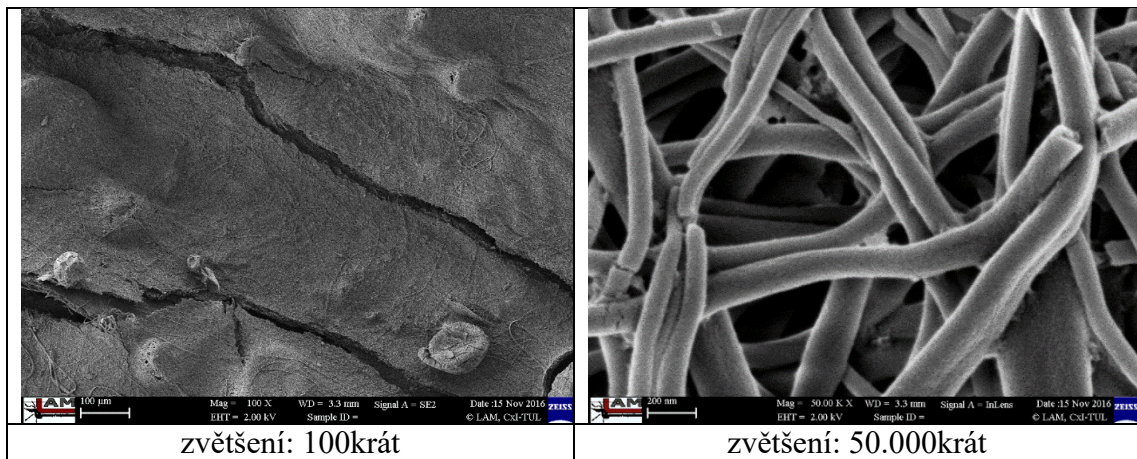
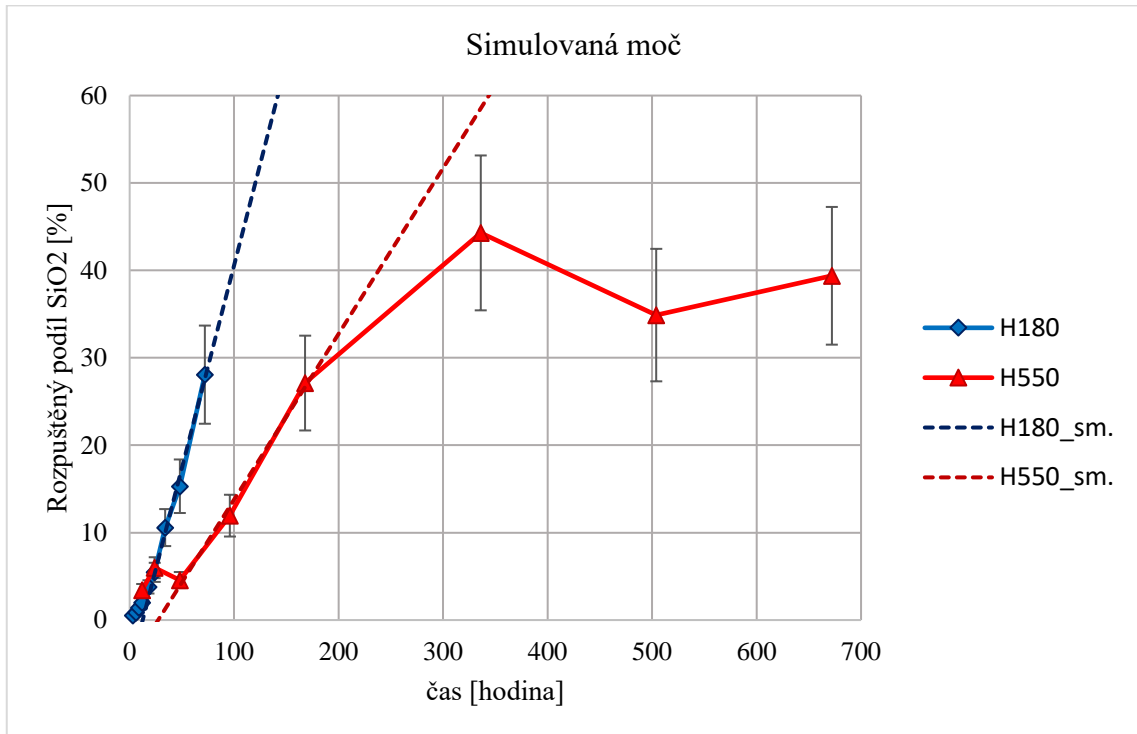
3.4.2.6 Simulovaná moč

Graf 14 zobrazuje závislost rozpuštěného podílu křemičitých nanovláken na čase, která byla rozpuštěná v simulované moči. Fyziologická moč je roztok vody a odpadních látek organismu – metabolitů (především močoviny), solí a dalších organických látek. U zdravého jedince má moč mírně kyselé pH, které se obvykle pohybuje v rozmezí 5 – 6,5 a osmolalitu v rozmezí hodnot 300–900 mOsmol/ kg. Vzhledem k mírně kyselému pH a poměrně vysokému obsahu rozpuštěných látek tohoto média byly očekávány mírně nižší hodnoty poločasů rozpouštění, než tomu bylo v médiích E, F a G. Získané výsledky tuto domněnku potvrdily. Nanovláčna, která byla tepelně stabilizována při nižší teplotě mají stanovený poločas rozpouštění $t_{1/2} = 5,0$ dnů. V případě nanovláken, která byla stabilizována při vyšší teplotě, byla získána hodnota poločasu rozpouštění $t_{1/2} = 12$ dnů. Znamená to, že nanovláčna s vyšší teplotou stabilizace se v simulované moči rozpouští pouze 2,4krát pomaleji.

Obrázek 13 zobrazuje SEM snímky křemičitých nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C po 48 hodinách rozpouštění v simulované moči. V tomto médiu se pravděpodobně uplatňují oba již zmíněné mechanismy degradace. V počáteční fázi rozpouštění zřejmě převažuje povrchová degradace nanovláken a v pozdějších fázích rozpouštění se začíná stále více uplatňovat degradace v celém objemu. Tyto závěry vyplývají z dalších SEM snímků, které jsou uvedeny v Příloze č. 9, kde lze v pozdějších fázích rozpouštění pozorovat změny morfologie nanovláken, které odpovídají degradaci

v celém objemu. Při rozpouštění nanovláken v simulované moči došlo k porušení jejich celistvosti a vytvoření prasklin.

Graf 14 Závislost rozpuštěného podílu SiO_2 nanovláken na čase v simulované moči při 180 °C a 550 °C.



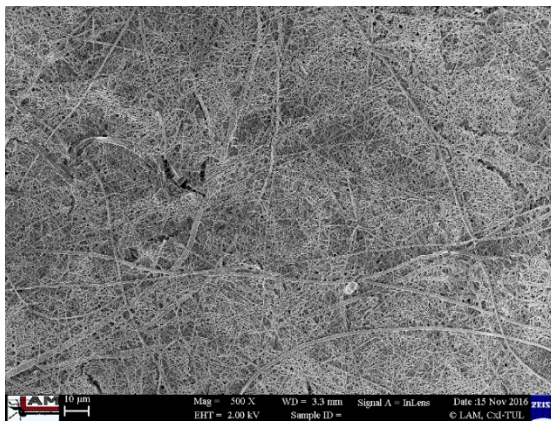
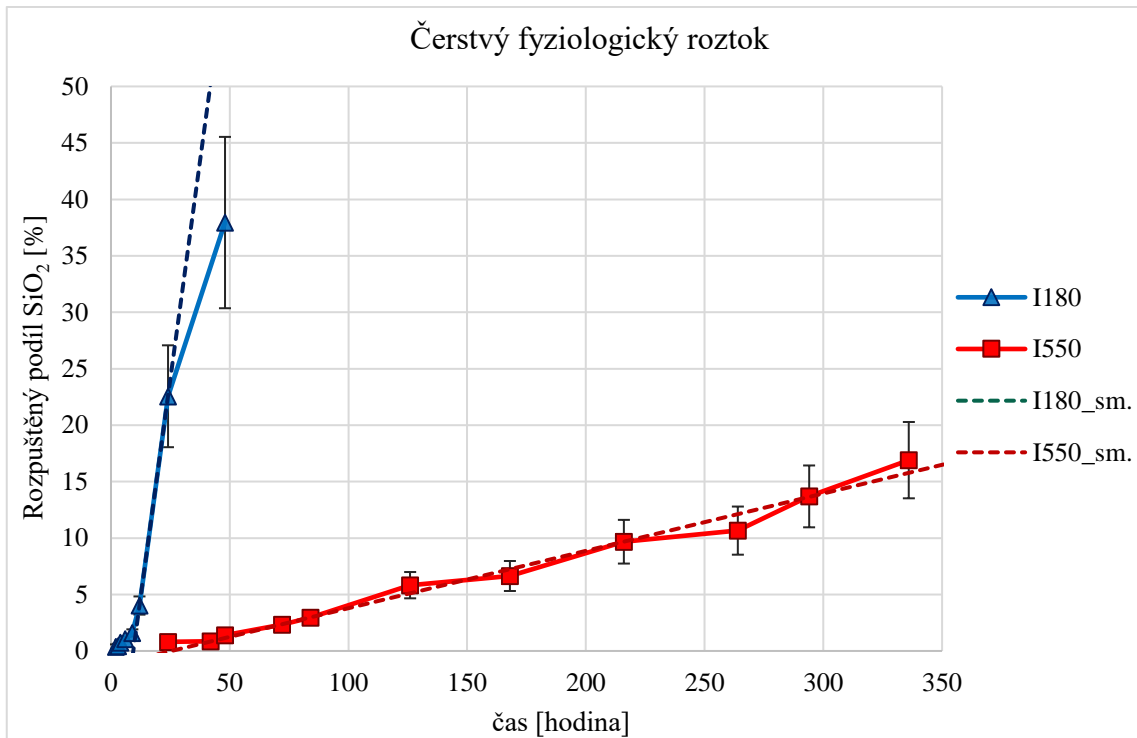
Obrázek 13 SiO_2 nanovláčna – tepelné zpracování 180 °C/2 hod, medium H (simulovaná moč), 37 °C, statické působení 48 hodin.

3.4.2.7 Fyziologický roztok

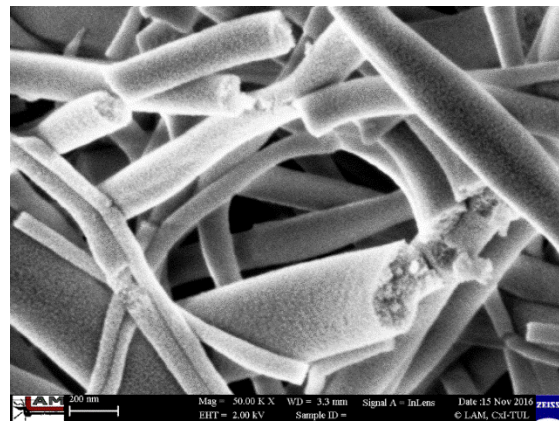
Graf 15 zobrazuje závislost rozpuštěného podílu křemičitých nanovláken na čase, která byla rozpouštěná v čerstvém fyziologickém roztoku. Jedná se o isotonický 0,9% roztok chloridu sodného, který má osmolalitu shodnou s krevní plazmou (308 mOsmol) a jehož pH je neutrální (čerstvý roztok bez obsahu oxidu uhličitého). Dalo by se očekávat, že rychlosti rozpouštění a mechanismus degradace budou v těchto médiích velmi podobné, ale získaná data tuto domněnku nepotvrzují. Nanovlákná s nižší teplotou stabilizace mají stanovený poločas rozpouštění $t_{1/2} = 1,7$ dne, což je 7krát vyšší hodnota, než byla získána v médiu A. Nanovlákná, která byla tepelně stabilizována při vyšší teplotě mají stanovený poločas rozpouštění $t_{1/2} = 42$ dnů, degradují tedy přibližně 32krát pomaleji než v médiu A. Dále u obou teplot stabilizace došlo ke zpoždění počáteční fáze rozpouštění, které pravděpodobně vzniká v důsledku nutnosti primárního narušení povrchu nanovláken. Tento jev nebyl v simulované krevní plazmě pozorován. Vedle určitého rozdílu v pH medií, kde krevní plazma je mírně zásaditější (krevní plazma pH 7,4, fyziologický roztok pH 7,0) hraje pravděpodobně roli přítomnost organických látek v médiu A, které evidentně mají velmi významný vliv na rychlost degradace křemičitých nanovláken.

Obrázek 14 zobrazuje SEM snímky křemičitých nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C po 48 hodinách rozpouštění v čerstvém fyziologickém roztoku. Při rozpouštění nanovláken ve fyziologickém roztoku se uplatňuje mechanismus degradace, který je typický pro média s nižšími hodnotami pH. V tomto případě došlo k porušení celistvosti nanovlákněné vrstvy a výskytu trhlin v nanovlákněné vrstvě. Zachovalá morfologie jednotlivých nanovláken a výskyt úlomků velmi tenkých nanovláken je zřejmě důsledek povrchové degradace.

Graf 15 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na čase v čerstvém fyziologickém roztoku při 180 °C a 550 °C.



zvětšení: 500krát



zvětšení: 50.000krát

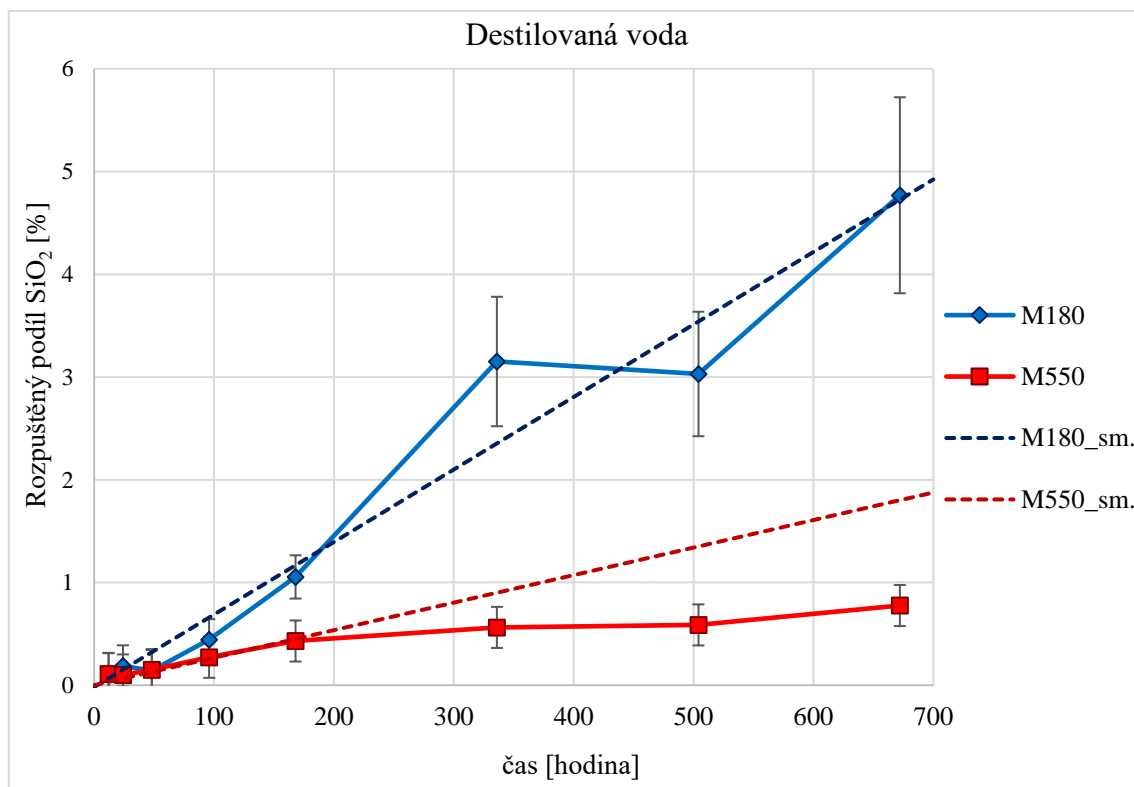
Obrázek 14 SiO₂ nanovláčna – tepelné zpracování 180 °C/2 hod, medium I (čerstvý fyziologický roztok NaCl 8,5 g/ dm³), 37 °C, statické působení 48 hodin.

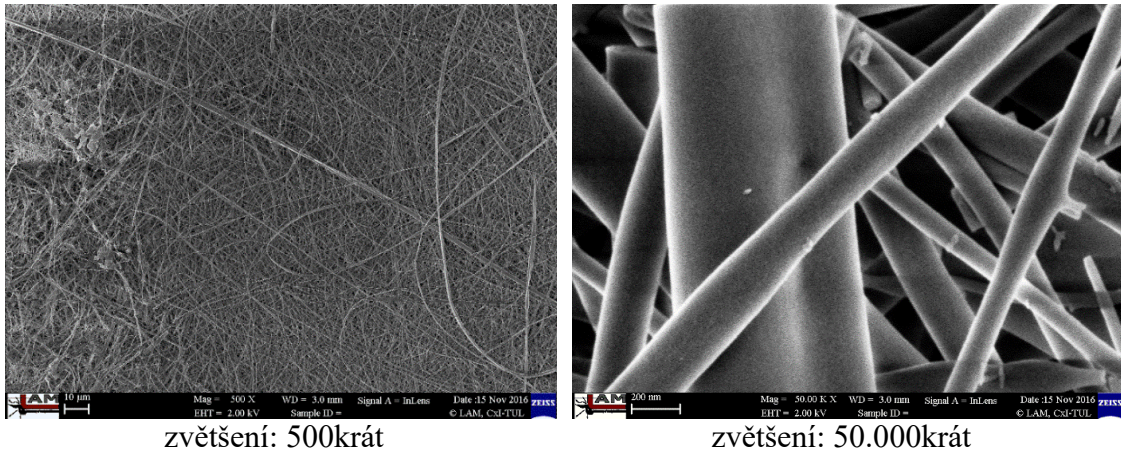
3.4.2.8 Destilovaná voda

Graf 16 zobrazuje závislost rozpuštěného podílu křemičitých nanovláken na čase, která byla rozpouštěná v destilované vodě. Testy rozpustnosti v destilované vodě byly provedeny jako srovnávací testy. Získané rychlosti rozpouštění nanovláken v destilované vodě jsou řádově nižší než v ostatních testovaných médiích. Poločas rozpouštění křemičitých nanovláken, která byla tepelně stabilizována při 180 °C, je $t_{1/2} = 295$ dnů a při 550 °C je hodnota poločasu rozpouštění $t_{1/2} = 778$ dnů. Tyto hodnoty jsou vysoko nad hranicí podmínky zdravotní nezávadnosti, ale v biologických systémech se destilovaná voda nevyskytuje, a proto jsou další závěry irelevantní.

Obrázek 15 zobrazuje SEM snímky křemičitých nanovláken tepelně stabilizovaných při 180 °C po 48 hodinách rozpouštění v destilované vodě. Vzhledem k velmi nízkým rychlostem rozpouštění křemičitých nanovláken v destilované vodě nejsou pozorovatelné jakékoliv změny morfologie. Nanovláčenná vrstva zůstala celistvá bez známek poškození. V destilované vodě se zřejmě uplatňuje mechanismus povrchové degradace nanovláken, který ale není po tak krátkém čase rozpouštění nanovláken pozorovatelný.

Graf 16 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na čase v destilované vodě při 180 °C a 550 °C.





Obrázek 15 SiO₂ nanovláčna – tepelné zpracování 180 °C/2 hod, medium M (destilovaná voda), 37 °C, stacionární působení 48 hodin.

3.4.2.9 Shrnutí statických testů rozpustnosti

Z výsledků statických testů rozpustnosti křemičitých nanovláken vyplynul velmi výrazný rozdíl v rychlosti jejich rozpouštění v závislosti na použitém médiu. Mezi jednotlivými médii se vyskytují až řádové rozdíly. Obecně lze tvrdit, že čím je vyšší hodnota pH, vyšší obsah organických látek a vyšší iontová síla, tím je rychlost rozpouštění vyšší. Nejpomaleji probíhá rozpouštění v destilované vodě. Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje rychlost rozpouštění, se ukázala být teplota stabilizace nanovláken. V tomto případě platí, že vyšší teplota stabilizace vede k výraznému snížení rychlosti rozpouštění nanovláken.

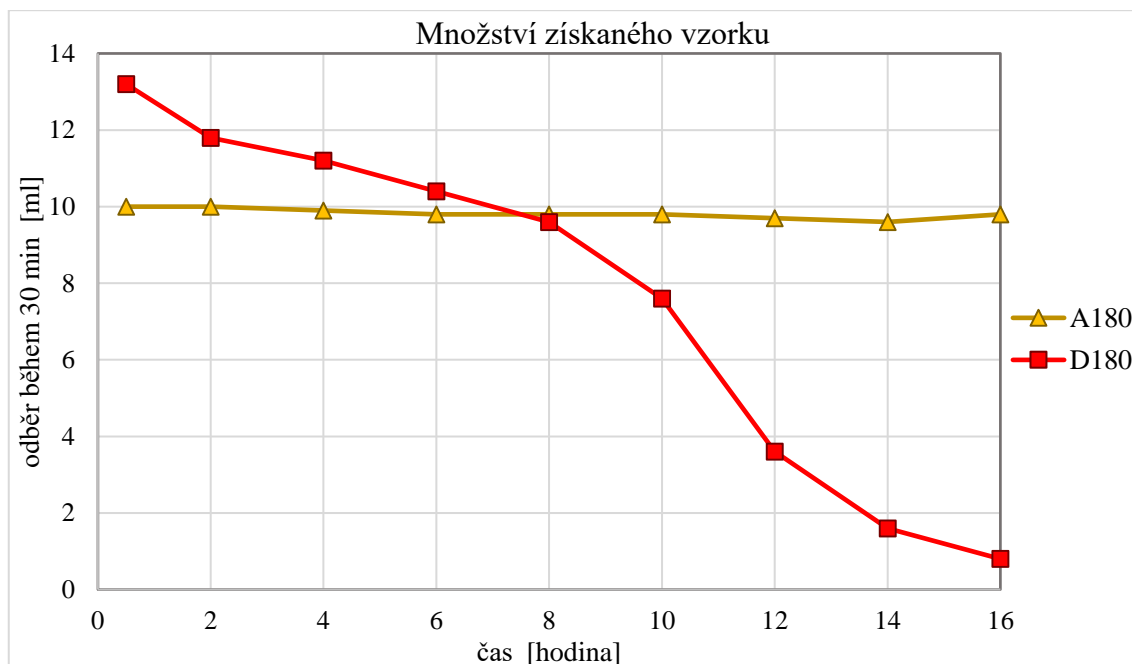
3.4.3 Dynamické testy rozpustnosti

Dynamické testy rozpustnosti byly provedeny pouze s křemičitými nanovláknami, která byla tepelně stabilizována při 180 °C/ 2 hod. Množství křemíku v jednotlivých časových odběrech bylo stanoveno pomocí ICP/ OES a přepočteno na obsah SiO₂. Vzhledem k dodání peristaltické pumpy až v závěrečné fázi experimentů diplomové práce nebylo možné experiment zopakovat. Proto je nutné tyto výsledky považovat za předběžné a jejich účelem bylo ověřit první verzi metodiky měření.

Graf 17 zobrazuje časovou závislost objemu odebíraného vzorku. V případě simulované krevní plazmy zůstával objem vzorků během celého experimentu téměř konstantní. Rychlost výtoku filtrátu se pohybovala v rozmezí hodnot 19,2- 20,0 ml/ hod. V případě

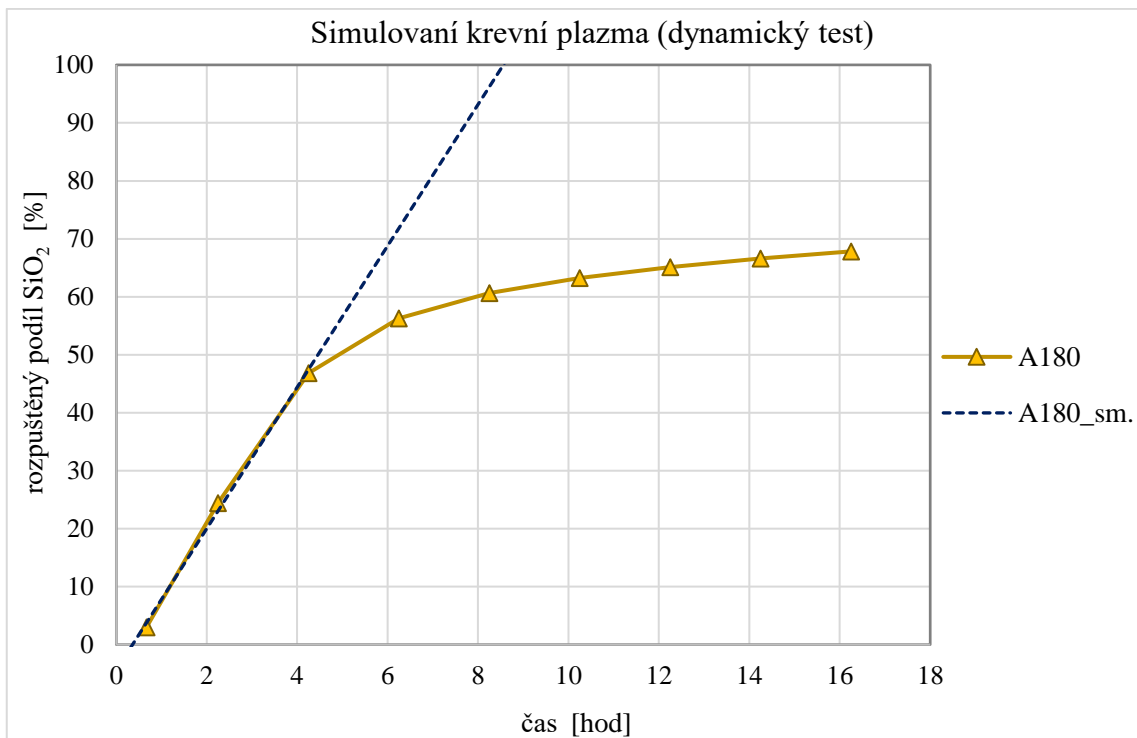
Gambleho roztoku se objem odebraných vzorků v závislosti na čase odběru postupně snižoval. Rychlost průtoku v čase klesala z hodnoty 26,4 ml/ hod. až na minimální hodnotu 1,6 ml/ hod. Tento pokles mohl být způsoben postupným zanášením nylonového filtru průtokové komory, na kterém se postupně usazovaly úlomky nanovláken. Vzhledem k mechanismu a agresivitě degradace nanovláken v Gambleho roztoku toto považují za velmi pravděpodobnou příčinu.

Graf 17 Závislost odebraného množství vzorku v závislosti na čase odběru.

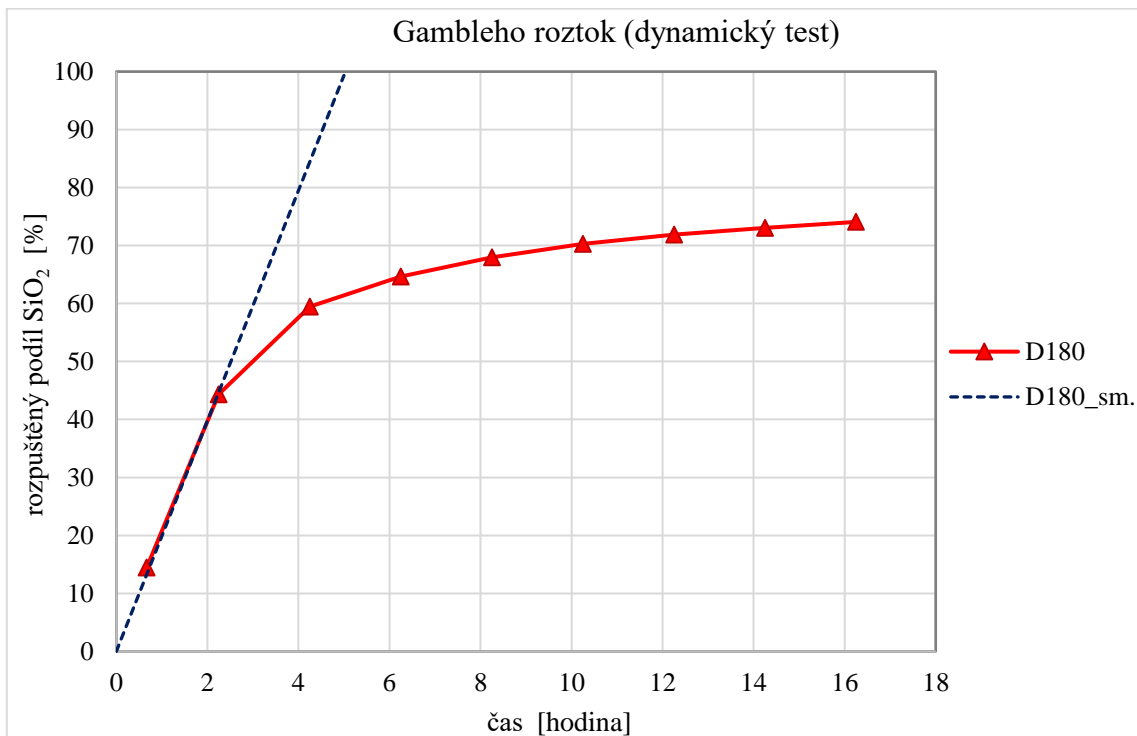


Pro získání orientační křivky závislosti rozpuštěného podílu SiO_2 na čase byly pro neanalyzované odběry (tj. odběry sbírané do zásobní lahve mezi analyzovanými časovými odběry) interpolací stanoveny pravděpodobné objemy a koncentrace Si v příslušném odběru. Tyto hodnoty byly následně použity pro sestavení příslušných kumulativních grafů (viz. Graf 18 a Graf 19). Získaný poločas rozpouštění pro křemičitá nanovlákná rozpouštěná v médiu A činí $t_{1/2} = 0,19$ dne. Křemičitá nanovlákná, která byla rozpouštěná v médiu D, mají stanovený poločas rozpouštění $t_{1/2} = 0,10$ dne. Tyto hodnoty jsou oproti výsledkům získaných při statických testech nižší, a tudíž byl potvrzen očekávaný nárůst rychlostí rozpouštění při dynamických testech. Jedná se však o pouhé odhady a je třeba provést další experimenty pro ověření této hypotézy.

Graf 18 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na čase, médium A.



Graf 19 Závislost rozpuštěného podílu SiO₂ nanovláken na čase, médium D.



3.4.3.1 Shrnutí dynamických testů rozpustnosti

Při dynamických testech rozpustnosti křemičitých nanovláken se podařilo vyzkoušet metodiku. První provedené testy poskytly uspokojivé výsledky (viz. Příloha 12), na jejichž základě je možné upravit metodiku a uskutečnit další experimenty. V dalších experimentech bude potřeba zajistit stálost rychlosti průtoku média D skrz průtokovou komoru. Navrhují systém dynamického testu rozšířit i o další média, která byla testována při statických testech rozpustnosti. Jedná se především o médium E, které při statických testech poskytlo znepokojivé výsledky z hlediska zdravotní nezávadnosti. Dále navrhují prodloužit časy experimentů a hlavně odebírat vzorky v kratších intervalech a provádět chemické stanovení Si ve všech odběrech (i přes velké množství analýz). Také navrhují pořídit SEM snímky takto rozpouštěných nanovláken pro další kontrolu.

3.5 Závěr

Rychlosti rozpouštění křemičitých nanovláken, vyrobených na Technické univerzitě v Liberci metodou elektrostatického zvlákňování a tepelně zpracovaných při 180 °C nebo 550 °C, byly studovány pomocí statických a dynamických testů rozpustnosti ve vybraných simulovaných tělních tekutinách a příbuzných roztocích. Cílem bylo stanovit poločasy rozpouštění křemičitých nanovláken, jakožto ukazatele jejich biodurability. Zdravotní nezávadnost křemičitých nanovláken byla posuzována podle studie firmy Johns Manville Corporation [4], kde je stanovena hodnota poločasu rozpouštění $t_{1/2} = 40$ dní, při které ještě lze považovat materiál za zdravotně nezávadný.

Z výsledků statických testů rozpustnosti vyplynul velmi výrazný rozdíl v rychlosti rozpouštění křemičitých nanovláken v závislosti na použitém médiu a teplotě stabilizace. V případě tepelně stabilizovaných nanovláken při 180 °C byla podmínka zdravotní nezávadnosti splněna téměř ve všech médiích kromě simulované intracelulární plicní tekutiny (pH = 4,5) a destilované vody. Nanovláčka, která byla tepelně stabilizována při 550 °C podmínku zdravotní nezávadnosti nespĺnila při rozpouštění v médiích, jejichž charakteristikou je kyselé pH a relativně nízká osmolalita. Jedná se o intracelulární plicní tekutinu (pH = 4,5), simulované poty a destilovanou vodu.

Vedle statického způsobu testování rychlosti rozpouštění křemičitých nanovláken byl vyvinut i dynamický způsob testů. Ten je experimentálně podstatně náročnější a pro jeho optimální provedení byla nezbytná vstupní data ze statických testů. Dynamické testování má za sebou úvodní pokusy a po úpravě metodiky je připraveno pro zahájení testování chování křemičitých nanovláken ve vybraných médiích v závislosti na jejich tepelném zpracování.

Následující výzkum se může ubírat několika směry. Jedním z nich je zahájení dynamického testování rozpustnosti křemičitých nanovláken v ostatních tělních tekutinách v závislosti na jejich tepelné stabilizaci. Tyto testy by měly poskytnout data, která lépe reprezentují reálnou situaci v organismu a mohly by tak potvrdit bezpečnost manipulace s křemičitými nanovláčky. Dále by se výzkum mohl věnovat chování křemičitých nanovláken s vyššími teplotami stabilizace, protože jsou zamýšlené aplikace nanovláken do organismu (např. do abdominální dutiny), kde by rychlé rozpouštění bylo nevýhodou.

4 Seznam citované literatury

- [1] UTEMBE, Wells, Kariska POTGIETER, Aleksandr STEFANIAK a Mary GULUMIAN. Dissolution and biodurability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. 2015, 12(1), - [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1186/s12989-015-0088-2. ISSN 1743-8977. Dostupné z: <http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-015-0088-2>
- [2] MAXIM, L., John HADLEY, Russell POTTER a Ron NIEBO. The role of fiber durability/biopersistence of silica-based synthetic vitreous fibers and their influence on toxicology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2006, 46(1), 42-62 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1016/j.yrtph.2006.05.003. ISSN 02732300. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230006000882>
- [3] SHIN, Hyeon, Aleksandr STEFANIAK, Nenad STOJILOVIC a George CHASE. Comparative dissolution of electrospun Al₂O₃ nanofibres in artificial human lung fluids. *Environ. Sci.: Nano* [online]. 2015, 2(3), 251-261 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1039/C5EN00033E. ISSN 2051-8153. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5EN00033E>
- [4] HESTERBERG, T.W. a G.A. HART. Health and safety aspects of fiber glass. Fifteenth Annual Battery Conference on Applications and Advances (Cat. No.00TH8490) [online]. IEEE, 1999, (29), 135-140 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1109/BCAA.2000.838394. ISBN 0-7803-5924-0. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/838394/>
- [5] STUDNIČKOVÁ, Jarmila, Lukáš BRÁZDA, Aleš HELEBRANT a Petr EXNAR. Health Aspect of Silicone oxide nanofibers. In: *14th STRUTEX (Structure and Structural Mechanics of Textiles)*, Liberec, November 2007. Liberec: Technical University of Liberec, 2007. s. 263-267.
- [6] BRÁZDA, Lukáš, Jarmila STUDNIČKOVÁ, Petr EXNAR a Aleš HELEBRANT. Kinetics of SiO₂ nanofibres dissolution in the simulated lung environment. *Advanced Materials Research*, 2008, **39-40**, s. 347-350.
- [7] Obecná patofyziologie metabolismu vody a elektrolytů: Poruchy intravaskulárního objemu a tonicity. In: *Ústav patologické fyziologie LF MU* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2004 [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/patfyz/pdf/vasku/cj/voda.pdf>
- [8] Obecná patofyziologie hospodaření s vodou a elektrolyty. In: *Ústav patologické fyziologie LF MU* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2008 [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/patfyz/powerpnt/0708/VodaElektrolyty2.4.2008.pdf>

- [9] For Mosby's Medical Dictionary: 8th edition. In: *McGraw-Hill Concise Dictionary of Modern Medicine: Body fluid* [online]. The McGraw-Hill Companies, Inc.: Farlex and Partners, 2002 [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/body+fluid>
- [10] VESELÝ, Ondřej. Fyziologie homeostázy tělesné vody, regulace osmolality a objemu: Tělesná voda a její oddíly. In: *OP vzdělávání pro konkurenceschopnost* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, 2010 [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki2/?p=5063>
- [11] Tělní tekutiny. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. vyd.* Praha: Grada, 2012, s. 17-19. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3918-2.
- [12] Body Fluids and Fluid Compartments. OPENSTAX, College. *Anatomy and Physiology* [online]. 1. Houston, Texas: Rice university, 2013, s. 1173 - 1182 [cit. 2017-02-28]. ISBN 978-1-938168-13-0.
- [13] MARQUES, Margareth R. C., Raimar LOEBENBERG a May ALMUKAINZI. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies* [online]. 2011, **18**(3), 15-28 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.14227/DT180311P15. ISSN 1521298x. Dostupné z: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201108Articles/DT201108_A02.pdf
- [14] OYANE, Ayako, Hyun-Min KIM, Takuo FURUYA, Tadashi KOKUBO, Toshiki MIYAZAKI a Takashi NAKAMURA. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A* [online]. 2003, **65**(2), 188-195 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1002/jbm.a.10482. ISSN 0021-9304. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.10482>
- [15] LARSON, Rodney. Assessing the Solubility of Silicon Dioxide Particles Using Simulated Lung Fluid. *Open Toxicology Journal* [online]. Bentham Science Publishers B.V., 2010, **4**, 51-55 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.2174/1874340401004010051. ISSN 1874-3404. Dostupné z: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOTOXIJ-4-51>
- [16] FILIPOVÁ, Zuzana, Jana KUKUTSCHOVÁ a Miroslav MAŠLÁŇ. Interakce nanomateriálů s biologickými systémy. In: *Rizika nanomateriálů. 1.* Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012, s. 43 - 47. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [17] DOHNALOVÁ, Lucie a Vlastimil DOHNAL. Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické listy*. 2015, **109**(6), s. 444-450.

- [18] HLISTOVÁ, Miroslava. *Studium chronické toxicity nanočástic stříbra vůči organismu Drosophila melanogaster*. Olomouc, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
- [19] ELSAESSER, Andreas a C. Vyvyan HOWARD. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**(2), 129-137 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.addr.2011.09.001. ISSN 0169409x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11002328>
- [20] DURÁN, Nelson, Camila P. SILVEIRA, Marcela DURÁN a Diego Stéfani T. MARTINEZ. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2015, **13**(1), 2-17 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1186/s12951-015-0114-4. ISSN 1477-3155. Dostupné z: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/13/1/55>
- [21] OPRŠAL, Jakub. *Vliv fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů a expozičním médií na výsledky testů ekotoxicity*. Pardubice, 2016. Disertační práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Doc. Ing. Miroslav Pouzar, Ph.D.
- [22] VACULÍKOVÁ, Eliška, Daniela PLACHÁ a Josef JAMPÍLEK. Toxikologie nanoforem nosičů léčiv. *Chemické listy*. 2015, **109**(5), s. 346-352.
- [23] DOCTER, D., D. WESTMEIER, M. MARKIEWICZ, S. STOLTE, S. K. KNAUER a R. H. STAUBER. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned – challenge accepted. *Chem. Soc. Rev* [online]. 2015, **44**(17), 6094-6121 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1039/C5CS00217F. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5CS00217F>
- [24] VERDERIO, Paolo, Svetlana AVVAKUMOVA, Giulia ALESSIO et al. Delivering Colloidal Nanoparticles to Mammalian Cells: A Nano-Bio Interface Perspective. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2014, **3**(7), 957-976 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1002/adhm.201300602. ISSN 21922640. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adhm.201300602>
- [25] JURÁNKOVÁ, Zdeňka. Oponizace. In: *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf, 1998-2017 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <http://www.lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/opsonizace>
- [26] Cytokiny. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, s. 101 - 109. ISBN 978-80-7387-280-9.
- [27] TEE, Jie Kai, Choon Nam ONG, Boon Huat BAY, Han Kiat HO a David Tai LEONG. Oxidative stress by inorganic nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* [online]. 2016, **8**(3), 414-438 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1002/wnan.1374. ISSN 19395116. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/wnan.1374>

- [28] FILIPOVÁ, Zuzana, Jana KUKUTSCHOVÁ a Miroslav MAŠLÁŇ. Mechanismy toxického účinku nanočástic. In: *Rizika nanomateriálů*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2012, s. 48 - 58. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [29] JAGANATHAN, Hamsa a Biana GODIN. Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**(15), 1800-1819 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.addr.2012.05.008. ISSN 0169409x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12001895>
- [30] VARNA, Mariana, Philippe RATAJCZAK, Irmine FERREIRA, Christophe LEBOEUF, Guilhem BOUSQUET a Anne JANIN. In Vivo Distribution of Inorganic Nanoparticles in Preclinical Models. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* [online]. 2012, **03**(02), 269-279 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.4236/jbmb.2012.322033. ISSN 2158-7027. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jbmb.2012.322033>
- [31] CROISSANT, Jonas G., Yevhen FATIEIEV a Niveen M. KHASHAB. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Advanced Materials* [online]. 2017, **29**(9), 1-51 [cit. 2017-03-06]. DOI: 10.1002/adma.201604634. ISSN 09359648. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201604634>
- [32] SLOWING, I, J VIVEROESCOTO, C WU a V LIN. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, **60**(11), 1278-1288 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.012. ISSN 0169409x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08000951>
- [33] LUO, D a W M SALTZMAN. Nonviral gene delivery: Thinking of silica. *Gene Therapy* [online]. 2005, **13**(7), 585-586 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1038/sj.gt.3302662. ISSN 0969-7128. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.gt.3302662>
- [34] SANTRA, Swadeshmukul. Fluorescent Silica Nanoparticles for Cancer Imaging. *Methods in molecular biology* [online]. 2010, **624**, 151-162 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1007/978-1-60761-609-2_10. ISSN 1064-3745. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-609-2_10
- [35] IZQUIERDO-BARBA, Isabel, Montserrat COLILLA a María VALLET-REGÍ. Nanostructured Mesoporous Silicas for Bone Tissue Regeneration. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2008, **2008**(106970), 1-14 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1155/2008/106970. ISSN 1687-4110. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2008/106970/>

- [36] NAPIERSKA, Dorota, Leen CJ THOMASSEN, Dominique LISON, Johan A MARTENS a Peter H HOET. The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. 2010, **7**(1), 39- [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1186/1743-8977-7-39. ISSN 1743-8977. Dostupné z: <http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-7-39>
- [37] LIN, Weisheng, Yue-wern HUANG, Xiao-Dong ZHOU a Yinfa MA. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2006, **217**(3), 252-259 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.taap.2006.10.004. ISSN 0041008x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X06003528>
- [38] KIM, In-Yong, Elizabeth JOACHIM, Hyungsoo CHOI a Kyekyoon KIM. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2015, **11**(6), 1407-1416 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.nano.2015.03.004. ISSN 15499634. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963415000787>
- [39] MAO, Yan, Lambert N. DANIEL, Alan D. KNAPTON, Xianglin SHI a Umberto SAFFIOTTI. Protective Effects of Silanol Group Binding Agents on Quartz Toxicity to Rat Lung Alveolar Cells. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* [online]. 1995, **10**(12), 1132-1137 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1080/1047322X.1995.10389107. ISSN 1047-322x. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1047322X.1995.10389107>
- [40] AN, Seong Soo A., Hwa Jung RYU, Nak-Won SEONG et al. Evaluation of silica nanoparticle toxicity after topical exposure for 90 days. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2014, **9**(2), 127- [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.2147/IJN.S57929. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/evaluation-of-silica-nanoparticle-toxicity-after-topical-exposure-for-peer-reviewed-article-IJN>
- [41] WU, Yuequn, Wei TANG, Peng WANG, Changsheng LIU, Yuan YUAN a Jiangchao QIAN. Cytotoxicity and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles in Human Cancer Cells. *Particle* [online]. 2015, **32**(7), 779-787 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1002/ppsc.201400167. ISSN 09340866. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ppsc.201400167>
- [42] SOHAEBUDDIN, Syed K, Paul T THEVENOT, David BAKER, John W EATON a Liping TANG. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. 2010, **7**(1), 7-22 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1186/1743-8977-7-22. ISSN 1743-8977. Dostupné z: <http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-7-22>

- [43] CHEN, M a A VONMIKECZ. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO nanoparticles. *Experimental Cell Research* [online]. 2005, **305**(1), 51-62 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.12.021. ISSN 00144827. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482704007335>
- [44] DEMIR, Eşref a Vincent CASTRANOVA. Genotoxic effects of synthetic amorphous silica nanoparticles in the mouse lymphoma assay. *Toxicology Reports* [online]. 2016, **2016**(3), 807-815 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.toxrep.2016.10.006. ISSN 22147500. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221475001630083X>
- [45] LI, Yang, Lei SUN, Minghua JIN et al. Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* [online]. 2011, **25**(7), 1343-1352 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.05.003. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233311001275>
- [46] UBOLDI, Chiara, Guido GIUDETTI, Francesca BROGGI, Douglas GILLILAND, Jessica PONTI a François ROSSI. Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2012, **745**(1-2), 11-20 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.010. ISSN 13835718. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571811003093>
- [47] YE, Yiyi, Jianwen LIU, Jianhe XU, Lijuan SUN, Mingcang CHEN a Minbo LAN. Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. *Toxicology in Vitro* [online]. 2010, **24**(3), 751-758 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.01.001. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233310000020>
- [48] LEHMAN, Sean E., Angie S. MORRIS, Paul S. MUELLER, Aliasger K. SALEM, Vicki H. GRASSIAN a Sarah C. LARSEN. Silica nanoparticle-generated ROS as a predictor of cellular toxicity: mechanistic insights and safety by design. *Environ. Sci.: Nano* [online]. 2016, **3**(1), 56-66 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1039/C5EN00179J. ISSN 2051-8153. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5EN00179J>
- [49] YU, Yang, Yang LI, Wen WANG et al. Acute Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles in Intravenously Exposed ICR Mice. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(4) [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1371/journal.pone.0061346. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061346>

- [50] LI, Linlin, Tianlong LIU, Changhui FU, Longfei TAN, Xianwei MENG a Huiyu LIU. Biodistribution, excretion, and toxicity of mesoporous silica nanoparticles after oral administration depend on their shape. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2015, **11**(8), 1915-1924 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1016/j.nano.2015.07.004. ISSN 15499634. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963415001471>
- [51] YU, Yang, Yang LI, Wen WANG et al. Acute Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles in Intravenously Exposed ICR Mice. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(4), 61346- [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1371/journal.pone.0061346. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061346>
- [52] YU, Tian, Dallin HUBBARD, Abhijit RAY a Hamidreza GHANDEHARI. In vivo biodistribution and pharmacokinetics of silica nanoparticles as a function of geometry, porosity and surface characteristics. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **163**(1), 46-54 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.05.046. ISSN 01683659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365912004592>
- [53] FU, Changhui, Tianlong LIU, Linlin LI, Huiyu LIU, Dong CHEN a Fangqiong TANG. The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials* [online]. 2013, **34**(10), 2565-2575 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.043. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213000082>
- [54] CHO, Minjung, Wan-Seob CHO, Mina CHOI et al. The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicology Letters* [online]. 2009, **189**(3), 177-183 [cit. 2017-03-15]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.04.017. ISSN 03784274. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427409002136>
- [55] AN, Seong Soo A., Jeong-A LEE, Mi-Kyung KIM et al. Tissue distribution and excretion kinetics of orally administered silica nanoparticles in rats. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2014, **9**(2), 251-260 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.2147/IJN.S57939. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/tissue-distribution-and-excretion-kinetics-of-orally-administered-sili-peer-reviewed-article-IJN>
- [56] Dermal absorption of amorphous nanosilica particles after topical exposure for three days. *Die Pharmazie: An International Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2012, **67**(8), 742-743 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1691/ph.2012.1853. ISSN 0031-7144. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957443>

- [57] NABESHI, Hiromi, Tomoaki YOSHIKAWA, Keigo MATSUYAMA et al. Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials* [online]. 2011, **32**(11), 2713-2724 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.042. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961210016157>
- [58] AN, Seong Soo A., Hwa Jung RYU, Nak-Won SEONG et al. Evaluation of silica nanoparticle toxicity after topical exposure for 90 days. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2014, **9**(2), 127-136 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.2147/IJN.S57929. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/evaluation-of-silica-nanoparticle-toxicity-after-topical-exposure-for-peer-reviewed-article-IJN>
- [59] PAPRČKOVÁ, Markéta. *Studium rozpouštění anorganických nanovláken na bázi oxidu křemičitého ve vodném prostředí v závislosti na jejich tepelné stabilizaci*. Liberec, 2014. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.