

Syntéza a charakterizace zlatých nanočástic připravených pomocí selektivně oxidovaných polysacharidů

Anna Černá

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Anna Černá
Osobní číslo:	T21135
Studijní program:	B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace:	Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Syntéza a charakterizace zlatých nanočástic připravených pomocí selektivně oxidovaných polysacharidů

Zásady pro vypracování

Zlaté nanočástice (ZN) jsou v současnosti využívány v mnoha odvětvích, od průmyslové katalýzy, přes sensoriku až po medicínské aplikace.

Velikost, tvar a vlastnosti ZN jsou přitom dány už při jejich syntéze, a proto je nutné navrhnout správnou metodu s ohledem na plánované aplikace.

Polysacharidy lze využít jako netoxická činidla pro jedнокrokovou přípravu ZN, protože obsahují ve své struktuře jak aldehydicke skupiny schopné redukce zlatitých solí, tak skupiny, které mohou stabilizovat vznikající částice.

Další modifikací polysacharidů, například pomocí selektivní oxidace jodistanem, lze značně zvýšit množství redukčních skupin v molekule a získat tak lepší kontrolu nad syntézou ZN.

Náplní bakalářské práce bude syntéza, charakterizace a purifikace zlatých nanočástic pro biomedicínské aplikace připravených pomocí různých oxidovaných polysacharidů.

Regioselektivně oxidované polysacharidy s různou strukturou a množstvím redukčních skupin budou využity pro přípravu nanočástic.

Bude sledován vliv struktury a složení polysacharidů na vlastnosti připravených nanočástic, zejména na jejich velikost (hydrodynamický poloměr) a stabilitu (zeta potenciál).

Dále bude testován vliv různých purifikačních metod určených k odstranění zbytků polysacharidů (srážení různými rozpouštědly, dialýza, ultrafiltrace) na jejich vlastnosti, hlavně stabilitu (zeta potenciál).

V případě úspěšné syntézy a purifikace mohou být u připravených ZN testovány také další vlastnosti, zejména jejich katalytický potenciál či cytotoxicita.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Xiao, G.; Wang, Y.; Zhang, H.; Zhu, Z.; Fu, S. Dialdehyde Cellulose Nanocrystals Act as Multi-Role for the Formation of Ultra-Fine Gold Nanoparticles with High Efficiency. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020, 163, 788-800. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.057>.
- [2] Vávrová, A.; Čapková, T.; Kuřitka, I.; Vicha, J.; Münster, L. One-Step Synthesis of Gold Nanoparticles for Catalysis and SERS Applications Using Selectively Dicarboxylated Cellulose and Hyaluronate. *International Journal of Biological Macromolecules* 2022, 206, 927-938. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.043>.
- [3] Muchová, M.; Münster, L.; Vávrová, A.; Capáková, Z.; Kuřitka, I.; Vicha, J. Comparison of Dialdehyde Polysaccharides as Crosslinkers for Hydrogels: The Case of Poly(Vinyl Alcohol). *Carbohydrate Polymers* 2022, 279, 119022. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.119022>.
- [4] Dreaden, E. C.; Alkilany, A.M.; Huang, X.; Murphy, C.J.; El-Sayed, M. A. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41(7), 2740-2779. <https://doi.org/10.1039/C1CS15237H>.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jan Vicha, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: Anna Černá

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou zlatých nanočástic pomocí regioselektivně oxidovaných polysacharidů, jakožto redukčních a stabilizačních činidel. Konkrétně se věnuje čtyřem materiálům: selektivně oxidované celulóze, alginátu sodnému, dextranu a hyaluronátu sodnému. Cílem práce je rovněž vývoj optimálního purifikačního procesu nanočástic, především od přebytku nezreagovaných regioselektivně oxidovaných polysacharidů. V rámci purifikace byl sledován vliv dialýzy, ultrafiltrace a taktéž filtrace. Dopady jednotlivých metod byly charakterizovány na základě analýzy DLS, UV-VIS spektroskopie, XRF analýzy a byly pořízeny snímky TEM. Výsledný proces čištění koloidních roztoků zlatých nanočástic se skládá z ultrafiltrace pomocí 1 000 a 300 kDa nástavce, 48h dialýzy proti UPW a finálně filtrace, což úspěšně odstranilo přebytek vybraných dialdehydů polysacharidů. Následně byla stanovena cytotoxicita roztoků a hodnota IC_{50} . Úspěšně se tedy podařilo připravit a vyčistit koloidní roztoky zlatých nanočástic stabilizovaných pomocí různých regioselektivně oxidovaných polysacharidů určených pro biomedicinské aplikace.

Klíčová slova: nanočástice, zlaté nanočástice, sacharidy, celulóza, alginát sodný, dextran, hyaluronát sodný, regioselektivně oxidované polysacharidy, purifikace, hydrodynamický průměr, zeta potenciál, biomedicinské aplikace, cytotoxicita

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the preparation of gold nanoparticles using regioselectively oxidized polysaccharides as reducing and stabilizing agents. Four materials, namely selectively oxidized cellulose, sodium alginate, dextran, and sodium hyaluronate were considered. The aim of this work is also to optimize the purification process of gold nanoparticles from the unreacted excess of selected regioselectively oxidized polysaccharides. The effects of dialysis, ultrafiltration, and filtration on the purification process were investigated. The impact of the methods was characterized by DLS analysis, UV-VIS spectroscopy, XRF analysis, and TEM images. The resulting purification process of the gold nanoparticle colloidal solutions, composed of ultrafiltration using 1,000 and 300 kDa attachment, 48 h dialysis against UPW, and finally filtration, which successfully removed the excess of dialdehyde polysaccharides. Subsequently, the cytotoxicity of the solutions and the IC_{50} value were determined. Colloidal solutions of gold nanoparticles stabilized with various regioselectively oxidized polysaccharides for biomedical applications were successfully produced and purified.

Keywords: nanoparticles, gold nanoparticles, carbohydrates, cellulose, sodium alginate, dextran, sodium hyaluronate, regioselectively oxidized polysaccharides, purification, hydrodynamic diameter, zeta potential, biomedical applications, cytotoxicity

Nejprve bych chtěla velmi poděkovat vedoucímu bakalářské práce Mgr. Janu Víchovi, Ph.D. za jeho velmi cenné rady a připomínky, přínosné informace a nevyčísitelnou ochotu v rámci práce. Taktéž bych chtěla poděkovat za jeho přístup, za duševní i pracovní oporu a za to, že jsem mohla být pod jeho vedením, čehož si velmi vážím. Rovněž bych chtěla vyjádřit neskonale vděčnost a poděkovat Ing. Lukáši Münsterovi, Ph.D. za možnost pracovat pod jeho vedením v profesionálním prostředí, za snímky z transmisní elektronové mikroskopie a za jeho trpělivost a ochotu.

Dále chci poděkovat Ing. Alžbětě Důbravové, Ph.D. za primární orientaci v laboratoři, za její čas, který mi věnovala v rámci jednotlivých úkonů praktické části práce, za pomoc při jednotlivých měřeních a za duševní podporu. Velké díky chci vyjádřit taktéž Ing. Vítkovi Hrbáčkovi, Ing. Haně Doudové a Ing. Monice Muchové, Ph.D. především za podporu a pomoc v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Ing. Martině Martínkové, Ph. D. za vedení a dohled v rámci testování cytotoxicity zlatých nanočástic.

V rámci mých studií bych chtěla poděkovat akademickým pracovníkům fakulty technologické a Centra polymerních systémů jmenovitě prof. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph. D., doc. Ing. Zdeňce Víchové, Ph. D., doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. a Ing. Kateřině Skopalové, Ph.D. za předání důležitých informací potřebných vzhledem k mému studijnímu zaměření a rozvoj myšlení v této oblasti. Důležité je pro mne poděkovat i mé rodině, která vždy podpořila mé zájmy a byla mi nápomocna. Především patří velké díky mé mamince, která mi i přes vlastní studium poskytla vždy potřebnou pomoc a útěchu.

Závěrem si dovoluji citovat pár slov, jež vystihují, co pro mne znamenal čas strávený v laboratořích Centra polymerních systémů a shrnoují mé pocity z vypracování této práce.

*„Štěstí! Co je štěstí? Muška jenom **zlatá**...“ (Adolf Heyduk, Dědův odkaz, 1879)*

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 NANOČÁSTICE	12
1.1 HISTORIE NANOČÁSTIC A NANOTECHNOLOGIÍ	13
1.2 TYPY NANOČÁSTIC	16
1.2.1 Zlato a zlaté nanočástice (AuNPs)	17
1.2.2 Syntéza zlatých nanočástic	17
1.3 CHARAKTERISTIKA NANOČÁSTIC	19
1.3.1 Fyzikální vlastnosti	19
1.3.2 Chemické vlastnosti	26
1.3.3 Biologické vlastnosti	28
1.4 VYUŽITÍ A APLIKACE NANOČÁSTIC A NANOTECHNOLOGIÍ	35
1.4.1 Biomedicinské aplikace zlatých nanočástic	35
2 SACHARIDY	38
2.1 POLYSACHARIDY	38
2.1.1 Celulóza	39
2.1.2 Hyaluronát sodný	39
2.1.3 Dextran	40
2.1.4 Alginát sodný	40
2.2 SELEKTIVNÍ OXIDACE POLYSACHARIDŮ	41
2.3 SELEKTIVNĚ OXIDOVANÉ POLYSACHARIDY	42
3 ZLATÉ NANOČÁSTICE PŘIPRAVENÉ POMOCÍ SELEKTIVNĚ OXIDOVANÝCH POLYSACHARIDŮ	43
4 POUŽITÉ METODY	45
4.1 DLS	45
4.2 UV-VIS	46
4.3 XRF	48
4.4 TEM	48
5 CÍL PRÁCE	49

II PRAKTICKÁ ČÁST	50
6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	51
6.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	51
6.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	52
6.3 PŘÍPRAVA MATERIÁLU DAH_B.....	52
6.4 PŘÍPRAVA KOLOIDNÍCH ROZTOKŮ ZLATÝCH NANOČÁSTIC	53
7 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	55
7.1 SÉRIE AuDAC_A	55
7.1.1 AuDAC_A ₁	55
7.1.2 AuDAC_A ₂	61
7.2 VZOREK AuDAC_B ₁	66
7.3 SÉRIE VZORKŮ STABILIZOVANÝCH OSTATNÍMI DIALDEHYDY	69
7.3.1 AuDAAL_A ₁	69
7.3.2 AuDADXA_A ₁	73
7.3.3 AuDAH_A ₁	76
7.4 STUDIUM STABILITY ROZTOKŮ ZLATÝCH NANOČÁSTIC	81
7.5 TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY AuDAX	84
ZÁVĚR.....	88
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	90
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	93
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ ZKRATEK.....	96
SEZNAM TABULEK	100

ÚVOD

V dnešní době se stále více rozvíjí oblast nanočástic a nanomateriálů. Do popředí se dostávají mimo jiné nanočástice ušlechtilých kovů, například zlata, a to vzhledem k jejich unikátním fyzikálním, chemickým a biologickým vlastnostem. Zejména biologické vlastnosti jsou zajímavé, jelikož otevírají další možnosti aplikace v oboru biomedicíny a farmacie. Nabízí se například využití nanočástic jakožto nosičů léčiv či šetrných agens při léčbě závažných onemocnění jako je rakovina.

Tyto vlastnosti jsou dány do velké míry výběrem materiálu, jež tvoří stabilizační vrstvu jader zlatých nanočástic a zároveň se může podílet na redukci zlatitých solí při jejich syntéze. Jednou z možných variant stabilizačních a redukčních činidel jsou polysacharidy, respektive jejich regioselektivně oxidované deriváty. Funkční skupiny řetězce vybraného selektivně oxidovaného polysacharidu tvoří vazbu se zlatým jádrem nanočástice za vzniku stabilizační vrstvy. Díky této vrstvě nemají nanočástice tendence agregovat a jsou kompaktní. Navíc polysacharidy jako takové jsou pro tělo přirozené, tedy mají potenciál při stabilizaci nanočástic pro biomedicinské aplikace. Nevýhodou při syntéze zlatých nanočástic pomocí regioselektivně oxidovaných polysacharidů je však nezreagovaný přebytek daného polysacharidu v roztoku, který je obtížné odstranit. V této práci jsem se zaměřila na charakterizaci koloidních roztoků zlatých nanočástic připravených pomocí regioselektivně oxidovaných polysacharidů a jejich následnou purifikaci, zejména od přebytku polysacharidu. U purifikovaných roztoků byla posléze sledována jejich cytotoxicita, jenž je stěžejním parametrem pro možné budoucí uplatnění v biomedicině.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NANOČÁSTICE

V dnešní době můžeme klasifikovat mnoho nanostruktur, přičemž pro tuto práci jsou nejpodstatnější nanočástice. Nanočástice lze přirozeně definovat na základě jejich velikosti jako pravidelné třírozměrné struktury, jejichž rozměry se pohybují v nanometrech a jsou vzájemně porovnatelné. Horní hranice, kdy můžeme částici považovat za nanočástici, není přesně stanovena, avšak obecně můžeme říci, že všechny tři rozměry musí dosahovat rozměrů v intervalu 1-100 nm s minimální odchylkou. Z hlediska nanostruktur nanočástice řadíme do 0D struktur. [1, 2]

Struktura nanočástic je komplexní, a obvykle je rozdělena do 2-3 vrstev. První vrstvu lze charakterizovat jako vrstvu povrchovou, ta je obohacena o malé molekuly, ionty, polymery či povrchově aktivní látky (PAL). Druhá vrstva, českým opisem „skořápková“ (shell), je chemicky heterogenní od jádra nanočástice a může být přidána pro lepší stabilizování částice. A jako poslední je jádro částice, které tvoří centrum nanočástice a určuje základní chování nanočástice. [2]

Při zmínce o nanočásticích, nanotechnologiích a nanomateriálech by si většina lidské populace představila „vědu novověku“. Opak je však pravdou. Během posledních let je sice tato věda stále více na výsluní a o „nano“ světě se dozvídá i široká veřejnost, avšak „nano“ svět jako takový je součástí samotné lidské podstaty.

Jestliže hovoříme v rozměrech nano, pak se pohybujeme v miliardtinách metrů. Takovýchto velikostí dosahují molekuly. Vše kolem nás, včetně nás samotných, je složeno z atomů a molekul, tudíž nanostruktury nejsou novodobá záležitost. Co ovšem přesahuje do moderní doby jsou možné aplikace a využití nanočástic a nanotechnologií. Ostatně na toto téma narážel již v šedesátých letech americký fyzik a nositel Nobelovy ceny Richard Feynman. Dovolím si tedy citovat z přednášky, která určila další směr nanovědě. [3]

*„Biologický systém může být extrémně malý. Mnohé z buněk jsou velmi malé, ale jsou velmi aktivní. Vyrábějí různé látky, chodí kolem, vrtí se a dělají mnoho úžasných věcí – vše ve velmi malém měřítku. Rovněž ukládají informace. Zvažme možnost, že i my dokážeme udělat věc velmi malou, která dělá to, co chceme. Že dokážeme vyrobit předmět, který na této úrovni manévruje.“ (Richard Feynman, *There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics*, 1959) vlastní překlad*

Můžeme říci, že R. Feynman a jeho teze byly opravdu směrodatné. Žijeme v době pokroku a „předměty v nanoměřítku, které dokážeme ovládat“ již existují, a to včetně nanorobotů, tedy nanostrojů, pohybujících se vlastní silou. [4]

Budoucnost se nyní stává přítomností, avšak uplynulo mnoho let výzkumů, získávání poznatků o nanosvětě a bádání, jak nanostruktury fungují a jak je můžeme využít. Právě pokrok, který plynul po staletí, je ve stručném přehledu popsán v následující podkapitole „Historie nanočástic a nanotechnologií“.

1.1 Historie nanočástic a nanotechnologií

Postupy, ve kterých se nanotechnologií využívalo, jsou staré stovky let. Zrod nanomateriálů pramení již z dob staré Číny a Egypta, kdy vzniklo tzv. Aurum potable známé také jako „rozpuštěné zlato“. Objev „rozpuštěného zlata“ měl celou řadu využití od okrasných aplikací až po léčivé účely. „Rozpuštěné zlato“ se používalo při léčbě nádorů, kardiovaskulárních či pohlavních onemocnění (pro rozpoznání syfilidy). „Rozpuštěné zlato“ ovšem nenabízelo pouze blahodárné účinky, ba naopak, při vyšších dávkách poškozovalo ledviny a vyvolávalo tzv. „aurickou horečku“. [5, 6]

Zlaté částice byly trendem nejen ve starém Egyptě a Číně, ale okrasné funkce využívali i později v dobách starověkého Říma. Římští skláři využívali tyto technologie bez odborných znalostí. Tehdejší výrobky tak vznikaly především dílem náhody. Příkladem jejich dobové práce jsou tzv. Lykurgovy poháry (Obr. 1). [5, 7]



Obr. 1 – Demonstrace barevné změny jednoho z Lykurgových pohárů [8]

U těchto pohárů, vytvořených ve 4. století, bylo doloženo, že se do skla přimíchávaly kovové prášky, konkrétně nanokrystaly zlata (zhruba 40 ppm) a stříbra (zhruba 300 ppm) měřící kolem 70 nm. Skutečnost, že konstrukce pohárů obsahuje i částice nano rozměrů byl zjištěn teprve nedávno, avšak konkrétní technologický postup jejich výroby prozatím nebyl objasněn. [5]

Lykurgovy poháry jsou známé charakteristickou změnou barvy. Barevný přechod pramení právě z existence kovových částic ve skle. Výsledný efekt vychází z osvětlení skla. Jestliže budeme na pohár svítit zvenčí, pohár bude zelený (viz Obr. 1 – vpravo). Při osvětlení zevnitř pohár zrudne (viz Obr. 1 – vlevo). Tyto první střípky nanotechnologie lze v současnosti dohledat v Britském muzeu, v Londýně. [3, 7]

S dalším využitím nanotechnologie se setkáváme ve 13.-16. století v rámci zdobení tehdejší keramiky. Při výrobě této keramiky vznikla první uměle vytvořená souvislá vrstva nanočástic v křemičité struktuře, avšak technologie výroby těchto mistrovských prací se dochovala pouze v rámci „lidové slovesnosti“. Princip vzniku nanočástic nebyl objasněn, jelikož mistři vycházeli čistě z náhodně objevených jevů. [9]

Co se týče dalšího pokroku a bádání ve světě nanotechnologií, pak za další milník lze považovat rok 1857. V tomto roce se zabýval nanotechnologiemi Michael Faraday, který poprvé připravil a popsal vlastnosti koloidních suspenzí tzv. „rubínového“ zlata. Zmíněné suspenze nanočástic zlata vykazovaly totožné optické rysy jako výše popsané Lykurgovy poháry. [9] Za účelem ilustrace dalšího rozvoje nanotechnologií byla vytvořena následující Tab. 1, která reprezentuje některé zajímavé historické milníky v nanotechnologiích po roce 1900.

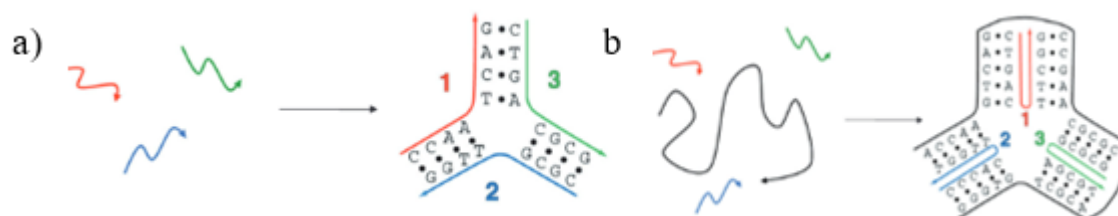
Tab. 1 - Historické milníky v oboru nanotechnologií po roce 1900 [9]

Rok	Jméno	Událost
1928	E. Syngge	Vynález optického mikroskopu blízkého pole
1931	M. Knoll a E. Ruska	Vynález transmisního elektronového mikroskopu (TEM)
1958	L. Esaki	Vynález electron tunnelingu
1959	R. Feynman	Základní koncept nanotechnologie
1965	G. E. Moore	Formulace Moorových zákonů
1974	N. Taniguchi	Vznik termínu Nanotechnologie
1982	N. Seeman	Rozvoj konceptu DNA nanotechnologie
1986	G. Binnig a H. Rohrer	Nobelova cena z Fyziky za vývoj ATM a STM
1997	Zyvox	První založená nanotechnologická společnost
2000	Prezident B. Clinton	Uvedení americké Národní nanotechnologické iniciativy (NNI)
2003	G. W. Bush	Zákon o výzkumu a vývoji nanotechnologií 21. století
2011	L. Grill	Výzkumu a porozumění struktury grafenu.
2016	L. Feringa	Nobelova cena z Chemie za návrh a syntézu molekulárních zařízení

Jedna z nejvýznamnějších osobností zabývajících se touto tematikou je již výše zmiňovaný americký fyzik Richard Feynman, který je společností považován za „otce nanotechnologií“. Paradoxem ovšem je, že Feynman nikdy nepoužil termín „nanotechnologie“, pouze popsal, kam by mohly směřovat budoucí výzkumy a hovořil o možnosti zpracovat a řídit jednotlivé atomy, příp. molekuly. [9]

Můžeme předpokládat, že Richard Feynman, a jemu podobní, natolik nadchli vědeckou komunitu, jenž se odhodlala zjistit, jak takto malé objekty mohou vypadat. Tato touha po poznání eskalovala objevem skenovacího tunelového mikroskopu (STM) a mikroskopu atomových sil (AFM) v 80. letech. Díky těmto mikroskopům můžeme sledovat reakce na úrovni atomů a molekul. [3]

Nanotechnologie začaly pronikat taktéž do biomateriálů a to ve 2. polovině 20. století. Příkladem byla „nanotechnologie strukturované DNA“. Tato technologie nazývaná jako „DNA origami“ se používá ke vzniku struktur s definovaným tvarem složených z jednoho dlouhého řetězce DNA šroubovice, jež je v tomto případě scaffold („lešení“). Tento proces je korigován pomocí tzv. „sešívacích řetězců“, což jsou komplementární úseky DNA určující výslednou strukturu. Princip popisuje následující jednoduché schéma na Obr. 2. [10]



Obr. 2 – a) víceřetězcový přístup, b) DNA-origami přístup založený na scaffoldu [10]

1.2 Typy nanočástic

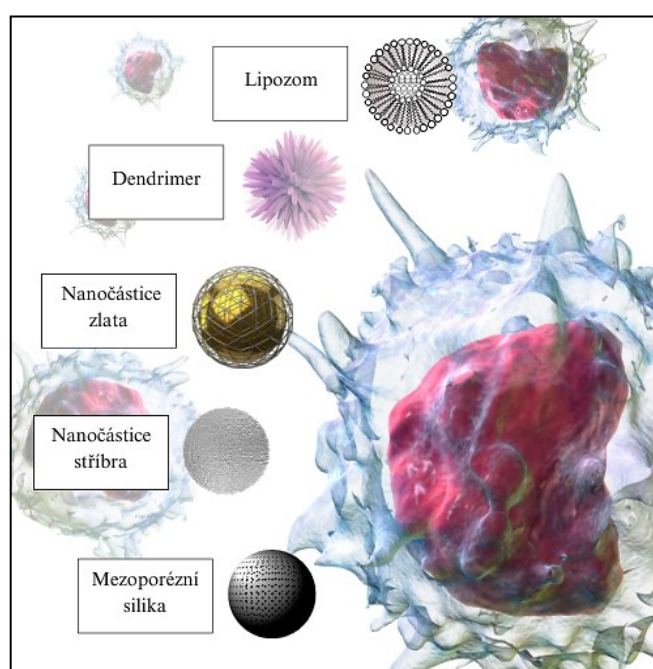
Nanočástice nám poskytují nepřehledné množství kombinací vzhledem k jejich morfologii, velikosti, náboji, tvaru, chemickým, fyzikálním a biologickým vlastnostem. Nejčastěji se však setkáme s rozdělením na nanočástice organického a anorganického původu.

Organické nanočástice

Organické nanočástice jsou částice, jejichž základem jsou organické sloučeniny – lipidy, polymery nebo nanočástice na bázi uhlíku. Mezi takovéto nanočástice založené na organických sloučeninách patří dendrimery, lipozomy, proteiny jako feritin a ze zástupců nanočástic na bázi uhlíku to jsou fullereny, karbonové nanotrubičky, grafen a uhlíková nanovlákna. [2]

Anorganické nanočástice

O anorganických částicích lze opisem říci, že jsou to nanočástice, jejichž základem jsou anorganické sloučeniny. Nejčastější prekursori jsou kovy a jejich oxidy. Mezi nanočástice na bázi oxidů kovů jsou například nanočástice připravené pomocí oxidu železitého (Fe_2O_3), oxidu hlinitého (Al_2O_3), oxidu ceričitého (CeO_2), oxidu křemičitého (SiO_2), oxidu titaničitého (TiO_2) a oxidu zinečnatého (ZnO). Nejpoužívanější kovové nanočástice tvoří stříbro (Ag), kobalt (Co), měď (Cu), železo (Fe), zinek (Zn), kadmium (Cd) a také zlato (Au). Následující část se věnuje právě zlatým nanočásticím (AuNPs), jež jsou stěžejní pro tuto práci. [2]



Obr. 3 – Modely vybraných typů nanočástic [vytvořeno v Canva.com]

1.2.1 Zlato a zlaté nanočástice (AuNPs)

Zlato

Základem zlatých nanočástic je zlaté jádro, jehož povrch je následně stabilizován vybraným činidlem a případně dále modifikován. Proto je vhodné stručně definovat zlato jako takové. Chemická značka zlata je Au z lat. Aurum, česky „zářící“. Atomové číslo zlata je 79, přičemž relativní atomová hmotnost zlata je 196,967. Zlato patří do 11. skupiny, taktéž označované jako skupina „ušlechtilých kovů“. Tyto kovy jsou specifické výbornou elektrickou vodivostí a stálostí i při vyšších teplotách, tzn. že mají vysoké teploty tání. Pro zlato se hodnota teploty tání pohybuje kolem 1 064 °C. [11]

Zlato má kovově žlutou barvu a pro své vlastnosti se makroskopické zlato využívá v mnoha aplikacích od estetických (klenotnické) po funkční aplikace v elektronice. Zlato tedy nabízí možnosti pro technické, vědecké, materiálové, průmyslové a případně medicínské účely. [11]

Zlaté nanočástice (AuNPs)

Roztoky zlatých nanočástic, resp. nanočástic obecně, lze definovat jako koloidní soustavy, kde disperzní podíl představují samotné nanočástice zlata, které jsou rozptýleny v disperzním prostředí (kapalina) – nejčastěji ve vodě. [12]

Takovéto koloidní roztoky zlatých nanočástic (AuNPs) nejčastěji vykazují charakteristickou červenou barvu a poprvé je v novověku připravil již zmiňovaný Michael Faraday, který zkoumal jejich barevný projev a stanovil základní teze efektu optické rezonance na jejich povrchu, následně pojmenovaného jako povrchová plazmonová rezonance (Surface Plasmon Resonance, SPR). [12]

Zlaté nanočástice disponují různorodou typologií. Ohledně typů zlatých nanočástic existuje mnoho typů např.: nanodráty, nanoobaly, nanoklece, a sférické nanočástice. [11] Právě na jejich tvar má zásadní vliv metoda jejich syntézy.

1.2.2 Syntéza zlatých nanočástic

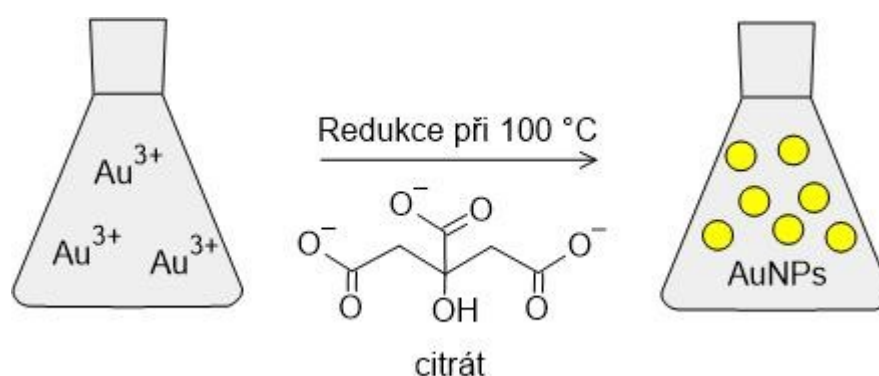
Zlaté nanočástice se nejčastěji připravují chemickou cestou („Bottom-up“ metody). Jejich příprava je založena na reakci mezi prekurzorem (nejčastěji se používá kyselina tetrachlorozlatitá HAuCl_4) a redukčním činidlem, které taktéž může fungovat jako stabilizátor nanočástice, avšak existují i fyzikální metody přípravy („Top-down“ metody) například laserová ablace, vakuové odpařování či katodové naprašování atd. [12, 13]

Co se týče chemických metod, můžeme jmenovat například Brustovu bifázickou metodu, jejíž postup byl podrobně zdokumentován v roce 1994 a je vhodná pro syntézu téměř monodisperzních nanočástic o rozměrech pod 5 nm. Tato metoda je založena na fázovém transferu vodného roztoku zlata na organickou fázi – toluen, přičemž se následně použije borohydridu sodného NaBH_4 jako redukčního činidla. [12, 13]

Z dalších metod je to například mikroemulzní metoda založena na redukci zlatitých solí uvnitř inverzních micel, metoda výsevu – příprava anizotropních nanočástic zlata kolem malých předem připravených zlatých jader a následně Frensova metoda z roku 1973, která je podobná základní metodě přípravy nanočástic, tzv. Turkevičově metodě. [12, 13]

Turkevičova metoda

Tato metoda je jedna z nejznámějších metod přípravy nanočástic. Její postup sepsali J. Turkevich, P.C. Stevenson a J. Hillier v roce 1951. Zásadní je reakce kyseliny tetrachlorozlatité HAuCl_4 , která reaguje s citrátem sodným ve vodném prostředí. [13] Schématické znázornění Turkevičovy metody představuje následující Obr. 4.



Obr. 4 – Jednoduché schéma Turkevičovy metody [vytvořeno v ChemDraw]

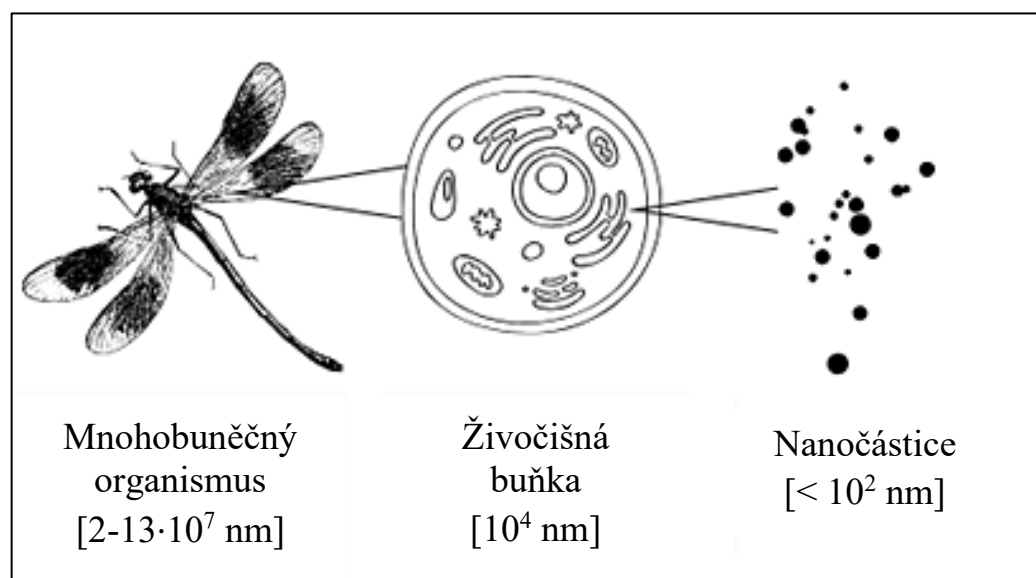
Při této metodě vznikají nanočástice různých velikostí na základě modifikace reakčních podmínek. Tato velikost se pohybuje v intervalu 15-150 nm. Abychom mohli výslednou velikost nanočástic kontrolovat a vytvořit téměř monodisperzní systém nanočástic o dané velikosti, upravujeme reakční poměr redukčního činidla k prekurzoru. [13] Podobného mechanismu využíváme pro přípravu nanočástic v této práci, a to pomocí selektivně oxidovaných polysacharidů. Následující kapitola se bude věnovat vlastnostem nejen nanočástic obecně, ale prolínají se zde i vlastnosti jedinečné pouze pro zlaté nanočástice.

1.3 Charakteristika nanočástic

Jelikož hovoříme o nanočásticích, které díky jejich velikosti řadíme z pohledu fyziky do mikrosvěta, nelze pak předpokládat stejné chování jako u makročásteček. V této kapitole se tedy budeme zabývat typickými vlastnostmi nanočástic obecně, což zahrnuje chemické, fyzikální a biologické rysy nanočástic, a taktéž vlastnostmi zlatých nanočástic, jež jsou esenciální pro tuto práci. [13]

1.3.1 Fyzikální vlastnosti




V této kapitole se budeme věnovat vybraným fyzikálním vlastnostem. Blíže se seznámíme s velikostí, tvarem, povrchovým nábojem a chováním nanočástic v biologickém prostředí, které je ovlivněno právě předešlými jmenovanými aspekty. Následně si ve stručném výkladu definujeme optické a elektrické vlastnosti, které jsou unikátní pro nanočástice kovů, tedy i zlaté nanočástice. V tomto kontextu si taktéž definujeme již zmiňovaný SPR efekt a jeho vliv na barevný projev koloidních roztoků nanočástic zlata.



Obr. 5 - Srovnání velikostí jednotlivých objektů v nanometrech [vytvořeno v Canva.com]

Velikost nanočástic

Po fyzikální stránce věci je důležitým prvkem velikost nanočástic, resp. jejich průměr. Tento faktor ovlivňuje řadu vlastností, např.: čím více se přibližujeme k částicím o rozměrech 10^{-9} m, tím vyšší je podíl počtu atomů vnější vrstvy částice ku atomům v objemu částice. Díky tomuto jevu se pak zvyšuje např. katalytická činnost právě zvýšením specifického povrchu. Následující Obr. 6 je grafickým znázorněním předcházejícího tvrzení. [13]

Počet atomových slupek		Počet atomů	Povrchové atomy (%)
1		13	92
2		55	76
3		147	63

Obr. 6 – Vztah velikosti nanočástice k počtu atomových slupek, celkovému počtu atomů a atomů povrchových [8]

Od velikosti se dále odvíjí teplota tání a hustota. Při bližším popisu teploty tání nanočástic musíme zohlednit tzv. Lindemannovo kritérium, které popisuje, že krystal začne tát, jestliže amplituda výchylek atomů z jejich rovnovážné pozice v krystalové mřížce přesáhne určitý zlomek meziatomové vzdálenosti. [8] S nárůstem teploty se totiž zvětšuje amplituda kmitání atomů. Atomy na povrchu materiálu, které mají nižší koordinační číslo, se pohybují výrazně více, s amplitudou kmitání 2–4krát větší než u atomů v objemu materiálu. To znamená, že tání nanočástic začne při nižší teplotě. [13] Závislost teploty tání na velikosti částice lze určit dle následujícího vztahu (1):

$$\frac{T_m(r)}{T_m(\infty)} = \exp \left[-(\alpha - 1) \cdot \left(\frac{r}{3h} - 1 \right)^{-1} \right] \quad (1)$$

$T_m(r)$ – teplota tání nanočástice

$T_m(\infty)$ – teplota tání objemového materiálu

α – nastavitelný parametr, který je určen dle experimentálních dat

r – poloměr nanočástice

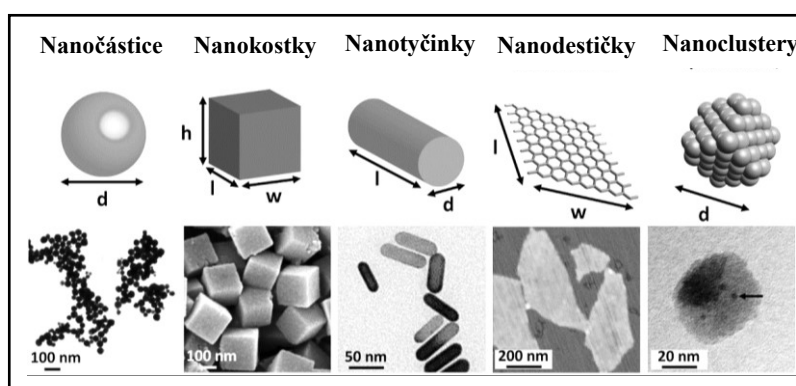
h – tloušťka nanovrstvy atomů

Aspekt velikosti je důležitý i při biologických aplikacích, např. biodistribuci nanočástic v těle. Při testování tohoto vlivu byly nitrožilně aplikovány nanočástice o velikosti 15-100 nm. [9] Bylo potvrzeno, že do orgánů nejlépe pronikají částice o velikosti 15 nm a zároveň úspěšně pronikly skrze bariéru mezi kapilárami mozku a mozkovou tkání. Největší nanočástice se hromadily především v játrech, ledvinách a slezině. [14]

Na velikosti nanočástic je závislá i jejich „clearance“, tedy množství (poměr) nanočástic, které se z těla vyloučí za čas. Nejmenší nanočástice (průměr v jednotkách nanometrů), se nejlépe čistí z krve skrze ledviny. Větší nanočástice (100-200 nm) jsou likvidovány pomocí mononukleárního fagocytárního systému, dále jen MFS. MFS je systém fagocytujících buněk vyskytujících se v játrech, slezině a kostní dřeni. [14]

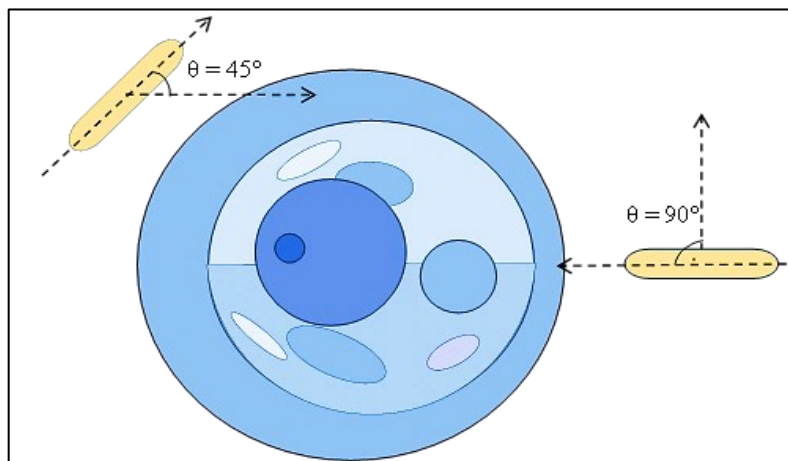
Tvar nanočástic

Další důležitou vlastností nanočástic je jejich tvar. Tvar určuje potenciální aplikaci nanočástic a jejich chování. Nanočástice disponují mnoha tvary, např. sférické, tyčinkové, oválné, krychlové, trojúhelníkové, hvězdy, jehličky, oktaedrální, rozvětvené, clustery a další. Jaký tvar mají dané nanočástice můžeme určit pomocí technologie SEM a TEM. [15] Vybrané tvary nanočástic jsou znázorněny na Obr. 7 níže:



Obr. 7 – Tvarová různorodost nanočástic [16]

Tvar je také esenciální pro biologické aplikace, např. z hlediska odbourávání fagocytárním systémem. V této souvislosti je důležitým parametrem plocha, kterou nanočástice prochází skrze membránu makrofága. S tím souvisí úhel dopadu, od kterého se odvíjí rychlost průniku nanočástice do buňky. Pro demonstraci závislosti kontaktního úhlu na internalizaci byl vytvořen následující Obr. 8, kde je zobrazen model nanočástic ve tvaru tyčinek. [14]



Obr. 8 – Závislost úhlu dopadu na rychlosti internalizace tyčinkových nanočástic [vytvořeno v Canva.com]

Jestliže takto tvarovaná nanočástice dopadne v závislosti na své delší ose souměrnosti na membránu makrofága pod úhlem větším/menším než 90° , pak proniká přes membránu makrofága větší plochou. Dopadne-li tyčinková nanočástice vůči své delší ose souměrnosti kolmo k membráně (úhel $\theta = 90^\circ$), pak proniká nanočástice menší plochou. Internalizace je v prvním případě pomalejší, zatímco v případě druhém rychlejší. [14]

Zajímavý tvar mají takzvané „nano hvězdy“. Ty díky svému povrchu mohou relativně dobře pronikat do nádorových buněk. Díky detekovatelnému signálu při měření povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) mají tyto nanočástice fungovat také jako citlivá kontrastní látka pro detekci nádoru. [17]

Povrchový náboj nanočástic

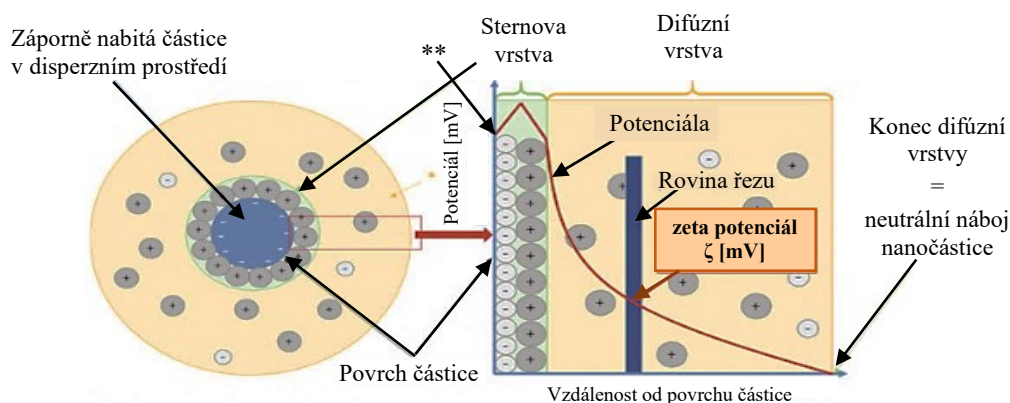
Povrchový náboj nanočástic je esenciální v rámci biologických aplikací nanočástic. Od povrchového náboje nanočástice se totiž odvíjí chování nanočástice v biologickém prostředí. Ve své podstatě tak můžeme nanočástice rozdělit na kladně nabitě nanočástice, dále jen NP^+ , záporně nabitě nanočástice, dále jen NP^- , a neutrální nanočástice, dále jen NP° . S ohledem na biologické aplikace nanočástic je směrodatný difúzní koeficient nanočástic a zeta potenciál, proto je vhodné tyto aspekty definovat. [14]

1) Difúzní koeficient – D_i

Zjednodušeně můžeme popsat difúzní koeficient D_i jako množství látky, které projde za určitý čas určitou plochou při daném koncentračním gradientu. Jednotkou difúzního koeficientu D_i je metr na druhou za sekundu $m^2 \cdot s^{-1}$. Je závislý na teplotě, tlaku prostředí a velikosti částice. [18]

2) Zeta potenciál – ζ

Zeta potenciál, dále ZP, je velmi důležitým parametrem, který číselně vyjadřuje čistý náboj nanočástic dispergovaných v kapalině. Dle hodnoty zeta potenciálu můžeme říci, zda jsou nabité nanočástice elektrostaticky stabilní a určitým způsobem dostáváme informace o povrchové vrstvě částic. [19] Následující Obr. 9 představuje grafické znázornění ZP.



** Povrchový náboj částice = Nernstův potenciál: nelze měřit přímo kvůli neoddělitelné Sternově vrstvě – místo toho se měří **zeta potenciál ζ**

Obr. 9 – Grafické znázornění Zeta potenciálu [20]

Měření ZP je založeno na elektrické dvojvrstvě, která vznikne interakcí povrchového náboje částice a kontinua, které neutralizuje náboj částice díky nadbytku iontů opačného náboje. Elektrická dvojvrstva je složena ze dvou částí, a to ze Sternovy vrstvy (pásma bližší k povrchu částice) a difúzní vrstvy (vnější pásmo). Sternova vrstva je popisována jako téměř imobilní a může zahrnovat i adsorbované ionty, zatímco difúzní vrstva je důležitá pro difúzi iontů různě rozložených na základě elektrických sil a tepelného pohybu. Lze definovat ještě třetí vrstvu, tj. vrstvu popisující pomezi kapaliny a nanočástice, označovanou jako kluznou vrstvu. Základní jednotkou ZP je pak milivolt mV. [19]

NP^+ mají nízký difúzní koeficient vzhledem k prostupnosti skrz kůži do těla. Tento efekt nejspíše ovlivňuje kyselý plášť kožní a látky, které jsou typické pro bariérovou funkci kůže. Ohledně kumulace ve vnitřním prostředí se NP^+ hromadí především v plicích, jelikož interagují s krvinkami, agregují a zachytí se v plicích kapilárách. NP^+ mají $\text{ZP} > 10 \text{ mV}$ a díky svému náboji vyvolávají shlukování sérových proteinů. NP^- mají dermálně, narozdíl od NP^+ , vysoký difúzní koeficient a díky tomu rychleji kůži prostupují. Jejich $\text{ZP} < -10 \text{ mV}$ a výrazně se vstřebávají MFS. [14]

Vzhledem k výše popsaným interakcím vědci učinili závěr, že nejvhodnější pro biologické aplikace jsou nanočástice neutrální, NP^0 , jejichž ZP se pohybuje v intervalu $[-10;+10]$ mV. NP^0 totiž minimálně ovlivňuje MFS a mají tak delší čas oběhu. Právě díky zmíněnému chování NP^0 jsou nejpraktičtější, jelikož nepodléhají negativnímu vlivu působení povrchového náboje částice. [14]

Optické vlastnosti

U nanočástic je rozsah barevných projevů jejich roztoků opravdu široký. Optický projev nanočástic závisí na velikosti přechodu mezi valenční vrstvou a vodivostním pásem. Valenční vrstvu lze definovat jako elektronovou vrstvu, která je energeticky nejvyšší a je stále obsazena alespoň jedním elektronem a vodivostní pás lze popsat jako energetický rozsah, ve kterém mohou elektrony volně přecházet do vyšších energetických stavů. Právě tyto vrstvy mají určitou energetickou hladinu a při přechodu elektronů mezi těmito oblastmi pak dochází k fyzikálním jevům, jako je emise a adsorpce světla. [21]

Barevné změny roztoků nanočástic ušlechtilých kovů jsou závislé na velikosti částic a jsou projevem povrchové plazmonové rezonance (SPR), tj. interakce vnějších elektronových pásů částic s optickými vlnovými délkami. Všechny elektrony v těchto pásech se totiž chovají jako jedna pseudočástice. Závisle na vlnových délkách absorbují světlo a pak se rozkmitají ve shodné rezonanci. Toto se děje pouze za podmínky excitace vnějších elektronů částic světelnými fotony. Tento vztah lze matematicky vyjádřit teorií rozptylu světla dle Mie a Rayleigha. [21]

V důsledku SPR efektu je u roztoků nanočástic některých kovů barevná změna závislá na velikosti částic a nabízí širokou paletu barev. Například nanočástice zlata, jejichž průměr je pod 5 nm, vykazují žluté zbarvení, zatímco nanočástice zlata o velikosti nad 5-10 nm mají červenou barvu roztoku. Dále, barevné spektrum zlatých nanočástic s rostoucí velikostí (nad 20 nm) získává fialový projev. Oproti tomu stříbrné nanočástice mají při velikosti okolo 40 nm barvu modrou, kolem 100 nm žlutou. Zde můžeme sledovat i závislost na tvaru nanočástic, kdy stříbrné nanočástice hranolovitého tvaru se jeví červeně. [21]

Elektrické vlastnosti

Vzhledem k velmi malým velikostem mají na nanočástice velký vliv kvantově mechanické vlastnosti elementárních částic, resp. jejich chování vychází z tezí kvantové mechaniky. Nanočástice se vyskytují v diskrétních energetických stavech a tato skutečnost se nejvíce projevuje, jestliže je velikost nanomateriálu srovnatelná s de Broglieho vlnovou délkou elektronů (*velikost de Broglieho vlnové délky typická pro elektron v kovu ~ 10 nm*). Někdy můžeme sledovat přeměnu materiálu na izolant, a to při snížení velikosti, z důvodu ztráty překryvu energetických pásů elektronů. [21, 22]

V nanomateriálech mohou elektrony mezi sousedícími nanostrukturami kvantově mechanicky tunelovat, a to v případě, překonají-li elektrony bariéru mezi strukturami při zanedbatelné vzdálenosti. Tunelování můžeme zesílit přivedením napětí mezi tyto struktury. Takové tunelování označujeme jako rezonanční. Na tomto efektu je založena rastrovací tunelová mikroskopie (STM), která sleduje změny v elektronovém tunelování mezi hrotem mikroskopu a povrchem konkrétního vzorku. Díky tomu získává mikroskop po zpracování detailní obraz dané struktury. [21, 23]

1.3.2 Chemické vlastnosti

Stabilizátory a povrchové modifikace nanočástic

Chemické vlastnosti nanočástic ušlechtilých kovů jsou odlišné od chemických vlastností makrostruktur. Ukázkovým příkladem jsou nanočástice zlata. Nanočástice jsou chemicky aktivní, resp. mají povrch chemicky reaktivní, oproti makroskopickým částicím zlata, které jsou chemicky inertní a odolné vůči oxidaci. Vlastnosti a potenciální aplikace pak určují především látky, pomocí kterých nanočástice stabilizujeme a modifikujeme povrch nanočástic. [24, 25]

Chemické skupiny na povrchu nanočástice následně stanovují jejich katalytické, cytotoxické a genotoxické vlastnosti. Jinak řečeno, dle námi požadované aplikace vybíráme vhodné biologické či organické látky, které upraví povrchové vlastnosti. Můžeme tak vybrat vhodné biologicky aktivní a biokompatibilní látky vhodné dle biomedicínských aplikací nanočástic. Následující text popisuje rozdíly mezi nekovalentními a kovalentními interakcemi mezi částicí a látkou, která ji stabilizuje. [24, 25]

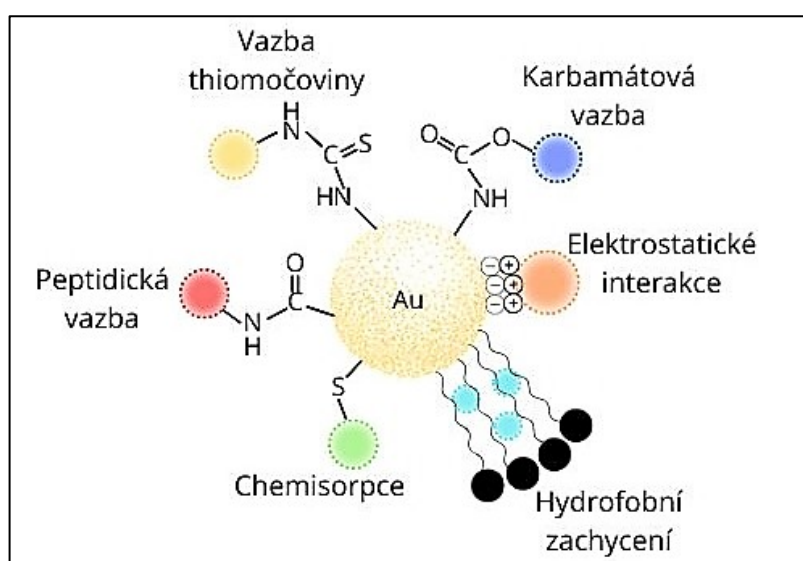
1) Interakce kovalentní

Pro tento způsob stabilizace zlatých nanočástic je typické silné vazebné působení mezi zlatým jádrem a koncovou thiolovou skupinou biomolekuly či biopolymeru, tedy vznik silné vazby mezi sírou S a kovem (Au, Ag). Výhodou oproti nekovalentním interakcím je vyšší stabilita a účinnější reprodukovatelnost. Mezi takové patří např. thiolovaný polyethylenglykol (thiol-PEG), thiolovaný polyoxazolin (thiol-POx) a poly(styren sulfonát) (PSS). Tyto nanočástice již našly uplatnění při různých biomedicínských aplikacích jako např. detekce viru hepatitidy C, regulace nitrobuněčných genů a detekci rtuťnatých iontů. [25]

2) Interakce nekovalentní

Tento typ interakcí je typický při stabilizaci biomolekulami, jejichž koncové skupiny nevykazují silné vazebné interakce se zlatým jádrem. Takovouto biomolekulou myslíme DNA, peptidy, protilátky nebo polysacharidy a další. Vzájemné působení mezi povrchem nanočástice a biomolekulou je většinou založeno na jejich opačném náboji či slabých interakcích, což má za následek vzájemnou přitažlivost. [25]

Jelikož se využívají biologicky aktivní látky pro tělo přirozené, je tento typ stabilizace vhodný pro biomedicínské aplikace. Zajímavé využití u tohoto typu stabilizace je zapouzdření léčiva do nanočástic, které jsou připraveny jako systémy amfifilní povahy (micely) a vytvořit tak drug-delivery systém. Přípravě amfifilních nanočástic, jakožto drug delivery systému, se věnoval například Rotell a další, kteří enkapsulovali do připravených amfipatických nanočástic hydrofobní léčiva typická pro protinádorovou terapii. Následující Obr. 10 znázorňuje možné funkční modifikace povrchu zlatých nanočástic pro biomedicínské aplikace. [25]



Obr. 10 – Funkční modifikace povrchu zlatých nanočástic pro biomedicínské aplikace [vytvořeno v Canva.com]

V rámci této práce je ovšem esenciální modifikace povrchu pomocí selektivně oxidovaných polysacharidů. Výslednou interakci karboxylových skupin (-COOH) s povrchem zlaté nanočástice lze klasifikovat jako interakci elektrostatickou. [26] Popisu této interakce mezi selektivně oxidovanými polysacharidy a zlatým jádrem se věnuje nadcházející kapitola 3 - Zlaté nanočástice připravené pomocí selektivně oxidovaných polysacharidů.

1.3.3 Biologické vlastnosti

Chceme-li nanočástice považovat za biomateriál, je důležité sledovat jejich vlastnosti v biologickém systému. Mezi kvality, které o materiálu vypoví, zda je vhodný pro biomedicinské aplikace, patří cytotoxicita, tkáňová penetrace, antibakteriální, protiplísňové a antivirové vlastnosti, degradace, kumulativnost a mnoho dalších. Následující text se věnuje výběru z vyjmenovaných vlastností. [27]

Cytotoxicita

Jedním ze základních požadavků pro biomedicinské aplikace nanočástic je cytotoxicita, tedy schopnost látky být toxickou pro buňky. Cytotoxicitu ovlivňuje několik faktorů, a to především velikost, tvar, jaké funkční skupiny používáme ke stabilizaci, resp. stabilizační a redukční činidla, krystalická struktura a koncentrace nanočástic. Studiu vlivu vyjmenovaných vlastností na cytotoxicitu zlatých nanočástic se věnovaly mnohé výzkumy. Závěry vybraných studií shrnuje Tab. 2 na následující str. 30. [27, 28]

Tyto výzkumy se zabývaly cytotoxicitou u různých typů buněčných linií pomocí testování *in vitro*. Sledoval se vliv cytotoxicity na karcinogenní buněčné linie – hepatocelulární karcinomové buňky (HepG2), karcinomové buňky z nádoru děložního čípku (HeLa), karcinomové buňky prsu (MDA-MB-231) a buňky leukemické - chronické myeloidní leukemie CML (K562), následně buňky ledvin opice *Cercopithecus aethiops* (COS-7; COS-1), červené krvinky, myší fibroblasty (NIH/3T3), myší makrofágy (RAW264.7), lidské dermální fibroblasty a bakterii *Escherichia coli*. [27]

Zlaté nanočástice, jejichž cytotoxicita byla sledována, měly různé povrchové úpravy. Byly zkoumány nanočástice stabilizované polyethyliminem s nízkou molekulovou hmotností (PEI2), albuminem z krve skotu (BSA), 4 cílenými peptidy, amoniakem (NH₃), látkami s karboxylovou skupinou (-COOH), citrátem, biotinem (vitamin B7), L-cysteinem, glukózou, cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB), thiolovanou molekulou coumarinu s polyethylenglykolem (Coumarin-PEG-thiol), thiolovaným monomethylenglykolem (mPEG-thiol), lysinem, poly-L-lysinem (PLL) a fluorescein isothiocyánát (FIFTC) nebo glutathionem (GSH). [27]

Tab. 2 – Cytotoxicita zlatých nanočástic (testování in vitro) [27]

Buněčná linie	Povrchová úprava	Podmínky expozice	Koncentrace nanočástic (průměrná velikost)	Typ testu	Doba expozice	Vyhodnocení toxicity	Autor	Rok
COS-7	PEI2	3·10 ⁵ buněk v jedné jamce	N/A	MTT	6 h + 42 h	70-80 % životaschopnost	Thomas	2003
HepG2	BSA	85% konfluence	N/A (d = 20-25 nm)	LDH	12 h	Mírně ohrožená životaschopnost (< 5 %)	Tkačenko	2003
	4 cílové peptidy							
COS-1	NH ₃ /-COOH	80% konfluence (96 jamek)	0,38 μM	MTT/Trypan blue	1 h	LD ₅₀ (COS-1): anionické – 1 μM a kationické > 7,3 μM	Goodman	2004
Červené krvinky			0,75 μM		2,5 h			
<i>E. coli</i>			1,50 μM		6 h			
			3,00 μM		24 h			
HeLa	BSA/4 cílové peptidy	75% konfluence	150 pM (d = 22 nm)	LDH	3 h	Životaschopnost buněk se snížila o 20 % u HeLa, ovšem pouze o 5 % u NIH/3T3	Tkačenko	2004
NIH/3T3								
HepG2								
K562	Citrát	10 ⁴ buněk v jedné jamce	0-250 μM Au atomů (d = 4, 12, 18 nm)	MTT	3 dny	Při 250 μM žádná zjevná toxicita a nanočástice modifikované glukózou a L-cysteinem nejsou toxické až do 25 μM	Conor	2005
	Biotin							
	L-cystein							
	Glukóza							
	CTAB							
MDA-MB-231	Coumarin -PEG-thiol	10 ⁵ buněk v jedné jamce (96 jamek)	50-200 μg/ml (d = 10 nm)	CellTiter 96	24 h	Nanočástice byly internalizovány, ovšem prakticky netoxické až do 200 μg/ml	Fu/Shenoy	2005
	mPEG-thiol							
RAW264.7	Lysin	10 ⁵ buněk v jedné jamce (96 jamek)	10, 25, 50 a 100 μM (d = 3-8 nm)	MTT	24 h	100 μM – po 72 h expozici se snížila životaschopnost na 85 %	Shukla	2005
	PLL				48 h			
	FIFTC				72 h			
Lidské dermální fibroblasty	Citrát	N/A	0-0,8 mg/ml (d = 13 ± 1 nm)	Mikroskopie	2–6 dní	Pokles buněčné plochy a hustoty buněk v závislosti na dávce (mnoho vakuol)	Pernodet	2006

Jelikož je cytotoxicita velice komplexní problematikou, nelze posoudit jednoznačně, jaké zlaté nanočástice jsou nejméně cytotoxické. Avšak posoudíme-li cytotoxicitu postupně dle daných kritérií, můžeme stanovit některé závěry.

První kritérium, které můžeme posoudit, je velikost nanočástic. Byl potvrzen trend, při kterém menší nanočástice, jejichž velikost se pohybovala zhruba kolem 1,4 nm, vykazovaly vyšší cytotoxicitu, avšak lépe procházely skrze buněčnou membránu. Zatímco u nanočástic o rozměrech kolem 20 nm a více, byla prokázána nižší cytotoxicita a současně nižší penetrace skrze biomembrány. Zajímavostí je, že nanočástice o rozměrech 50 nm mohou být méně cytotoxické a nezasahují do pohyblivosti mužských pohlavních buněk. [27]

Další kritérium, které je důležité pro cytotoxicitu zlatých nanočástic, je modifikace jejich povrchu. U tohoto kritéria se výzkumy shodly, že nanočástice připravené pomocí citrátu vykazovaly vyšší cytotoxicitu nežli nanočástice stabilizované pomocí polymerů nebo GSH. Důležité je konstatovat, že tento faktor je závislý na buněčné linii podrobené testování. Například u hepatocytů byla sledována vyšší citlivost v rámci cytotoxicity. Oproti tomu kmenové buňky a buňky epitelu mají tendence k nižší citlivosti na zlaté nanočástice. [27]

Pro testování je taktéž velmi důležitá doba expozice, tedy časový úsek, po který jsou buňky vystaveny nanočásticím. Zde není překvapivé, že je cytotoxicita přímo úměrná době expozice. Jinými slovy, čím déle jsou testované buněčné linie vystavovány zlatým nanočásticím, tím vyšší je cytotoxicita nanočástic. Tato vlastnost souvisí například s degradací nanočástic atp. Degradace nanočástic je úzce spojena s oxidačním stresem a tvorbou sloučenin kyslíku (ROS). Jestliže se nadměrně tvoří tyto sloučeniny, může pak docházet k narušení buněčných kompartment. Proto je důležitá správná volba stabilizátoru, jelikož vhodné stabilizační činidlo může pomoci ke snižování tvorby oxidů a s tím související cytotoxicity. [27]

Testy *in vitro* jsou důležité pro primární stanovení cytotoxicity, ovšem podmínky v živém organismu jsou rozdílné od podmínek laboratorních. Proto je důležité stanovit toxicitu nanočástic na živém organismu pomocí testů *in vivo*, díky čemuž můžeme lépe pochopit, jak se nanočástice mohou chovat v lidském těle.

Studie *in vivo* probíhaly na mnoho různých organismech. AuNPs a jejich prekurzor (HAuCl_4) byly testovány na krysách (s ohledem na pohlaví), embryích různých živočichů, myších (s ohledem na pohlaví a vliv na plod), brojlerových kuřatech, octomilkách ovocných (*Drosophila melanogaster*) a různých typech korýšů (*Daphnia magna*, *Moina macroscopa*, *Tardigrada articus*). Díky těmto studiím máme přehled o specifických imunitních odpovědích a chování zlatých nanočástic při expozici daných živočichů. Tyto studie tak přináší velmi cenné znalosti pro budoucí biomedicínské použití. [29]

V některých studiích byl kladen důraz i na konkrétní povrchovou modifikaci zlatých nanočástic. Ve studiích se tak pracovalo se zlatými nanočásticemi, které byly modifikovány na povrchu polyethylenglykolem (PEG), citrátem, glutathionem (GSH), albuminem izolovaným z hovězího séra (BSA) a dalšími konkrétními modifikacemi. Pro naše účely jsou zajímavé nanočástice s citrátovou povrchovou funkcionalizací, jelikož citrát má stejné funkční skupiny jako selektivně oxidované polysacharidy. Samozřejmě je důležité vzít v potaz, že molekuly selektivně oxidovaných polysacharidů a molekula citrátu je strukturně naprosto odlišná, a proto by se výsledný efekt zlatých nanočástic připravených pomocí selektivně oxidovaných polysacharidů měl taktéž odvíjet od délky řetězce polysacharidů a dalších aspektů. [29]

Závěry studií naznačují, že nanočástice podané intravenózně způsobují apoptózu a zánět jaterní tkáně, přičemž mnoho studií potvrdilo kumulativnost nanočástic v orgánech – nejčastěji právě v játrech a slezině, což následně vedlo k poškození těchto orgánů. Opravdu malé nanočástice vykazovaly vysokou genotoxicitu, poškozovaly DNA (fragmentování) a podporovaly změny genové exprese. Velké nebezpečí bylo sledováno u nanočástic malých rozměrů, které byly schopné pronikat hematoencefalickou bariérou. Paradoxně byla ovšem zaznamenána nulová cytotoxicita těchto nanočástic. [29]

Dalším důležitým subjektem testování byl vliv nanočástic na plod. Studie překvapivě prokázaly, že nanočástice ve většině případů neprostupovaly bariérou oddělující plod od matky, a neprojevovaly žádnou toxicitu. Při testování na embryích dávná pruhovaného (sladkovodní ryba) byl ovšem prokázán vliv na vývoj smyslových orgánů optických – vývoj očí a na výslednou pigmentaci jedinců, která byla pro tento druh ryb netypická. Veškeré závěry těchto studií shrnuje ve stručném přehledu následující Tab. 3 na str. 33. [29]

Tab. 3 - Cytotoxicita zlatých nanočástic (testování in vivo) [29]

Organismus	Typ nanočástic	Efekt nanočástic	Autor	Rok
Krysy (bez specifikace)	AuNPs	Změny v genové expresi	S. K. Balasubramanian	2010
		Žádné účinky na varlata, zatímco byly zaznamenány mírné změny v morfologii jater a ledvin	B. Yahyaie	2019
	AuNPs modifikované PEG	Kumulace ve slezině a játrech	J. Lipka	2009
		ROS-indukovaná cytotoxicita závislá na velikosti částic	Xiaomin Li	2018
Winstar krysy	AuNPs	Stopy AuNPs v ledvinách, slezině, játrech, střevu, moči a výkalech. Menší AuNPs projevily větší poškození DNA.	C. Lopez-Chaves	2018
	AuNPs modifikované citrátem	Kumulace v neuronech, játrech, slezině, ledvinách a potvrzení volného průchodu skrze hematoencefalickou bariéru – nebyla potvrzena žádná toxicita	C. Lasagna-Reeves	2010
Samci krys Winstar	AuNPs	Potvrzená kumulace a perzistence ve slezině a játrech	S. K. Balasubramanian	2010
Samci krys WU Winstar	AuNPs	Velké nanočástice se objevily v krevním řečišti, slezině a játrech, zatímco menší se objevily skoro ve všech orgánech	W.H. De Jong	2008
Myši (bez specifikace)	AuNPs na nanočásticích galia	Krvácení plic a ledvin, infiltrace do lymfocytů a vznik zánětu	H. Liu, M. Liu a X. Liu	2013
	AuNPs modifikované PEG	Poškození jater	X. D. Zhang	2011
		Vyvolání apoptózy a akutní zánět	W.S. Cho	2009
	AuNPs modifikované GSH a BSA	Vliv na funkci ledvin a vyvolání cytotoxicity	X. D. Zhang	2012
	AuNPs	Poškození nervového systému	J. Chen a Y. S. Chen	2012
		Indukovaná redukce červených krvinek, změny sleziny a snížení tělesné hmotnosti	X. D. Zhang	2010
	AuNPs modifikované citrátem	Nejvyšší potvrzená toxicita	X. D. Zhang	2010
	AuNPs modifikované BSA	Nemá žádný vliv na normální růst	T. H. L. Nghiem	2012
Holé koloidní AuNPs	Testování jedinci ztratili chuť k jídlu a snížila se jejich tělesná hmotnost, avšak malé AuNPs nevyvolaly žádnou negativní imunitní reakci	Y. S. Chen	2009	
Myši (samci i samice)	AuNPs	Poškození jater a ledvin závisle na pohlaví	J. Chen a Y. S. Chen	2012
BALB/c myši	AuNPs	Vznik apoptózy a zánětlivá reakce jater	E.C. Cho a W.S. Cho	2009
Myši (ddy)	AuNPs	Všechny velikosti použitých nanočástic byly prokázány ve slezině, játrech a plicích	G. Sonavane	2008
Samci myši CD1	Funkcionalizované AuNPs	Kumulace v různých částech mozku	F. Sousa	2010
Samice myši	AuNPs	Nanočástice byly detekovány v plicích a makrofázích	E. Sadauskas	2009
	AuNHsd	Při všech koncentracích byla zaznamenána nulová úmrtnost	V. Venkatpurwar	2012
Těhotné myši C57BL/6	AuNPs	Nebyla překročena bariéra mezi matkou a plodem	E. Sadauskas	2007
Embryo dávná pruhovaná (sladkovodní ryba)	Funkcionalizované TMATeAuNPs	Zpožděný vývoj očí a zbarvení ryb	K. T. Kim	2013
Orgány plodu	AuNPs	Žádné projevy toxicity v plodu a placentě	K. Rattanapinyopituk	2014
Octomilka ovocná	AuNPs modifikované PEG	Projev přenosných mutagenních účinků	G. Vecchio	2012
		Byl sledován prudký pokles fertility a životnosti, zároveň byly nalezeny fragmenty DNA a nadměrná exprese stresových proteinů	P.P. Pompa	2011
Brojlerové kuře	AuNPs	Oxidační poškození krve, histopatologické změny, vyvolání exprese genu a fragmentace DNA, pokles protilátek proti ptačí chřipce a newcastelské chorobě	E.I. Hassanen	2020
<i>Daphnia magna</i>	HAuCl ₄	LC50 – 2 mg/l po 48hodinové expozici	J.J. Li, D. Hartono a T. Li	2010
		LC50 – 0,64 mg/l po 48hodinové expozici	S.H. Nam	2014
<i>Moina macroscopa</i>	HAuCl ₄	LC50 – 0,62 mg/l po 48hodinové expozici	J.J. Li, D. Hartono a T. Li	2010
<i>Tardigrada articus</i>	HAuCl ₄	LC50 – 14,4 mg/l po 96hodinové expozici	S.H. Nam	2014

Antibakteriální, antifungální a antivirové vlastnosti AuNPs

Z hlediska antibakteriálních vlastností zlatých nanočástic je opět důležité brát v úvahu, že i antibakteriální aktivita je závislá na několika aspektech, a to především na velikosti AuNPs. U nanočástic o velikosti jednotek nanometrů dochází k penetraci skrz membránu do bakterií. Díky tomu se mohou v bakteriích kumulovat a rychleji je zneškodnit. Zároveň je jejich nevýhodou vysoká povrchová energie. Menší nanočástice mají povrchovou energii vyšší než nanočástice o rozměrech desítek nanometrů, což může způsobit jejich agregaci a díky tomuto shlukování se snižují jejich antibakteriální vlastnosti. Tyto závěry byly stanoveny především pro nanočástice připravené tzv. „zelenou syntézou“, kdy jsou AuNPs stabilizovány pomocí biologických sloučenin. [30]

Předmětem výzkumů se stala bakterie *Escherichia coli*, jež je klasifikována jako gram-negativní bakterie a *Staphylococcus aureus* – česky zlatý stafylokok, který způsobuje hnisavé záněty a patří do skupiny bakterií gram-pozitivních. Při koncentraci nanočástic (o velikosti 20-50 nm) 10 µg/ml (u testování vlivu na zlatý stafylokok) a 100 µg/ml (u testování vlivu na *Escherichiu coli*) bylo zjištěno, že nanočástice inhibují syntézu vrstvy peptidoglykanu. Taktéž AuNPs narušují buněčnou membránu, což následně uměle vyvolává lyzi bakterií a následnému úniku vnitrobuněčného materiálu bakterií. [31] V roce 2020 byla též studována aktivita hybridních nanočástic zlata a chitosanu, avšak mechanismus účinku nebyl objasněn. [32]

Z pohledu antifungálních vlastností je zajímavý vliv tvaru nanočástic. U nanočástic, které jsou ve tvaru nanodrátků a nanokrychlí byla potvrzena výrazná antifungální aktivita. Jejich antifungální vlastnosti mohou být podpořeny specifickou povrchovou modifikací například pomocí peptidů, bílkovin a protilátek. Nejčastější linií pro testování antifungálního efektu nanočástic jsou kvasinky, zejména *Candida albicans*. U kvasinek dokáží AuNPs interagovat s vápníkem v mitochondriích a tím vyvolají jejich buněčnou smrt. Pro tyto závěry se nabízí zajímavá aplikace zlatých nanočástic v rámci biomateriálů, a to použití AuNPs jako nosičů antimykotických léčiv. [33]

Důležitou a atraktivní pro vývoj nových biomateriálů je taktéž antivirová aktivita nanočástic. Pro pochopení potenciálu nanočástic vzhledem k jejich antivirové aktivitě byl vybrán jeden z výzkumů, který se zabýval konkrétně AuNPs stabilizovanými pomocí citrátu, jejichž průměr se pohyboval kolem 20 nm. U těchto nanočástic byl studován vliv AuNPs na živostnost viru chřipky. [34]

Bylo potvrzeno, že nanočástice inhibují životní cyklus viru chřipky (především replikaci a reprodukci), což může pomoci k blokaci přichycení viru na buněčnou membránu. Z těchto výsledků můžeme usoudit, že zlaté nanočástice mají potenciál nejen jako antibakteriální a antimykotické nosiče léčiv, ovšem rovněž jako nosiče protivirových léčiv. [34]

1.4 Využití a aplikace nanočástic a nanotechnologií

Nanočástice všeobecně otevírají nepřehledné množství již funkčních či potenciálních aplikací v mnoha odvětvích. Z hlediska této kapitoly jsou pro nás podstatné aplikace AuNPs, jimž se tato práce věnuje. Ty můžeme využít, vzhledem k jejich fyzikálním vlastnostem definovaným v kapitole 1.3, v elektrotechnice pro výrobu elektronických součástek. Tyto součástky pak nabízejí vyšší rychlost přenosu a umožňují připojení více elektrických obvodů. [13]

Zlaté nanočástice taktéž mohou sloužit jako katalyzátory či substráty pro Ramanovu spektroskopii, kdy zvyšují signál molekul v blízkosti jejich povrchu. Takto upravenou Ramanovu spektroskopii nazýváme povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (zkratkou SERS), přičemž výsledný efekt je způsoben lokálním zesílením elektrického pole kolem nanočástic. Při této spektroskopické metodě by bylo následně možné detekovat chemické a biologické látky o velmi nízkých koncentracích. [35]

Dle zaměření této práce jsou ovšem nejpodstatnější aplikace biomedicinské. Právě těm se věnuje následující podkapitola „Biomedicinské aplikace zlatých nanočástic“.

1.4.1 Biomedicinské aplikace zlatých nanočástic

Zlaté nanočástice mají velký potenciál jakožto biomateriály. Nabízí se využití v oblasti teranostiky (tzn. terapie a diagnostika), zobrazovacích metod nebo jakožto nosiče léčiv a v regenerativní medicíně/tkáňovém inženýrství. V oblasti biomateriálů přináší nanočástice řadu možností díky své efektivitě a šetrnosti v léčbě smrtelných nemocí, na rozdíl od současných léčebných postupů, které často přinášejí vedlejší účinky, jako např.: riziko poškození zdravých orgánů, tkání či oslabení imunity. Pro lepší pochopení role nanočástic v těchto oblastech je vhodné určit modelový systém, na kterém lze demonstrovat konkrétní možnosti aplikací. Pro účely následujícího textu byly jako model zvoleny nádorová onemocnění – obecně označované jako „rakovina“. [36]

Zobrazování a diagnostika

Zlaté nanočástice mají dvě zásadní výhody oproti jiným látkám běžně užívaným v diagnostice a zobrazování (magnetická rezonance – MRI a rentgenové zobrazování). Díky svým fyzikálním vlastnostem vytváří jasnější obraz vzhledem k jejich SPR efektu a jsou detekovány i při minimálních koncentracích a to kolem 10^{-6} mol/l. Díky zmíněným vlastnostem jsou tak výhodné jakožto kontrastní látky. [37]

S použitím vhodných sekundárně navázaných látek receptorové povahy (peptidy) bychom mohli nanočástice zacílit přímo na receptory membrány nádoru. Tímto způsobem získáme detailní obraz rozsahu tumoru v postižené oblasti nebo budeme schopni podrobně sledovat průběh léčby a potlačení nádoru. Dále by se daly nanočástice využít jako biosenzory v rámci prevence, kdy by sloužili jako první varovné znamení při vzniku rakovinných ložisek. [37]

Nosiče léčiv

Zlaté nanočástice mohou sloužit při léčbě karcinomů například formou nosičů léčiv. Z hlediska sekundární vrstvy lze na stabilizované a purifikované nanočástice navázat radioaktivní izotopy. Takto připravené nanočástice by hrály významnou roli při radioterapii. Dalším způsobem je navázání protinádorového léčiva, kdy by nanočástice byly schopny dopravit dané léčivo hluboko do tkáně nádoru vzhledem k jejich velikosti. V neposlední řadě lze na nanočástice navázat antigeny pro využití při genové terapii nebo stimulanty imunitní odpovědi při imunoterapii. [36]

Přímá terapie (léčba)

Jednou z nabízejících se terapií je speciální typ protirakovinné léčby známý jako fototerapie. Díky jedinečné schopnosti zlatých nanočástic absorbovat světlo, resp. světelnou energii, s následnou konverzí na teplo. Principiálně by nanočástice byly modifikovány pomocí peptidů specifických pro dané typy rakovinných buněk. Peptidy by se připojily k membráně nádorových buněk a po následném přímém ozařování postižené oblasti by vznikalo teplo, jenž by vyvolalo buněčnou smrt rakovinné tkáně. S ohledem na pohlcování záření především zlatými nanočásticemi, se tak bavíme o velmi šetrné metodě protirakovinné léčby vzhledem k okolní zdravé tkáni nezasážené tumorem. [36]

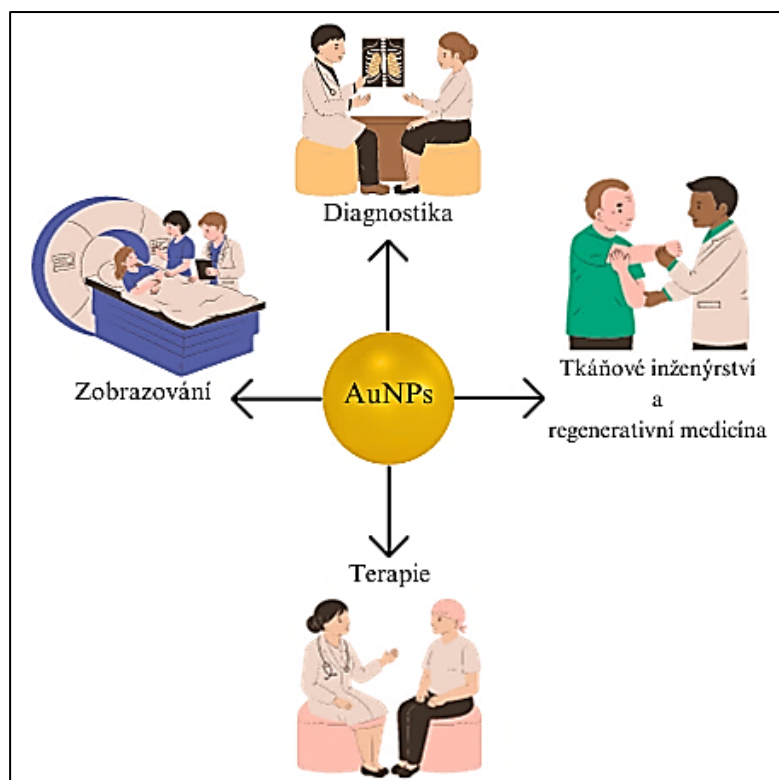
Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína (TIRM)

Ohledně TIRM aplikací AuNPs byly v poslední době vysloveny teze o podpoře diferenciaci kmenových buněk na buňky kostní tkáně, tzv. osteoblasty, které mineralizují extracelulární matrix kosti díky AuNPs. Na základě těchto tezí již proběhlo mnoho výzkumů, které vyřčené cíle potvrdily, avšak dodnes není přesně popsán mechanismus působení zlatých nanočástic při regeneraci kostní tkáně. [38]

Dalším příkladem využití v oblasti TIRM je použití AuNPs zesíťovaných přírodními/syntetickými polymery. Takto připravené nanočástice následně slouží jako scaffoldy (buněčná lešení) napodobující extracelulární matrix (ECM), což má za následek podporu regenerace, proliferace, adheze a migrace buněk – neuronů, osteoblastů, chondroblastů, myocytů a kardiomyocytů. [38]

Výhodou scaffoldů, jejichž základem jsou AuNPs, je jejich výborná elektrická vodivost, která je prospěšná pro komunikaci kardiomyocytů či neuronů. AuNPs zároveň pomáhají zdokonalit mechanické vlastnosti scaffoldu. Výzkumy navíc potvrdily schopnost materiálu zvýšit buněčnou proliferaci/adhezi, a zároveň potlačit vznik vedlejších produktů degradace biomateriálu, jež zpomalují proces hojení rány. [38]

Zlepšení vlastností zlatých nanočástic, např. biokompatibility, určených pro biomedicínské aplikace lze dosáhnout, jak již bylo výše zmíněno, pomocí biopolymerů. Podstatné pro náplň této práce jsou tak sacharidy, resp. polysacharidy, jimž se věnuje následující kapitola.



Obr. 11 – Biomedicínské aplikace zlatých nanočástic (AuNPs)
[vytvořeno v Canva.com]

2 SACHARIDY

Sacharidy lze považovat za jednu z hlavních organických látek neodmyslitelných v rámci biochemických procesů. Co se týče prvkového zastoupení v jejich struktuře, pak jejich obecná stavba je založena pouze na vodíku H, kyslíku O a uhlíku C. Samozřejmě lze sacharidy modifikovat pomocí jiných prvků/skupin za vzniku jejich derivátů. [39]

Sacharidy mají mnoho funkcí, mezi které patří funkce energetická – oproti lipidům „promptní zdroj energie“, funkce stavební (strukturní molekuly a důležité součásti biologických membrán) a tvoří podstatnou součást nukleových kyselin, tedy (deoxy)ribonukleové kyseliny DNA a ribonukleové kyseliny RNA, jakožto nosiči genetické informace. [39]

Dle počtu základních stavebních jednotek je dělíme na monosacharidy, které jsou základem pro zbylé skupiny sacharidů, jelikož obsahují ve své struktuře pouze jednu stavební jednotku. Dále rozlišujeme sacharidy na oligosacharidy, jež obecně obsahují 2-10 monosacharidových jednotek, a poslední skupinou jsou polysacharidy, jimž se věnuje následující podkapitola. [39]

2.1 Polysacharidy

Polysacharidy jsou přírodní polymery obsahující ve své struktuře více než deset monosacharidových jednotek (typicky stovky až tisíce). Tyto monosacharidové jednotky jsou spojeny glykosidickou vazbou, často mezi prvním a čtvrtým či šestým uhlíkem, příp. druhým nebo třetím uhlíkem. Stejně tak jako jiné polymery mohou mít větvenou či jednoduchou strukturu a ve své struktuře obsahují konce redukující a neredučující v závislosti na druhu polysacharidu. [39]

Rozdělit polysacharidy můžeme například dle jejich struktury. Polysacharidy, v jejichž struktuře se vyskytuje jeden a stejný monosacharid, nazýváme homoglykany a v opačném případě jsou to heteroglykany. Následující výčet zahrnuje nejpodstatnější zástupce z jmenovaných skupin, příp. jejich deriváty, a jejich stručný popis dle potřeby této práce. [39]

2.1.1 Celulóza

Prvním polysacharidem, na němž byla metoda přípravy zlatých nanočástic pomocí selektivně oxidovaných polysacharidů v této práci sledována, byla celulóza. Její struktura je lineární a celulózu lze zařadit do skupiny homoglykanů, jelikož je složena z monosacharidových jednotek glukózy, jež jsou spojeny β -(1 \rightarrow 4) glykosidickými vazbami. Řadí se mezi nejběžnější organické látky na naší planetě a nalézt ji můžeme například ve vyšších rostlinách, kde plní stavební funkci. Není rozpustná ve vodě a taktéž ji většina živočichů (včetně lidí) nedokáže enzymaticky rozložit, avšak lze dosáhnout její rozpustnosti ve vodném prostředí selektivní oxidací. [39]

2.1.2 Hyaluronát sodný

Hyaluronát sodný lze jednoduše definovat jakožto sodnou sůl kyseliny hyaluronové. Je vysoce hydrofilní, taktéž jako samotná kyselina hyaluronová, a proto je dobře rozpustný ve vodě. Jestliže bychom porovnali hyaluronát sodný s kyselinou hyaluronovou, tak jeho výhodou je především jeho stabilita, neboť kyselina hyaluronová má tendenci k rychlé degradaci, zatímco hyaluronát (HA) nikoliv. [40]

Vzhledem k biologickým aplikacím je pak zajímavá molekulová hmotnost HA. Bylo zjištěno, že vysokomolekulární HA je protizánětlivý, například při onemocnění plic při *in vivo* testování na potkanech byla sledována retardace až úplné potlačení zánětu. Dále HA dokáže zabraňovat epitelové apoptóze, vyskytuje se v synoviální tekutině kloubů, kde slouží jako mazivo, čímž snižuje mechanické zatížení kloubů a v neposlední řadě inhibuje angiogenezi. Této inhibice by se tak dalo využít při léčbě novotvarů. Problémem je ovšem jeho degradace v těle, protože nízkomolekulární HA má naopak tendence podporovat tvorbu nových cév. Proto je často asociován se stimulací růstu novotvarů. Zajímavý je taktéž oligo HA, jenž podporuje adhezi buněk. U oligo HA byla potvrzena retardace růstu novotvarů u některých druhů rakoviny a zvýšení vnímavosti rakovinných buněk odolných vůči protinádorovým léčivům. [41]

Stejně jako u celulózy je řetězec hyaluronátu sodného lineární a je tvořen z opakujících se úseků disacharidu složeného z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu spojených β -(1 \rightarrow 3) glykosidickou vazbou. Narozdíl od celulózy jej tedy řadíme vzhledem k jeho struktuře do skupiny heteroglykanů. HA a další soli kyseliny hyaluronové můžeme najít v lidském těle především ve tkáni chrupavky, avšak nalézt jej můžeme i v ECM všech tkání,

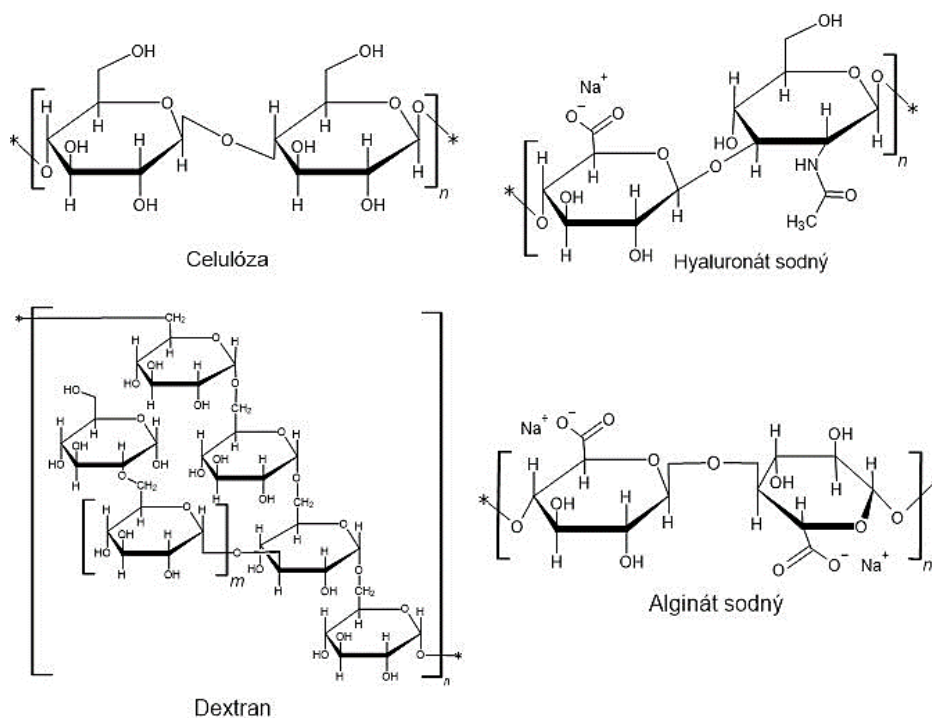
kde zadržuje vodu (hydratuje) a vzhledem k chrupavce podporuje skluz kloubů proti sobě, aby nedošlo k poškození kloubů. [42]

2.1.3 Dextran

Dalším vybraným zástupcem je dextran. Dextran je, narozdíl od předešlých zástupců, větvený a je produkován mléčnými bakteriemi např. rodu *Lactobacillaceae*, *Leuconostoc dextranicum* a *Streptobacterium dextranicum*, které přeměňují sacharózu. Následným větvením posléze získáme dextran. Monomerem dextranu je α -D-glukóza, jejíž monosacharidové jednotky jsou spojeny nejčastěji α -(1 \rightarrow 6) a α -(1 \rightarrow 3) glykosidickými vazbami. Oproti výše uvedené celulóze je dextran rozpustný ve vodě. [43]

2.1.4 Alginát sodný

Alginát sodný je, obdobně jako výše uvedený hyaluronát sodný, sodná sůl kyseliny alginové. Tento polysacharid se získává z mořských řas a je přítomen v jejich buněčné stěně. Jeho struktura je založena na jednotkách kyseliny L-guluronové a D-manuronové spojených pomocí β -(1 \rightarrow 4) glykosidických vazeb. Je to polysacharid lineární a řadíme jej do skupiny heteroglykanů. [44] Veškeré strukturální vzorce polysacharidů popsanych v této podkapitole jsou zobrazeny na následujícím Obr. 12.

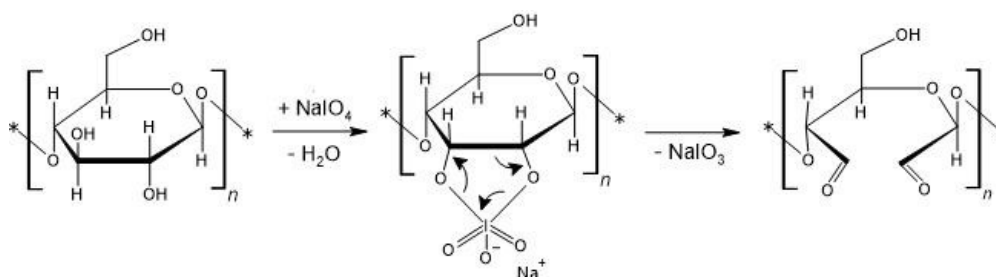


Obr. 12 - Strukturální vzorce vybraných polysacharidů [vytvořeno v ChemDraw]

2.2 Selektivní oxidace polysacharidů

Selektivní oxidace je regioselektivní reakce mezi hydroxylovými skupinami řetězce polysacharidu a oxidačním činidlem. V případě selektivně oxidovaných polysacharidů používaných pro naše účely vystupuje jako oxidační činidlo jodistan sodný (periodát). Obecně můžeme říci, že se jedná o reakci periodátu s dvojicí hydroxylových skupin sousedních uhlíků. Například u polysacharidů, jejichž jednotky jsou spojeny glykosidickými vazbami v pozici 1 a 4, periodát typicky reaguje s hydroxylovými skupinami na druhém a třetím uhlíku monomerního cyklu daného polysacharidu. [43]

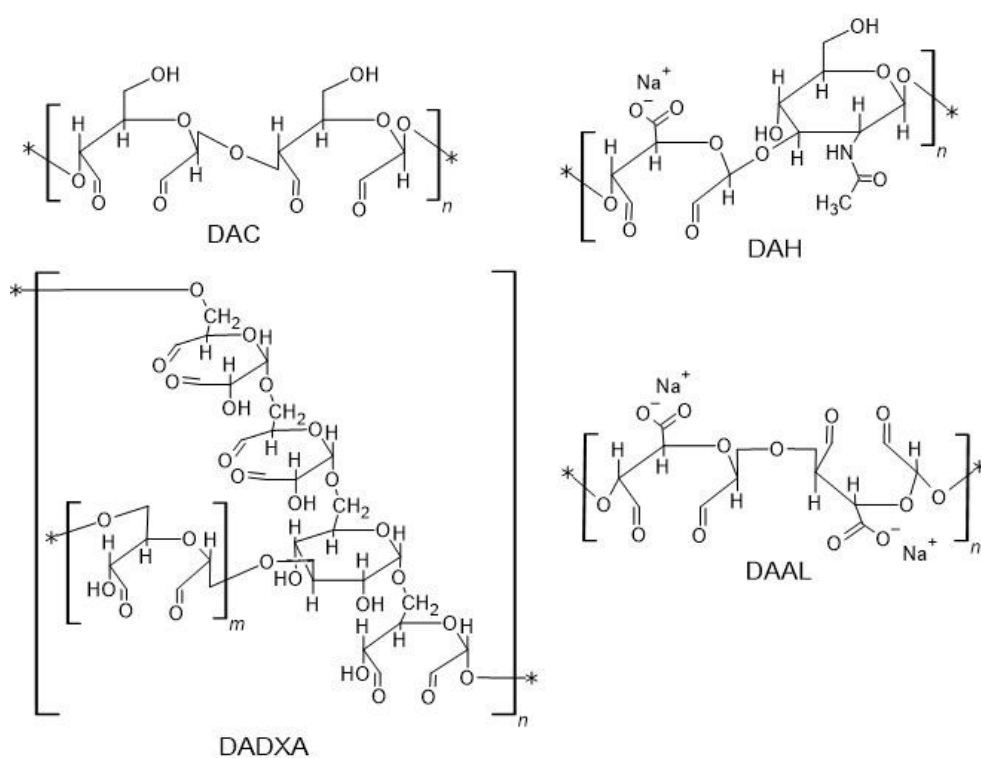
Výsledkem reakce je rozrušení vazby mezi druhým a třetím uhlíkem a vznik dialdehydu vybraného polysacharidu. Je důležité zmínit, že při oxidaci můžeme řídit stupeň oxidace dle množství oxidačního činidla a reakční doby. [43] Pro lepší pochopení tohoto děje slouží Obr. 13, na kterém je zobrazen obecný reakční mechanismus selektivní oxidace monomerní jednotky β -D-glukopyranózy z celulózy.



Obr. 13 - Obecný mechanismus selektivní oxidace monomerní jednotky pomocí periodátu NaIO_4 [vytvořeno v ChemDraw]

2.3 Selektivně oxidované polysacharidy

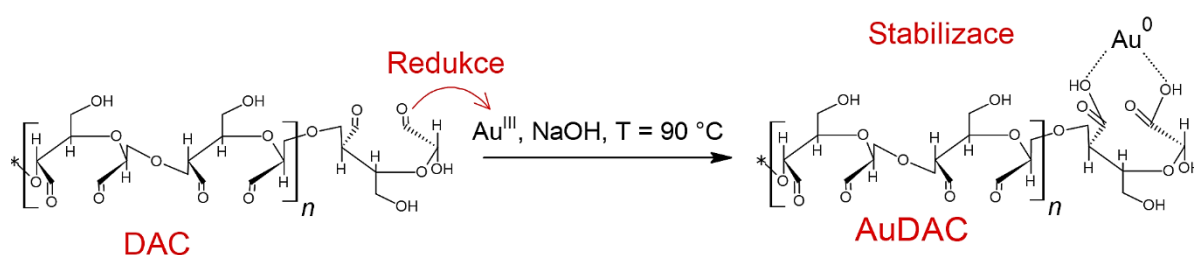
Pro naše účely ovšem nejsou podstatné neupravené polysacharidy, nýbrž právě selektivně oxidované polysacharidy, které obsahují ve svém řetězci aldehydicke skupiny. Dle náplně bakalářské práce jsme pracovali s dialdehydy celulózy (zkratka DAC), hyaluronátu sodného (zkratka DAH), dextranu (zkratka DADXA), a alginátu sodného (zkratka DAAL). Následující Obr. 14 pak zobrazuje struktury všech jmenovaných zástupců dialdehydů daných polysacharidů, které byly v rámci práce použity.



Obr. 14 - Struktury dialdehydickech derivátů daných polysacharidů (DAC – dialdehyd celulózy; DAH – dialdehyd hyaluronátu sodného; DADXA – dialdehyd dextranu; DAAL – dialdehyd alginátu sodného) [vytvořeno v ChemDraw]

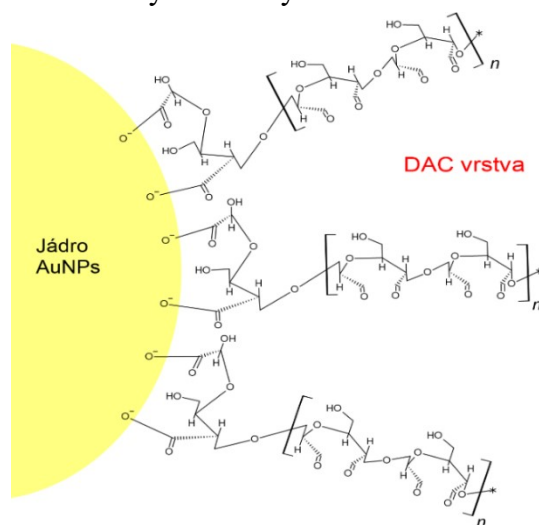
3 ZLATÉ NANOČÁSTICE PŘIPRAVENÉ POMOCÍ SELEKTIVNĚ OXIDOVANÝCH POLYSACHARIDŮ

Jak již bylo uvedeno výše, tak interakci mezi jádrem zlaté nanočástice a selektivně oxidovanými polysacharidy lze zařadit mezi interakce elektrostatické. Pro lepší porozumění vzniku této interakce je nutno pochopit mechanismus stabilizace zlatého jádra. Při syntéze zlatých nanočástic slouží jako redukční a stabilizační činidla selektivně oxidované polysacharidy (DAX). Mechanismus popisující syntézu zlatých nanočástic je zobrazen na následujícím Obr. 15.



Obr. 15 - Vzorový mechanismus syntézy zlatých nanočástic (AuDAC) pomocí dialdehydu celulózy (DAC) [vytvoreno v ChemDraw]

Stručný popis mechanismu této reakce nabízí následující text. Aldehydicke skupiny DAX po přidavku hydroxidu sodného redukují zlatité soli, přičemž jsou samy oxidovány za vzniku -COOH . Tyto skupiny následně stabilizují jádra zlatých nanočástic. [26] Ilustrační schéma, na kterém je vyobrazeno to, jakým způsobem pravděpodobně interaguje jádro zlaté nanočástice s modifikovaným polysacharidem ukazuje níže uvedený Obr. 16. Jako vzorový DAX byl použit dialdehyd celulózy.



Obr. 16 - Detail předpokládané struktury obalu nanočástic připravených pomocí DAC [vytvoreno v ChemDraw]

Komplikací při přípravě AuNPs je ovšem nadbytek daného DAX v reakční směsi, který může přinášet komplikace z hlediska dlouhodobého uchování AuNP. Zároveň s přihlédnutím k biomedicinským aplikacím, by volné řetězce DAX komplikovaly další modifikace, např. by bezúčelně reagovaly se specifickým peptidem. Této komplikaci lze zamezit důsledným odstraněním prekursoru pomocí různých purifikačních technik, a právě to je jedna z motivací této bakalářské práce.

4 POUŽITÉ METODY

Pro vyhodnocení, jakými parametry námi syntetizované nanočástice disponují, slouží několik technik. Pro určení velikosti nanočástic byly použity následující metody: dynamický rozptyl světla (dále jen DLS), UV-VIS spektroskopie (dále jen UV-VIS) a transmisní elektronové mikroskopie (dále pouze TEM).

Pomocí DLS a UV-VIS bylo taktéž sledováno množství daného selektivně oxidovaného polysacharidu v připravených roztocích zlatých nanočástic. Následně byl sledován úbytek obsahu zlata v roztoku, tj. ztráty nanočástic v průběhu purifikačního procesu. Pro tyto potřeby bylo využito rentgenové fluorescenční spektroskopie (zkratkou XRF). Metoda TEM nám taktéž dala detailnější pohled na tvar námi syntetizovaných nanočástic, který je taktéž atraktivním parametrem dle biomedicinských aplikací AuNPs.

4.1 DLS

Metoda DLS využívá koherentní záření, jenž je zaměřeno pod určitým úhlem na vzorek nanočástic suspendovaných v kapalině. Světlo procházející vzorkem se odrazí od částic a vzniklé rozptýlené světlo o dané vlnové délce vytvoří interferenční obraz. Detektor, na který odražené světlo dopadá, zaznamená intenzitu této interference a systém pak zpracuje získaná data jako časovou řadu. Pomocí tzv. autokorelační funkce je možné zjistit zastoupení jednotlivých frakcí částic o různé velikosti. Díky této funkci systém vyhodnotí index polydisperzity (zkratkou PDI z anglického polydispersity index), který nám poskytuje primární informaci o distribuci velikostí částic. Dle hodnoty indexu polydisperzity rozdělujeme soustavy na téměř monodisperzní (systém obsahující částice o téměř stejné velikosti) – $PDI > 0,05$ či naopak polydisperzní (obsahující různě velké částice) při $PDI > 0,7$. Přestože jsou předchozí hodnoty PDI určeny normou ISO, nelze tyto hodnoty považovat za ostře hraniční. [45, 46]

Při hodnocení velikosti částic získáme taktéž průměr hodnotu hydrodynamického průměru částic o nejvyšším procentuálním zastoupení v měřené látce. Tato hodnota je označována jako Z-Average (dále Z-Ave). Tento údaj je ovšem citlivý na nečistoty, a proto je důležité, aby byl roztok s měřenými částicemi separován od prachu a dalších nečistot.

Pro výpočet hydrodynamického průměru d_i , respektive poloměru částice r_i , slouží tzv. Einstein-Stokesova rovnice uvedena v následujícím vztahu (2), jejíž součástí je i difúzní koeficient D_i , jenž byl definován v podkapitole 1.3 Charakteristika nanočástic. [47]

$$D_i = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot r_i} \quad (2)$$

D_i – difúzní koeficient

k_B – Boltzmannova konstanta

T – teplota

η_0 – viskozita disperzního prostředí

r_i – hydrodynamický poloměr částice

Metodu DLS využívá pro měření přístroj Zetasizer, který též slouží ke stanovení zeta potenciálu, taktéž definovaného v podkapitole 1. 3.

4.2 UV-VIS

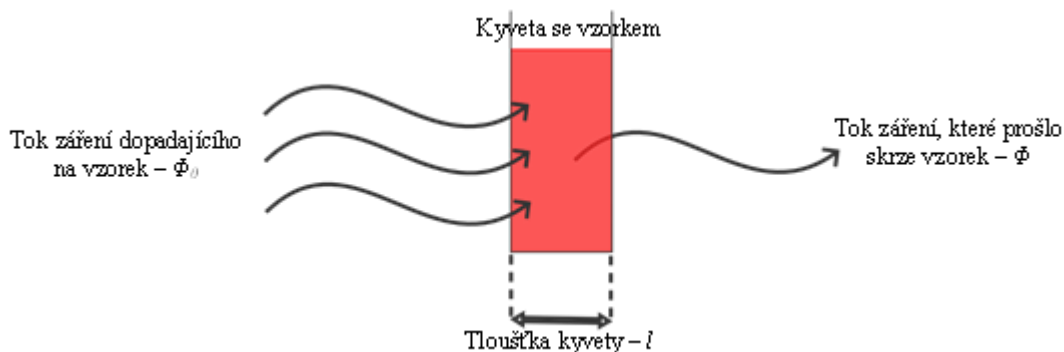
Metoda UV-VIS spektroskopie, jak již z názvu napovídá, využívá absorpce UV a viditelné oblasti elektromagnetického spektra látkou. Specifická vlnová délka této oblasti se pohybuje v rozsahu 200-800 nm. Při měření pomocí této metodiky postupujeme následovně: měřený vzorek, v našem případě koloidní roztok zlatých nanočástic, umístíme do křemenné kyvety. Pro ideální odezvu systému je nutné zabarvení měřeného vzorku. Toto je výhoda roztoků zlatých nanočástic vzhledem k jejich přirozenému zabarvení. [48]

Po změření referenční odezvy disperzního prostředí, ve kterém jsou měřené částice dispergovány, následuje přímé měření vzorku. Na vzorek tak dopadá dané záření, prochází křemennou kyvetou se vzorkem o dané tloušťce, kdy dochází k adsorpci a následné excitaci valenčních elektronů umístěných v molekulových orbitalech. [48]

Předešlý popis metody můžeme vyjádřit matematicky. Toto matematické vyjádření uvažuje poměr dopadajícího toku záření Φ_0 a toku záření prošlého měřeným vzorkem Φ . Výsledkem tohoto poměru je pak transmitance T vyjadřující množství prošlého záření. Tato veličina je buď bezrozměrná, či udávaná procentuálně. [48] Následující vztah (3) je formulací tohoto poměru:

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} [-] \quad (3)$$

Pro ilustraci předcházející vztahu slouží Obr. 17, na kterém je zobrazena kyveta se vzorkem a schematicky znázorněné záření dopadající na vzorek a záření procházející vzorkem.



Obr. 17 – Schéma principu UV-VIS spektroskopie [vytvořeno v Canva.com]

V praxi se většinou používá přepočítání transmitance na další veličinu – absorbanci A . Absorbanci lze popsat jako záporný dekadický logaritmus transmitance, což vyjadřuje vztah (4):

$$A = -\log T \quad (4)$$

Absorbanci, tedy množství světla absorbovaného vzorkem, můžeme taktéž počítat na základě Lambert-Beerova zákona, jež je základem pro UV-VIS spektroskopii. Zákon je popsán následující rovnicí ve vztahu (5):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (5)$$

ε – molární absorpční koeficient

c – látková koncentrace

l – tloušťka látky, jež prochází paprsek

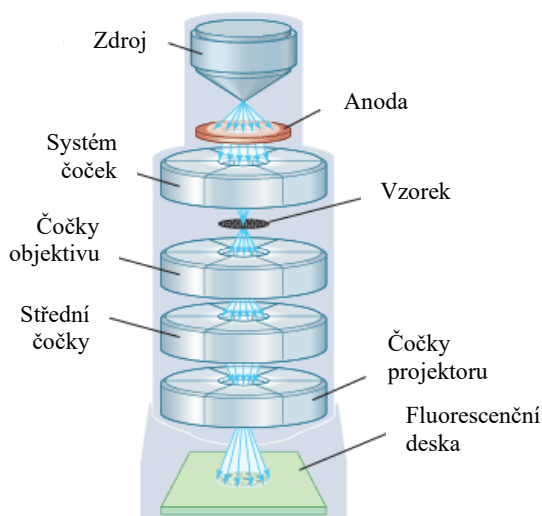
Výhodou této techniky je získání konkrétní vlnové délky absorbance, při které můžeme u nanočástic pozorovat již zmíněný SPR efekt. SPR efekt je zobrazen v grafu závislosti absorbance na vlnové délce světla, jakožto nárůst absorbance. Pomocí souřadnic maxima této absorbance, kdy souřadnice x popisuje konkrétní vlnovou délku a souřadnice y představuje hodnotu absorbance A , můžeme zjistit průměrnou velikost nanočástic v roztoku, případně koncentraci nanočástic v roztoku. [49]

4.3 XRF

Metoda XRF patří mezi metody jak kvalitativní, tak kvantitativní. Díky XRF můžeme sledovat nejenom zastoupení prvků v dané látce, ale i, z hlediska kvantitativního, množství daného prvku v látce. Princip této metody spočívá v ozařování daného vzorku pomocí vysokoenergetického rentgenového záření, přičemž toto záření působí na atomy daných prvků a vyráží elektrony z vnitřních orbitalů. Na základě tohoto jevu se pak ostatní elektrony z vyšších orbitalů snaží nahradit volné pozice vyražených elektronů za uvolnění energie. Velikost této uvolněné energie (sekundární fluorescence) je charakteristická pro každý prvek a díky tomu dokáže přístroj rozeznat, jaké prvky jsou obsaženy, případně jejich množství, ve vzorku. [50]

4.4 TEM

Transmisní elektronová mikroskopie nám pomáhá zobrazit částice o velikosti v řádu nanometrů. Základním prvkem TEM je zdroj, který vysílá primární elektrony do svazku obsahujícího elektrony s téměř obdobnou kinetickou energií přes anodu, která svazek urychluje. Tento svazek dále prostupuje systémem elektromagnetických čoček, který udržuje elektrony na dané trajektorii a zaostřuje ho tak, aby na vzorek dopadl s co nejmenším průměrem. Je důležité, aby zkoumaný vzorek byl v co nejmenší vrstvě, aby se elektrony nekumulovaly na vzorku, ale procházely jím. Aby se vytvořil výsledný obraz, poté co svazek elektronů prošel vzorkem, projde projekční čočkou a dopadá na detektor a fotoluminiscenční destičku. [51] Jednotlivé části transmisního elektronového mikroskopu znázorňuje níže uvedený Obr. 18.



Obr. 18 – Schéma transmisní elektronové mikroskopie (TEM) [52]

5 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo připravit roztoky zlatých nanočástic pomocí různých selektivně oxidovaných polysacharidů. Následně je charakterizovat (velikost, stabilita, tvar částic) pomocí metod dynamického rozptylu světla, UV-VIS spektroskopie a transmisní elektronové mikroskopie.

Další důležitý bod, jemuž se tato práce věnuje, je studium purifikace vzniklých roztoků, především od přebytku přidaného selektivně oxidovaného polysacharidu sloužícího k redukci a následné stabilizaci nanočástic. Pro tyto účely jsme zvolili tři metody čištění – ultrafiltraci za použití ultrafiltračních nástavců s membránou propouštějící molekuly do 1 000 kDa, 300 kDa a 100 kDa, dialýzu proti ultra čisté vodě a filtraci skrze polyethersulfonové (PES) filtry s velikostí pórů 0,22 μm . Veškeré body purifikace a jejich vliv byl sledován podle výše uvedených technik a taktéž pomocí metody rentgenové fluorescenční spektroskopie. Získaná data nám po vyhodnocení poskytla informace ohledně ztrát zlatých nanočástic u jednotlivých výše uvedených kroků čištění.

Na základě získaných dat a následného vyhodnocení byla vytvořena konkrétní metoda pro čištění zlatých nanočástic připravených pomocí selektivně oxidovaných polysacharidů, která by mohla tvořit úspěšný základ pro možné budoucí funkcionalizace připravených zlatých nanočástic pro biomedicinské aplikace.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části je popsána příprava koloidních roztoků zlatých nanočástic pomocí různých selektivně oxidovaných polysacharidů, jejich purifikace a následná charakterizace vzorků s pozorováním úspěšnosti purifikační metody. Experimentální část je doplněna o přípravu a charakterizaci vzorků určených k testování cytotoxicity pomocí testu MTT. Na těchto vzorcích byla taktéž sledována reprodukovatelnost a efektivita sestaveného postupu purifikace koloidních roztoků zlatých nanočástic připravených pomocí selektivně oxidovaných polysacharidů.

6.1 Použité chemikálie a materiály

V této práci byly použity pro syntézy zlatých nanočástic selektivně oxidované polysacharidy, konkrétně jejich dialdehydy DAX, kde X vyjadřuje různé polysacharidy. Dialdehydy celulózy s označením DAC_A, DAC_B a DAC_C byly již připraveny předem, obdobně jako dialdehydy hyaluronátu s označením DAH_A, alginátu s označením DAAL_A a dextranu s označením DADXA_A. Pro potřeby bakalářské práce byl připraven čerstvý dialdehyd hyaluronátu s označením DAH_B. Pro jeho přípravu byl použit hyaluronát sodný ($M_w = 1.5 \text{ MDa}$, 1 250-1 500 kDa, IPD = 4.3; Contipro Ltd., Česká republika) a následně jodistan sodný (NaIO_4 ; VWR, Česká republika). Pro přečištění nového materiálu byla použita dialyzační membrána 14 kDa (MWCO) a stříkačkový filtr PVDF 0,45 μm .

Následně byl použit pro úpravu pH vybraných DAX hydroxid sodný (NaOH ; Lachner; Česká republika) a jako prekurzor syntézy zlatých nanočástic trihydrát kyseliny tetrachlorozlatité ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich Co.). Pro následnou dialýzu v kyselém prostředí byla zvolena dialyzační membrána 50 kDa (MWCO) za použití demineralizované vody (DEMI vody; vodivost pod hodnotu 0,1 $\mu\text{S/cm}$). Pro purifikaci roztoků byly využity ultrafiltrační nástavce Vivaspin® 20 (100, 300 a 1 000 kDa) s polyethersolfonovou (PES) membránou, dialyzační membrány 50 kDa (MWCO- molecular weight cut-off) a stříkačkové filtry PES 0,22 μm .

Pro MTT testování přečištěných roztoků zlatých nanočástic byly připraveny kultury buněk myších fibroblastů NIH/3T3. Pro jejich přípravu a další kroky testování bylo připraveno médium s použitím DMEM, hydrogenuhličitanu sodného NaHCO_3 , ultračisté vody (ultrapure water – UPW), injekčního filtru PES 0,22 μm s následným přidáním sterilního telecího séra a penicilinu. Toto médium bylo používáno v průběhu jednotlivých kroků obdobně jako solný roztok fosfátem pufrovaný PBS a Trypsin.

Při samotném stanovení byl použit roztok MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difeny l-tetra-zolium bromid) a jako rozpouštědlo DMSO (dimethyl sulfoxid). U veškerých použitých chemikálií byla zaručena analytická čistota (p.a.) a byly používány bez další purifikace.

6.2 Použité přístroje

Pro studium hodnoty SPR částic a efektivity purifikace částic od přebytku DAX byl použit dvoupaprskový UV-VIS spektrometr Lambda 1050 (PerkinElmer; USA) s měřeným rozsahem vlnové délky $\lambda = 200\text{-}800\text{ nm}$. Pro stanovení hydrodynamického poloměru nanočástic a zeta potenciálu byl využíván přístroj Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments; UK). Měření probíhalo při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, za použití kyvet DTS0012 pro stanovení velikosti částic a kapilárních kyvet DTS1070 při měření zeta potenciálu. Jako model pro vyhodnocení měření byl zvolen Smoluchowski model.

K hodnocení ztrát v průběhu čištění připravených vzorků AuDAX byl využíván energeticky-disperzní rentgenový fluorescenční spektrometr – ARL Quant X EDXRF Analyzer (Thermo Fisher Scientific; USA). Mikroskopické snímky hodnotící velikost a agregaci nanočástic byly pořízeny pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEM-2100 (JEOL, Japonsko) s použitím urychlovacího napětí 160 keV a měděné mřížky 300 mesh potažené membránou Formvar za jemného vysušení.

Pro měření absorbance potřebné k vyhodnocení testu MTT byl používán přístroj the Infinite M200 Pro NanoQuant (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 570 nm.

6.3 Příprava materiálu DAH_B

Pro syntézu dialdehydu hyaluronátu s označením B (DAH_B) je stěžejní molární poměr mezi jodistanem sodným NaIO_4 a hyaluronátem sodným, jež byl stanoven již v předešlých studiích na 1,25:1,0.

Nejprve bylo naváženo 1,002 g hyaluronátu sodného, jež byl rozpuštěn v 50 ml UPW a byl míchán v zatmavené 100ml reakční lahvi po dobu 24 h při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozpouštění hyaluronátu sodného byl za stálého míchání přikapáván roztok jodistanu sodného NaIO_4 , jež byl připraven navážením 0,666 g NaIO_4 a doplněn UPW na celkový objem roztoku 10 ml a reakce běžela 24 h. Po zreagování byl vzniklý roztok převeden do 14 kDa dialyzační membrány a 48 h dialyzován proti vodě. Poté byl roztok zfiltrován přes PVDF $0,45\text{ }\mu\text{m}$ stříkačkový filtr, přečištěný DAH_B rychle zmrazen při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lyofilizován.

6.4 Příprava koloidních roztoků zlatých nanočástic

Prvním krokem při přípravě roztoků zlatých nanočástic bylo rozpuštění daného selektivně oxidovaného polysacharidu (DAX). Navážka daného polysacharidu pro standartní přípravu byla 60 mg na 9,4 ml ultra-čisté vody UPW. Následně se roztok DAX v UPW nechal zhruba 18-20 hodin rozpouštět při 40 °C a třepání o rychlosti 150 otáček/min. Následující den byl roztok ochlazen ve vodní lázni a posléze bylo pH roztoku upraveno na ~7. Po ustanovení hodnoty pH byl daný roztok ponořen po dobu 15 minut do olejové lázně při 90 °C a za stálého třepání 100x min.

Po inkubaci bylo k roztoku přidáno 100 µl trihydrátu kyseliny tetrachlorozlatité $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, jakožto prekursoru zlatých nanočástic. Vzniklá směs reagovala po dobu 30 sekund a následně bylo přidáno 0,5 ml 0,1M NaOH a roztok byl vortexován. Po přidavku NaOH došlo prakticky okamžitě ke vzniku nanočástic spojenému s barevnou změnou roztoku ze žluté barvy na rudou až fialovou. Přídavek 0,1M NaOH byl u jednoho vzorku vynechán, konkrétně u vzorku s označením AuDAH_B₂, a to vzhledem k tvorbě nanočástic ihned po přidavku prekursoru. Takto připravené vzorky byly ochlazeny ve vodní lázni. Po ochlazení vzorků následovala dialýza v kyselém prostředí při hodnotě pH 3,5 za použití dialyzační membrány propouštějící molekuly do 50 kDa po dobu 2 hodin. Veškeré konkrétní navážky a parametry syntézy jsou shrnuty v Tab. 4.

Tab. 4 – Srovnání parametrů přípravy vzorků zlatých nanočástic (AuDAX)

Kód selektivně oxidovaného polysacharidu (DAX)	Kód vzorku	Navážka DAX $m_{DAX} [mg]$	Nastavené pH roztoku DAX [-]
DAC_A	AuDAC_A ₁	121,1	7,01
	AuDAC_A ₂		
DAC_B	AuDAC_B ₁	60,0	7,00
DAH_A	AuDAH_A ₁	60,0	6,98
DAAL_A	AuDAAL_A ₁	60,0	6,99
	AuDAAL_A ₂	52,9	6,95
DADXA_A	AuDADXA_A ₁	60,0	6,99
	AuDADXA_A ₂	60,3	6,88
DAH_B	AuDAH_B ₁	60,2	6,87
	AuDAH_B ₂	60,2	7,02
DAC_C	AuDAC_C ₁	60,3	6,98

Legenda: písmena A, B, C označují použitý materiál; dolní indexy 1, 2 označují pořadí série

Příprava prvních dvou vzorků s označením AuDAC_A₁ a A₂ byla upravena. Navážka DAC_A a použitý objem UPW byli dvojnásobné a po úpravě pH na hodnotu 7 byl roztok rozdělen na dva díly o stejném objemu určené k následné syntéze. U obou vzorků byl dodržen stejný poměr všech přidaných chemikálií.

Následujícím krokem po syntéze a dialýze v kyselém prostředí byla purifikace připravených nanočástic. V rámci tohoto kroku byly provedeny jednotlivé kroky a sledován jejich vliv, přičemž byl optimalizován proces čištění. Optimalizovaná purifikace AuDAX pak zahrnovala: centrifugaci pomocí ultrafiltračních nástavců (100, 300 a 1 000 kDa) při 4400 ot. po dobu 5 minut, dialýzu proti UPW s použitím dialyzační membrány 50 kDa a filtraci skrze PES injekční filtry (0,22 μm). Veškeré sledované vlivy jednotlivých purifikačních kroků jsou zahrnuty v následující kapitole „Výsledky a diskuse“.

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Série AuDAC_A

Jak již bylo zmíněno, tak příprava série vzorků AuDAC_A vycházela z rozdělení roztoku rozpuštěného dialdehydu celulózy ve dvojnásobném množství oproti standardní přípravě. Tyto vzorky byly syntetizovány jako první za účelem charakterizace vlivu jednotlivých purifikačních metod na roztoky zlatých nanočástic.

7.1.1 AuDAC_A₁

Jako první byl sledován vliv dialýzy, jakožto jedné z vybraných purifikačních metod. Byl kladen důraz na zředění roztoků AuNPs během dialýzy, stanovení optimální doby dialýzy vzhledem ke ztrátě intenzity signálů AuNPs a současně vyčištění od vedlejších produktů a přebytku DAC_A. Pro tyto potřeby byl syntetizovaný vzorek AuDAC_A₁ dialyzován proti UPW, vzorky byly odebírány po uplynutí 24, 48, 72, 144 a 168 hodin a odběry charakterizovány pomocí DLS, UV-VIS, XRF a TEM. Veškerá získaná data a jejich vyhodnocení následují níže.

a) Studium velikosti částic

Metodu DLS jsme měřili dva parametry částic, a to konkrétně jejich hydrodynamický průměr a index polydisperzity, který podává informaci o distribuci nanočástic v roztoku. Z výsledných dat byla sestrojena Tab. 5, která obsahuje průměrnou hodnotu hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity nanočástic vzorku AuDAC_A₁ čerstvě syntetizovaného ve srovnání s hodnotami jednotlivých odběrů v průběhu dialýzy. Výsledná data taktéž reflektují vliv použití stříkačkových filtrů PES 0,22 μm .

Tab. 5 – Průměrné hodnoty naměřených dat pro vzorek AuDAC_A₁ nečištěný a dialyzovaný po dobu 24, 48, 72, 144 a 168 hodin

Použití PES filtru 0,22 μm	Doba trvání dialýzy t [h]	Hydrodynamický průměr d [nm]	Procentuální odchylka hydrodynamického průměru σ_p [%]	Index polydisperzity PDI [-]
NE	0 (nečištěný)	34	$\pm 8,80$	0,565
ANO	0 (nečištěný)	25	$\pm 1,20$	0,318
ANO	24	27	$\pm 0,74$	0,278
ANO	48	26	$\pm 0,38$	0,258
ANO	72	25	$\pm 0,40$	0,274
ANO	144	25	$\pm 1,20$	0,225
ANO	168	116	$\pm 25,83$	0,291

Z naměřených dat můžeme říci, že již stříkačkový filtr PES 0,22 μm pomohl k lepší distribuci AuNPs v roztoku, resp. zachytil frakci částic o větších rozměrech. To vyplývá z hydrodynamického průměru částic a indexu polydisperzity u nečištěného vzorku, jejichž hodnoty byly znatelně vyšší nežli hodnoty vzorku filtrovaného skrze injekční filtr. Přestože byl prokazatelně potvrzen vliv PES filtru na purifikaci AuNPs, stále nebyla hodnota PDI nižší než 0,3. Pro přehlednost byly hodnoty PDI vyšší než 0,3 zvýrazněny v tabulce oranžově. Hodnota PDI 0,3 byla vybrána vzhledem k nízkodisperzní povaze koloidních roztoků pod touto hodnotou. Díky tomu, že PDI neklesl pod zvolenou hodnotu, bylo zřejmé, že se zde nachází různé frakce částic. Je důležité si uvědomit, že se nemusí jednat pouze o zlaté nanočástice, protože také zbytkový DAC tvoří makromolekulární klubka. Proto byla zvolena jako další krok purifikace dialýza a ultrafiltrace. Ještě před tím bylo ovšem nutné stanovit optimální dobu dialýzy.

Téměř u všech odběrů dialyzovaného vzorku, vyjma odběru po 168 h dialýzy, můžeme sledovat pokles jak hydrodynamického průměru, což značí vyčištění od makromolekulárních látek (DAC_A), tak hodnoty PDI pod 0,3. Distribuce velikosti částic ve vzorku byla paucidisperzní a nacházely se v ní především částice o hydrodynamického průměru 25-27 nm. Tato velikost odpovídá částicím AuNP, protože klubka DAC_A byla výrazně větší, jak je vidět z následující Tab. 6, zobrazující jejich průměrné hodnoty hydrodynamického průměru.

Tab. 6 – Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity vzorových DAX

Daný DAX	Hydrodynamický průměr d [nm]	Procentuální odchylka hydrodynamického průměru σ_o [%]	Index polydisperzity PDI [-]
DAC	242	$\pm 3,31$	0,361
DAAL	171	$\pm 2,92$	0,484
DADXA	239	$\pm 12,55$	0,878
DAH	115	$\pm 26,09$	0,921

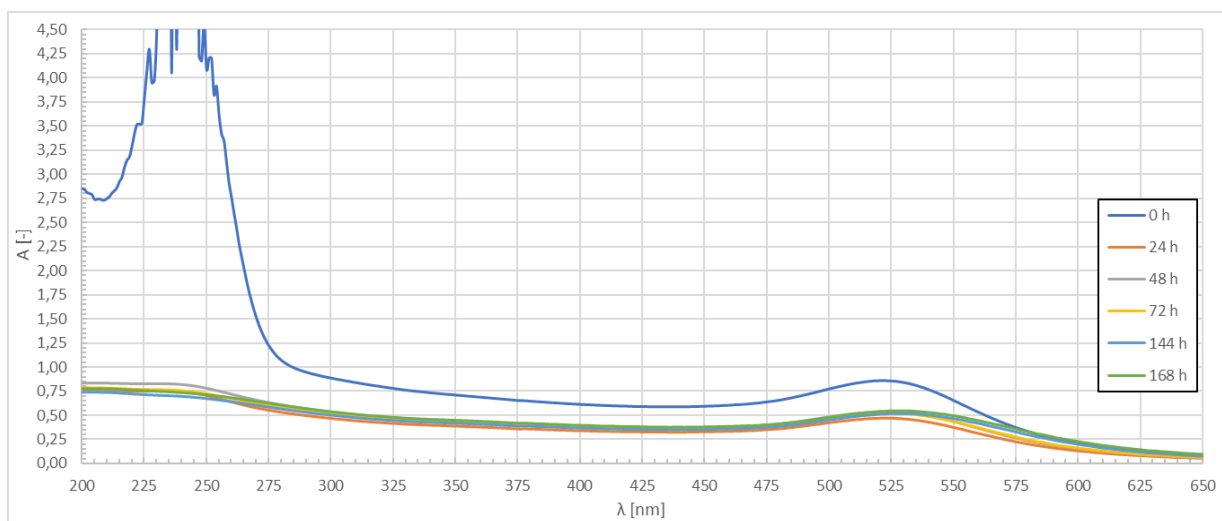
Z Tab. 6 můžeme konstatovat, že průměrná velikost DAX se pohybuje ve stovkách nanometrů a jejich roztoky jsou takřka polydisperzní, a to hlavně u DADXA a DAH. Vzhledem k tomu, že průměrná velikost částic roztoku AuDAC_A1 se pohybovala v desítkách nanometrů a PDI se znatelně snížil v porovnání se samotnými polysacharidy, dochází primárně k odstranění DAX. Pouze v jednom případě, a to při 168hodinové dialýze, hydrodynamický průměr i hodnota PDI výrazně vzrostla oproti ostatním odběrům.

Hodnoty se zvýšily zřejmě vzhledem k odštěpení DAC za stabilizační vrstvy nanočástic vlivem dialýzy, což vedlo k narušení obalu a shlukování nanočástic. Právě proto byla velikost

částic v měřeném roztoku několikanásobně vyšší a hodnota indexu polydisperzity se zvýšila oproti referenčním hodnotám měření nepřečištěného, čerstvého vzorku AuDAC_A₁. Tato skutečnost byla následně podpořena snímky z TEM, které následují v bodě d). Dle hydrodynamického průměru a PDI byla následně pro čištění jako nejvhodnější vybrána 48h dialýza.

b) UV-VIS analýza

Pro sledování vlivu čištění na koncentraci a vlastnosti AuNPs v průběhu dialýzy byla dále použita UV-VIS spektroskopie. Díky naměřeným spektrům jsme pak mohli pozorovat změny intenzity absorpce DAX (kolem 250 nm) a případně posun vlnové délky a změnu intenzity absorpčního maxima (hodnoty SPR) AuNPs. Na následujícím Obr. 19 je znázorněn průběh absorpčních křivek jednotlivých odběrů a nečištěného vzorku.

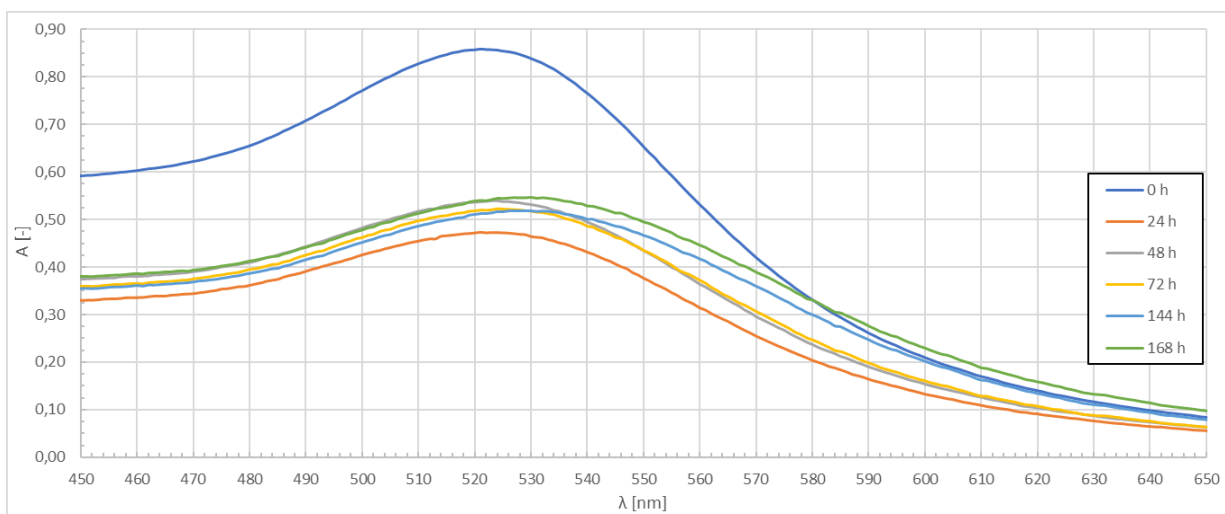


Obr. 19 - Srovnání vlivu dialýzy na proces čištění AuDAC_A₁ (plný průběh)

U modré křivky nečištěného vzorku s označením AuDAC_A₁ (0h) je vlnová délka maxima SPR absorpce AuNPs v oblasti kolem 525 nm, ale také je vidět intenzivní absorpce DAC_A v oblasti 225-250 nm. Jak je vidět z Obr. 19, již po 24 h lze sledovat významný pokles v této oblasti, což značí úspěšné vyčištění od přebytku DAC_A. Pokles můžeme pozorovat taktéž v oblasti specifické pro AuNPs, což znamená pokles koncentrace AuNPs v roztoku, tedy naředění roztoků v průběhu dialýzy, během které dochází ke zvýšení objemu. Pro lepší přehlednost byla vytvořena Tab. 7, kde jsou zobrazeny maximální hodnoty SPR absorpce pro nepřečištěný vzorek a jednotlivé odběry vzorku dialyzovaného a taktéž Obr. 20, kde je detail oblasti specifické pro AuNPs.

Tab. 7 – Přehled hodnot maxim absorpance A_{MAX} a jejich specifických vlnových délek λ_{MAX} v závislosti na době dialýzy pro purifikaci vzorku AuDAC_A1

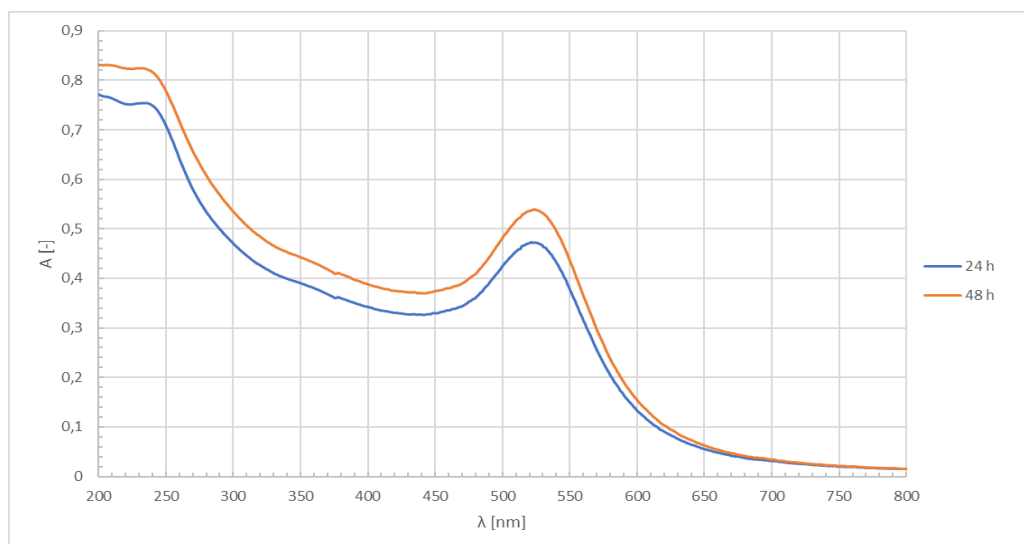
Doba dialýzy t_{DIA} [h]	Vlnová délka specifická pro maximum absorpance λ_{MAX} [nm]	Hodnota maxima absorpance A_{MAX} [-]
0	521	0,858
24	521	0,473
48	522	0,538
72	521	0,519
144	529	0,518
168	530	0,547



Obr. 20 - Srovnání vlivu dialýzy na proces čištění AuDAC_A1 (detail oblasti specifické pro AuNPs)

Jak je znatelné z Obr. 20 a taktéž Tab. 7, pak nejmenší pokles absorpance, tedy koncentrace AuDAC_A1, vzhledem k době trvání dialýzy byl zaznamenán u odběru po 48h dialýze, rozdíly jsou ovšem malé. Z Tab. 7 taktéž můžeme pozorovat jisté změny ve vlnové délce specifické pro maximum SPR absorpance daných roztoků. Při odběrech po 144 a 168 h byl sledován posun k delším vlnovým délkám. To naznačuje možnou změnu v morfologii částic, konkrétně jejich velikosti či složení stabilizační vrstvy a související agregace z důvodu narušení stabilizační vrstvy DAC_A.

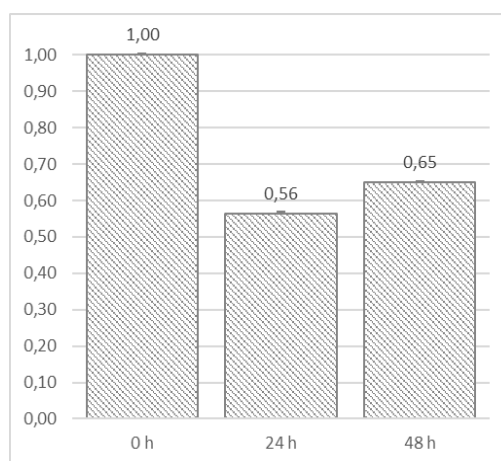
Výsledky získané po 48 hodinách dialýzy proti UPW lze opět jednoznačně předpokládat za optimální vzhledem k době trvání dialýzy ale taktéž k naředění roztoku nanočástic a jejich stability, viz Obr. 21 na další straně, který srovnává absorpční spektra vzorku dialyzovaného po dobu 24 a 48 hodin. Pro studium ředění těchto vybraných roztoků během dialýzy byla následně použita také metoda XRF.



Obr. 21 - Srovnání naměřených absorpčních spekter pro odběr po 24 a 48 hodinách dialýzy

c) XRF analýza

Metoda XRF umožňuje kvantitativní stanovení množství nanočástic a tím další pohled na vliv dialýzy na ředění vzorku AuDAC_A1 v jejím průběhu. Vzhledem k tomu, že dialýza po dobu 48 hodin byla vybrána za nejvhodnější, pak Obr. 22 níže představuje srovnání s nepřečištěným vzorkem a 24 h odběrem, jelikož dialýza trvajících 24 h byla vzhledem k výsledkům UV-VIS spektroskopie stanovena jako dolní mez pro trvání dialýzy s ohledem na odstranění polysacharidů v procesu purifikace.



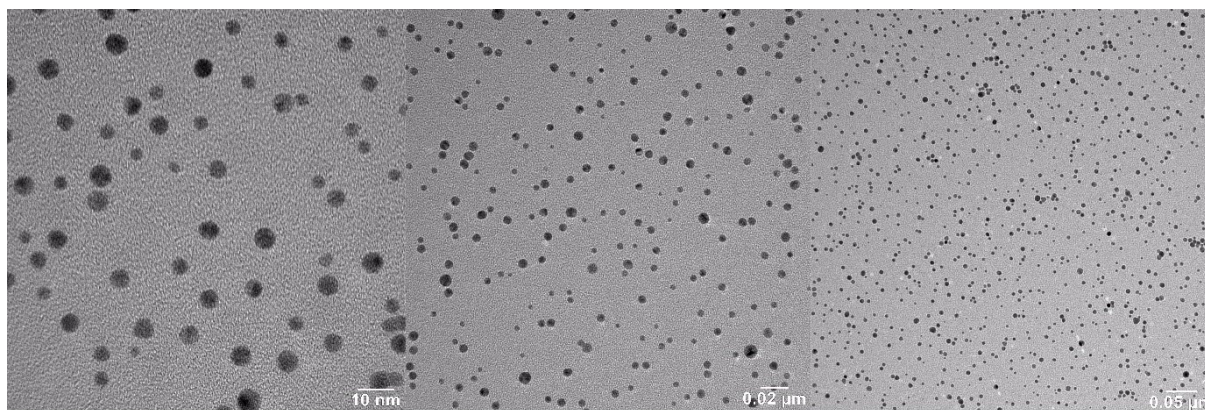
Obr. 22 – Graf naředění vzorku AuDAC_A1 v průběhu dialýzy po dobu 24 a 48 h

Při dialýze můžeme sledovat pokles koncentrace zlatých nanočástic AuDAC v roztoku, avšak ani v jednom z případů pokles koncentrace nebyl nižší než 50 % oproti referenčnímu nepřečištěnému vzorku. U vybrané 48h dialýzy dosahovala koncentrace nanočástic 65 % nečištěného vzorku. Tento pokles nepředstavoval ztráty jako takové, protože samotné nanočástice přes dialyzační membránu neprocházejí.

Pravděpodobně jde o pouhé snížení koncentrace způsobené naředěním roztoku zlatých nanočástic v průběhu dialýzy, jak již bylo výše zmíněno. To znamená, že jsme pomocí dialýzy úspěšně separovali z roztoku prekurzor a přebytečný nezreagovaný DAX pouze s minimálními ztrátami, ale za cenu jistého naředění vzorků.

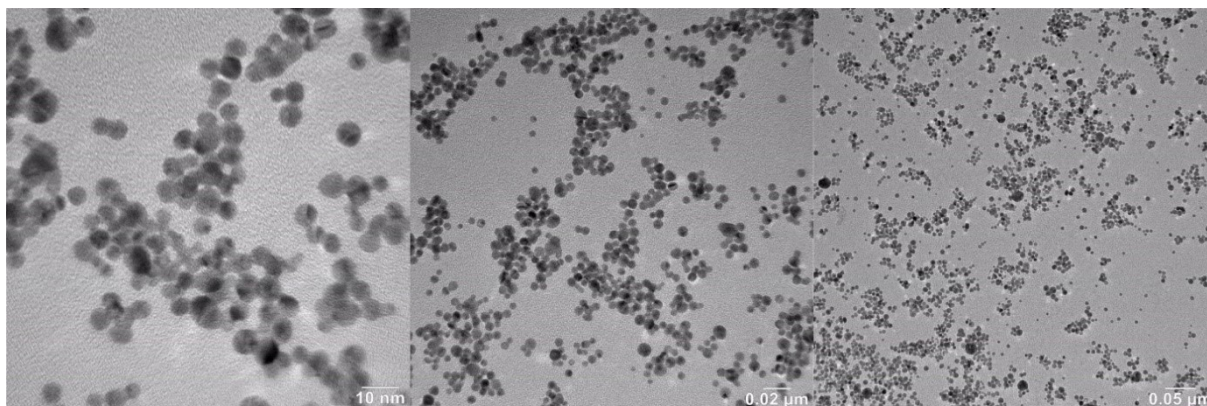
d) Reprezentativní snímky TEM

Pro vizualizaci připraveného a následně purifikovaného vzorku s kódem AuDAC_A₁ byla použita transmisní elektronová mikroskopie. Díky těmto snímkům pak můžeme potvrdit hypotézy stanovené z předešlých měření. Pro ilustraci byl vybrán snímek nepřečištěného, čerstvého vzorku AuDAC_A₁ zobrazeného na Obr. 23, kdy velikost AuDAC_A₁ byla nižší než 10 nm.



Obr. 23 – Snímky z TEM nepurifikovaného, čerstvého vzorku AuDAC_A₁

Oproti tomu na snímcích vzorku dialyzovaného 168 hodin (Obr. 24) můžeme opravdu sledovat již zmiňované shlukování AuDAC_A₁, jak již bylo předpokládáno na základě dat v bodě a) získaných metodou DLS.



Obr. 24 – Vzorek s označením AuDAC_A₁ dialyzovaný po dobu 168 hodin

7.1.2 AuDAC_A₂

Tento vzorek byl syntetizován za účelem sledování vlivu ultrafiltrace, jakožto druhé zvolené purifikační metody. Vzorek AuDAC_A₂ byl ultrafiltrován pomocí ultrafiltračních nástavců (1 000, 300 a 100 kDa) a byl sledován vliv na ztráty nanočástic. Dále byly ultrafiltrované podíly charakterizovány pomocí metody DLS, UV-VIS, XRF a následně byly pořízeny snímky ultrafiltrovaných podílů vzorku pomocí TEM. Veškerá získaná data z měření a jejich vyhodnocení následují níže.

a) Studium velikosti částic

Metodu DLS byl opět studován hydrodynamický průměr a taktéž jejich index polydisperzity. Tab. 8 obsahuje průměrnou hodnotu hydrodynamického průměru nanočástic vzorku AuDAC_A₂ ihned po syntéze ve srovnání s hodnotami jednotlivých odběrů po ultrafiltraci vzorků a hodnoty indexu polydisperzity čerstvého vzorku a jednotlivých odběrů pro srovnání změny v distribuci částic v průběhu čištění. Výsledná data opět reflektovala vliv použití stříkačkových filtrů PES 0,22 μm jako u předešlého vzorku AuDAC_A₁.

Tab. 8 – Průměrné hodnoty naměřených dat pro vzorek AuDAC_A₂ nečištěný a ultrafiltrováný pomocí ultrafiltračních nástavců 1 000, 300 a 100 kDa

Použití PES filtru 0,22 μm	Použití ultrafiltračního nástavce a jeho specifikace	Hydrodynamický průměr d [nm]	Procentuální odchylka hydrodynamického průměru σ_o [%]	Index polydisperzity PDI [-]
NE	NE	45	$\pm 6,65$	0,624
ANO	NE	37	$\pm 4,37$	0,463
ANO	ANO (1 000 kDa)	155	$\pm 3,23$	0,246
ANO	ANO (300 kDa)	17	$\pm 0,36$	0,250
ANO	ANO (100 kDa)	557	$\pm 71,81$	0,987

Z naměřených dat můžeme opět sledovat pozitivní vliv filtrace na purifikaci vzorku AuDAC_A₂. Na filtru byly zachyceny vysokomolekulární látky a frakce nanočástic větších rozměrů, což se projevilo snížením průměrného hydrodynamického průměru částic a poklesem hodnoty PDI.

Dále byly sledovány změny hydrodynamického průměru částic a PDI po ultrafiltraci oproti vzorku neultrafiltrovanému. Již při použití 1 000 kDa nástavce byl sledován pokles PDI, avšak zvýšil se průměrný hydrodynamický průměr částic. To bylo pravděpodobně způsobeno vzhledem k průchodu přebytku DAC_A skrze nástavec k ultrafiltrovanému podílu. V důsledku průchodu DAC_A pak mohla vznikat polymerní klubka, jejichž velikost byla zaznamenána systémem DLS.

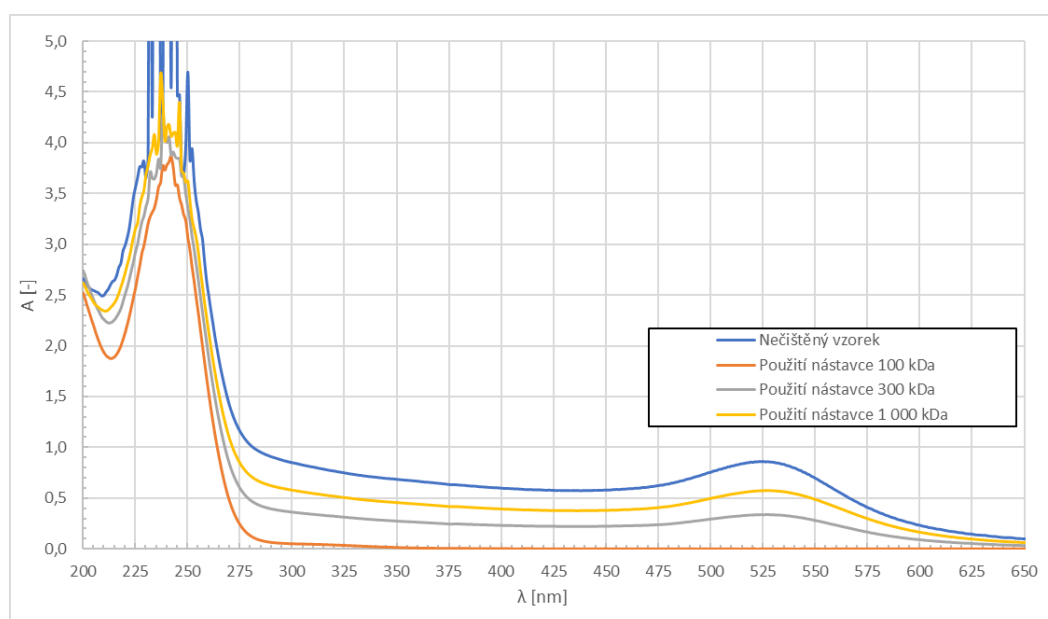
Následně byl vzorek AuDAC_A₂ ultrafiltrován pomocí 300 kDa nástavce. Zde byl výsledek velmi pozitivní, jelikož přebytek prekursoru DAC_A byl zachycen v horní části nástavce a nejmenší frakce nanočástic prošly do spodní části nástavce. To bylo potvrzeno poklesem hydrodynamického průměru z hodnoty 45 nm na hodnotu 17 nm a poklesu PDI z hodnoty 0,624 na hodnotu 0,250.

Jako poslední byl použit 100 kDa nástavec. Zde byl veškerý vzorek AuDAC_A₂ zakoncentrován v horní části nástavce a ultrafiltrační membránou prošel zřejmě zbytek DAC_A (bezbarvý roztok). To vedlo k nárůstu hydrodynamického průměru částic na 557 nm oproti referenčnímu neultrafiltrovanému vzorku, jehož velikost částic byla stanovena na 45 nm, a k prudkému nárůstu hodnoty PDI, která označuje vysokou polydisperzitu systému.

Vzhledem k předcházejícím výsledkům byla jako nejlepší vybrána ultrafiltrace pomocí 300 kDa nástavce. Následovala UV-VIS analýza vzorků, přičemž byly sledovány změny v hodnotě SPR a úspěšnost purifikace od zbytku DAC_A (úbytek absorpce v UV oblasti).

b) UV-VIS analýza

UV-VIS analýza sloužila ke kontrole změn absorpčního maxima (hodnoty SPR) a spolehlivosti ultrafiltrace v purifikačním procesu. První byla monitorována změna v oblasti signálu specifického pro DAC_A. Následující Obr. 25 reflektuje tuto změnu v dané oblasti.

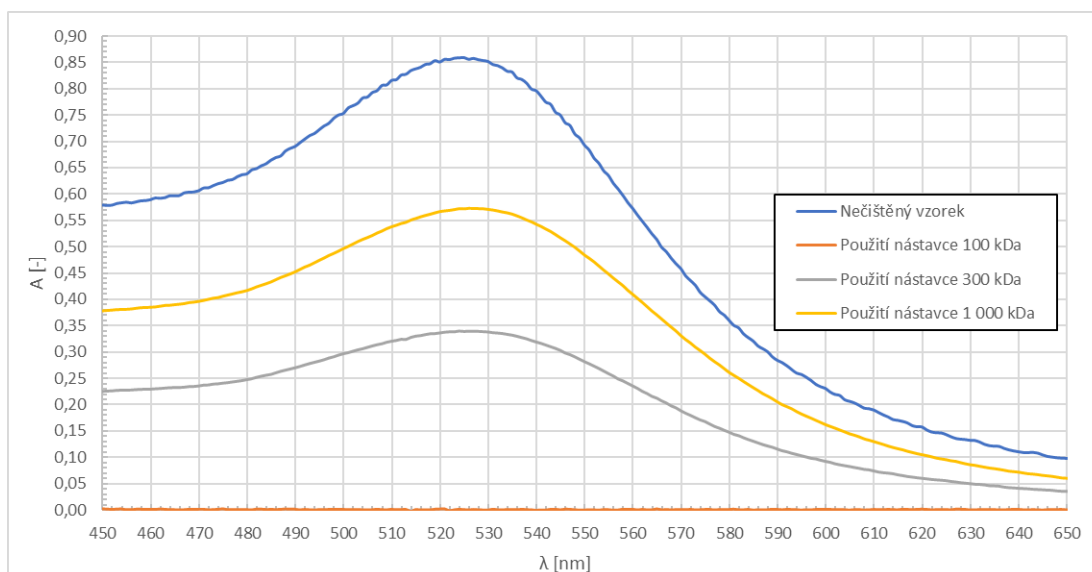


Obr. 25 - Srovnání vlivu ultrafiltrace na proces čištění AuDAC_A₂ (plný průběh)

Z naměřených spekter můžeme sledovat znatelný pokles signálu v oblasti specifické pro DAC_A ($\lambda = 225\text{-}250\text{ nm}$). To znamená příznivý vliv ultrafiltrace na purifikaci od zbytkových klubek DAC_A a vedlejších produktů vzniklých během syntézy. Obdobně jako u předchozí kapitoly současně klesá koncentrace částic, tedy klesá hodnota absorpčního maxima AuDAC_A2. Tento pokles demonstruje Tab. 9. a Obr. 26 níže, jenž je detailem oblasti specifické pro nanočástice vzorku AuDAC_A2.

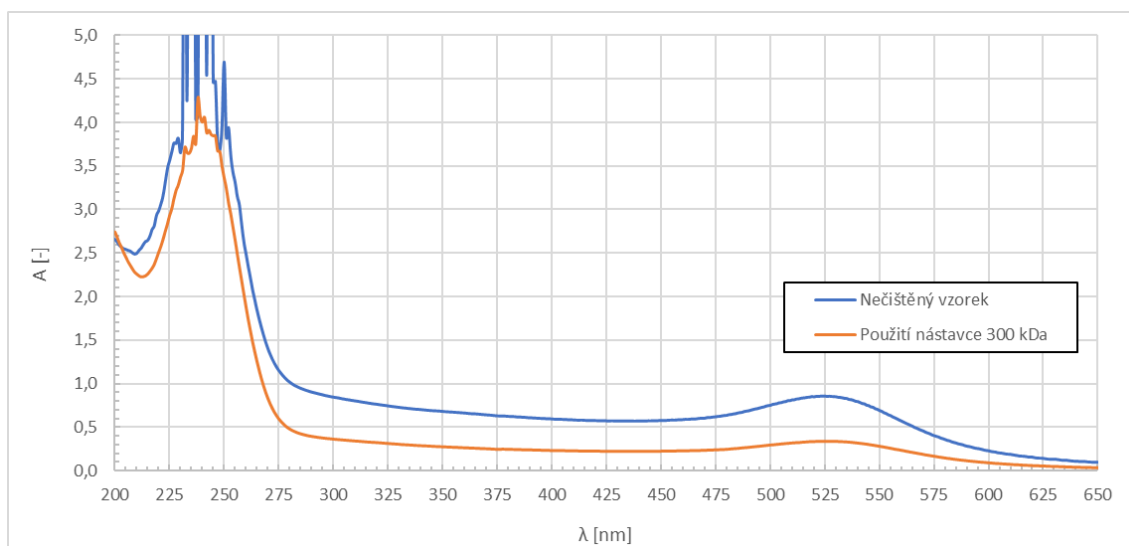
Tab. 9 - Přehled hodnot maxim absorbance A_{MAX} a jejich specifických vlnových délek λ_{MAX} v závislosti na době dialýzy pro purifikaci vzorku AuDAC_A1

Použití ultrafiltračního nástavce a jeho specifikace	Vlnová délka specifická pro maximum absorbance $\lambda_{MAX} [nm]$	Hodnota maxima absorbance $A_{MAX} [-]$
NE	525	0,860
ANO (1 000 kDa)	526	0,573
ANO (300 kDa)	527	0,339
ANO (100 kDa)	521	nelze určit



Obr. 26 - Srovnání vlivu ultrafiltrace na proces čištění AuDAC_A2 (detail oblasti specifické pro AuNPs)

Oproti dialýze ovšem pokles koncentrace nanočástic ve vzorku AuDAC_A2 nepředstavuje ředění vzorku, ovšem ztráty nanočástic na filtrech v procesu ultrafiltrace. Krajním případem ztrát v procesu ultrafiltrace bylo použití 100 kDa nástavce. Jako optimální, z hlediska ztrát nanočástic a současně vyčištění od DAC_A, byla vybrána ultrafiltrace skrze 300 kDa nástavec, což je podpořeno srovnáním spekter na Obr. 27.

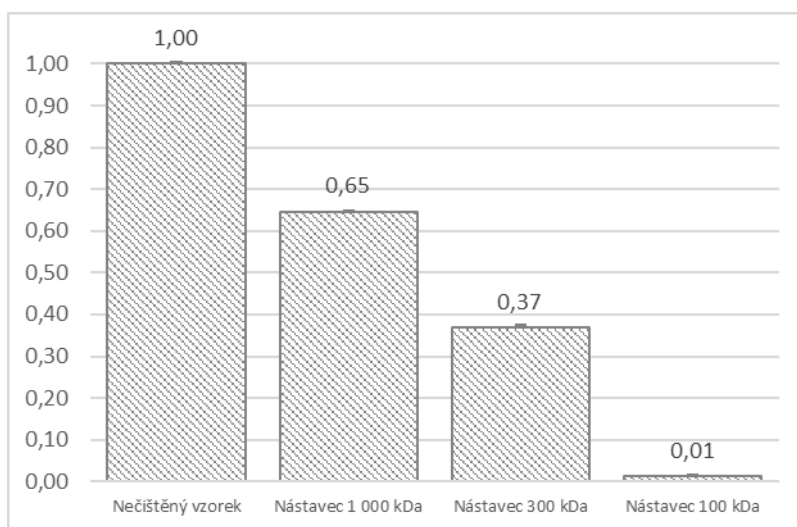


Obr. 27 - Srovnání naměřených absorpčních spekter pro nečistěný vzorek AuDAC_A₂ a následně ultrafiltrováný skrze 300 kDa nástavec (plný průběh)

Pro zvýšení účinnosti ultrafiltrace byl zvolen konečný postup, který byl aplikován při čištění veškerých vzorků následujících po sérii AuDAC_A: nejprve je vzorek ultrafiltrován skrze 1 000 kDa nástavec a posléze je takto ultrafiltrován vzorek ze spodní části nástavce opět ultrafiltrován pomocí 300 kDa nástavce.

c) XRF analýza

Pro podrobné monitorování ztrát nanočástic vzorku AuDAC_A₂ v procesu ultrafiltrace byla zvolena analýza XRF. Následující Obr. 28 udává relativní ztráty nanočástic v procesu čištění oproti referenčnímu vzorku, který nebyl ultrafiltrován.

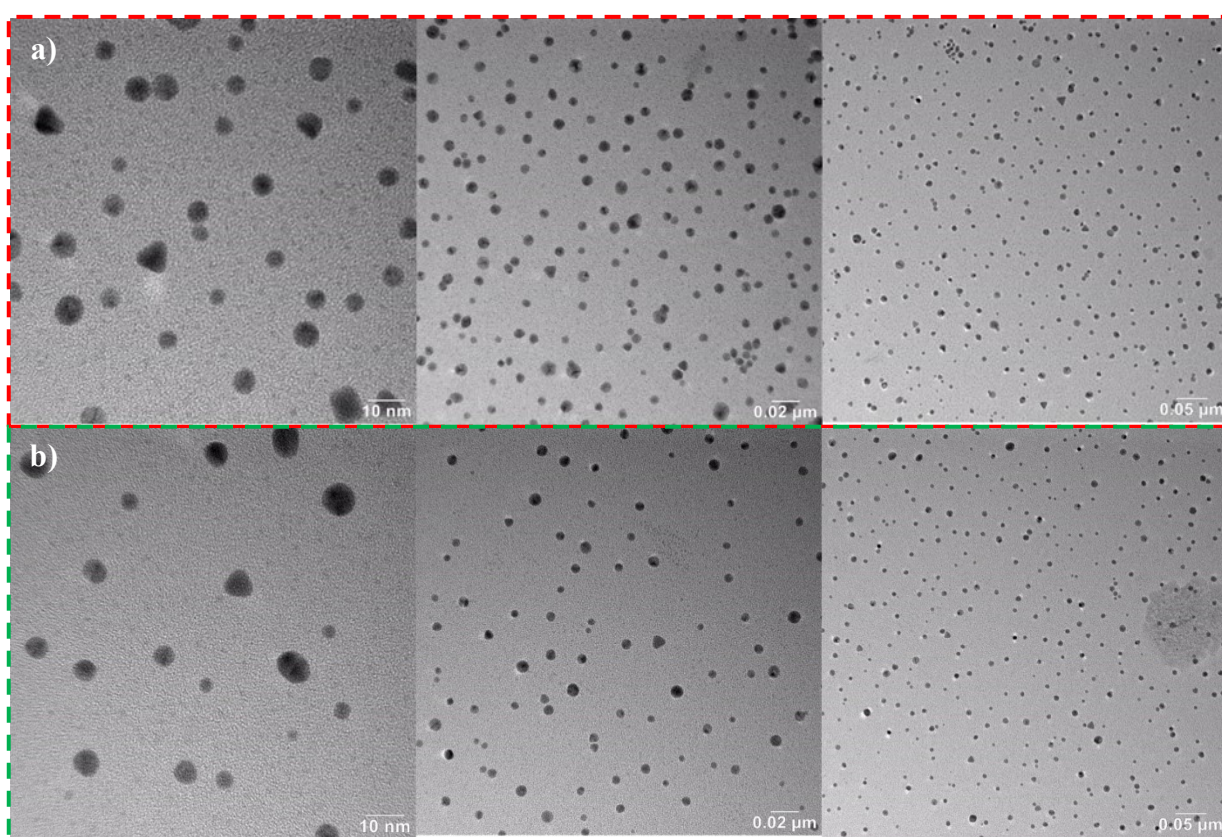


Obr. 28 – Graf ztrát AuDAC_A₂ v průběhu ultrafiltrace

Nejvýraznější snížení množství nanočástic bylo při použití 1 000 kDa nástavce. Zde byly ztráty 35 % oproti nanočásticím vzorku referenčního. U vzorku, který prošel 300 kDa nástavcem byly ztráty vyšší než 50 % oproti referenci, avšak s přihlédnutím ke kvalitě vyčištění od nežádoucích molekul bylo výhodnější zvolit tuto metodu.

d) Reprezentativní snímky TEM

Pro představu distribuce, disperzity a velikosti částic vzorku AuDAC_A₂ byly vybrány snímky TEM, které ukazují rozdíl mezi ultrafiltrací za použití 1 000 a 300 kDa nástavce (Obr. 29).



Obr. 29 – Srovnání snímků z TEM vzorku AuDAC_A₂ ultrafiltrovaný za použití: a) 1 000 kDa a b) 300 kDa nástavce

Skrze 1 000 kDa ultrafiltrační nástavec prošly i frakce nanočástic, jejichž velikost se pohybovala v intervalu 10-20 nm, oproti tomu 300 kDa nástavec propustil především nanočástice o velikosti v řádech jednotek nanometrů. Distribuce nanočástic tak byla viditelně užší.

7.2 Vzorek AuDAC_B₁

Vzorek s označením AuDAC_B₁ byl syntetizován pro účely optimalizace finální metody purifikace roztoků zlatých nanočástic a studium souhrnného vlivu purifikačních kroků na vzorek AuDAC_B₁. Byl zvolen následující purifikační proces: filtrace skrze 0,22 μm PES filtr, následná 24 h dialýza proti UPW a ultrafiltrace nejprve s použitím 1 000 kDa a následně 300 kDa nástavce.

a) Studium velikosti částic

Pro studium změn v průměrné velikosti částic a jejich polydisperzitě je porovnáván nečištěný a plně čištěný vzorek pomocí DLS. Tab. 10 níže shrnuje výsledky této analýzy.

Tab. 10 – Vyhodnocení dat DLS analýzy procesu čištění na vzorek AuDAC_B₁

Specifikace vzorku AuDAC_B ₁	Hydrodynamický průměr d [nm]	Procentuální odchylka hydrodynamického průměru σ_o [%]	Index polydisperzity PDI [-]
Nečištěný	46	± 15,22	0,397
Přečištěný výše uvedeným postupem	21	± 4,76	0,683

Nečištěný vzorek měřený bezprostředně po syntéze a následné dialýze v kyselém prostředí, vykazoval průměrnou velikost částic AuDAC_B₁ 46 nm a systém byl spíše paucidisperzní. Po purifikačním procesu byl ovšem sledován velký nárůst indexu polydisperzity systému. Z hlediska hlubší analýzy lze říci, že použití 0,22 μm PES filtru nemělo znatelný účinek, ovšem problematickou se stala část, kdy proběhla 24h dialýza vzorku a jeho následná ultrafiltrace. Pravděpodobně byl po 24h dialýze mírně narušen obal nanočástic.

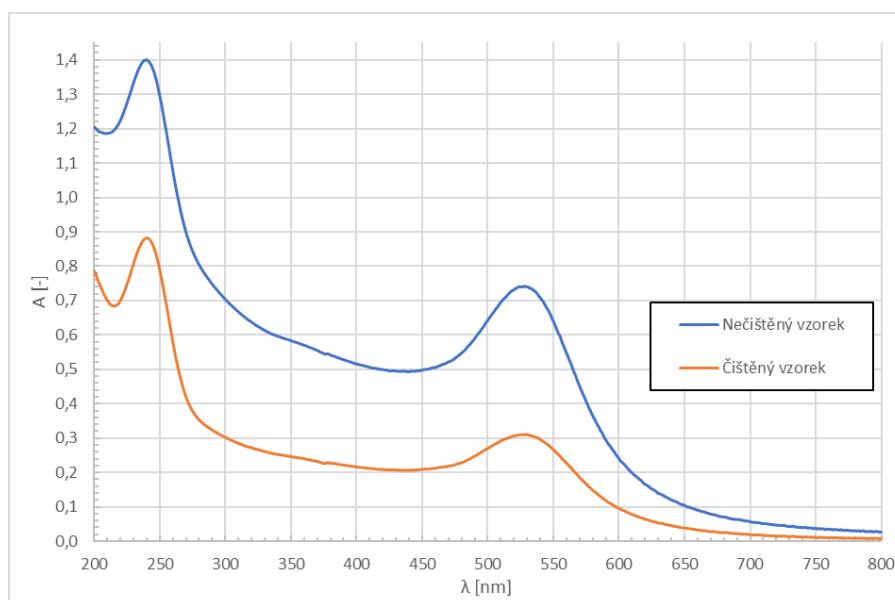
Tento jev byl následně zásadní pro ultrafiltrace, jelikož průchod vzorku skrze nástavec při centrifugaci pravděpodobně zapříčinil další poškození stabilizační vrstvy, její delaminaci a možná i následnou částečnou agregaci vzorku. Přesto, že při DLS analýze přečištěného vzorku byly zaznamenány částice o průměrné velikosti 21 nm, tedy podobné jako před tím, hodnota PDI, a tedy i polydisperzita vzorku, zásadně vzrostla, zřejmě kvůli částečné agregaci, ale také debris o velikosti jednotek nanometrů pocházejících z odštěpených molekul DAC_B₁.

b) UV-VIS analýza

Při UV-VIS analýze byla pozorována absorpční maxima zlatých nanočástic a přebytku DAC_{B1} a vlnová délka SPR maxima. Následující Tab. 11 shrnuje výsledky analýzy a naměřená spektra jsou na Obr. 30.

Tab. 11 – Shrnutí výsledků UV-VIS analýzy AuDAX_{B1}

Specifikace vzorku AuDAC _{B1}	Vlnová délka specifická pro maximum absorpce AuDAC _{B1} λ_{MAX} [nm]	Hodnota maxima absorpce AuDAC _{B1} A_{MAX} [-]
Nečištěný	528	0,742
Přečištěný	530	0,311

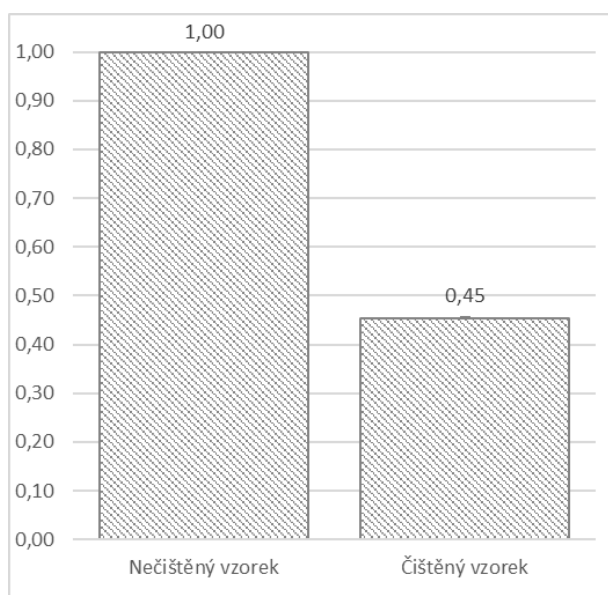


Obr. 30 – Naměřená absorpční spektra nečištěného a čištěného vzorku AuDAC_{B1} (plný průběh)

Z hlediska čištění od přebytku DAC_{B1} můžeme konstatovat, že purifikace proběhla úspěšně vzhledem k poklesu absorpčního maxima v oblasti vlnových délek $\lambda = 225-250$ nm. Lze předpokládat, že zbytkový signál odpovídá DAC_{B1} navázanému na nanočásticích. Ovšem došlo k poklesu i v oblasti specifické pro AuDAC_{B1}. To značí snížení koncentrace zlatých nanočástic v roztoku při procesu purifikace. Konkrétním ztrátám se věnuje následující XRF analýza.

c) XRF analýza

XRF analýza stanovila ztráty nanočástic při purifikaci a případné naředění roztoku při dialýze. Dle sloupcového grafu (Obr. 31) můžeme říci, že při purifikačním procesu vzorku AuDAC_B₁ ztráty činily 55 % oproti referenčnímu nečištěnému vzorku. To znamená, že i přes nevhodné seřazení kroků purifikace (dialýza před ultrafiltrací), nebyly ztráty kritické.



Obr. 31 – Graf nežádoucích efektů v procesu purifikace vzorku AuDAC_B₁

Na základě těchto výsledků by sestaven výsledný postup pro další purifikace: bezprostředně po syntéze a 2h dialýze v kyselém prostředí k odstranění nezreagovaných solí je provedena ultrafiltrace (nejdříve pomocí 1 000 kDa nástavce, následně pomocí 300 kDa nástavce), posléze 48h dialýza proti UPW a filtrace vzorků skrze 0,22 μm PES filtry.

Následující kapitoly experimentální části se věnují studiu purifikace nanočástic připravených pomocí dalších selektivně oxidovaných polysacharidů, konkrétně dialdehydu alginátu (zkratkou DAAL), dextranu (zkratkou DADXA) a hyaluronátu (zkratkou DAH).

7.3 Série vzorků stabilizovaných ostatními dialdehydy

Tato série vzorků byla připravena za účelem studia účinnosti výsledného procesu čištění u vzorků připravených pomocí dalších materiálů, konkrétně DAAL, DADXA a DAH. Vliv jednotlivých purifikačních kroků byl opětovně zkoumán prostřednictvím DLS, UV-VIS a XRF analýzy a následně byly pořízeny snímky z TEM. Jako první byl analyzován vzorek zlatých nanočástic připravený pomocí dialdehydu alginátu, následně vzorek nanočástic připravených pomocí dialdehydu dextranu a jako poslední byl vzorek připravený dialdehydem hyaluronátu.

7.3.1 AuDAAL_A₁

a) Studium velikosti částic

Pomocí DLS byly sledovány průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity v závislosti na (ne)čištění, viz Tab. 12.

Tab. 12 – Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity vzorku AuDAAL_A₁

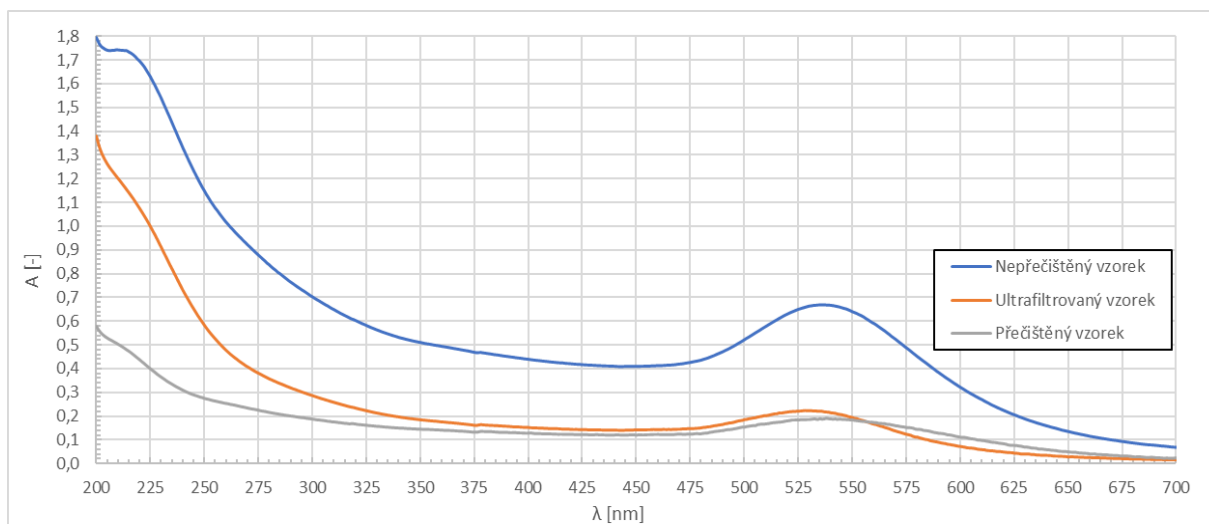
Specifikace vzorku	Hydrodynamický průměr d [nm]	Procentuální odchylka hydrodynamického průměru σ_o [%]	Index polydisperzity PDI [-]
Nečištěný	62	± 0,48	0,228
Po ultrafiltraci	41	± 0,22	0,243
Kompletně přečištěný	46	± 0,30	0,268

U vzorku AuDAAL_A₁ byl pozorován stejný trend jako u předešlých částic, kdy byly větší částice a přebytek daného stabilizačního/redukčního činidla odstraněny a byly tak získány pouze částice o menších rozměrech. DAAL mívá tendence tvořit nanočástice nad 20 nm, tedy větší v porovnání s DAC. To lze pozorovat vzhledem k hodnotě hydrodynamického průměru, jež po kompletním vyčištění vzorku činila 46 nm.

U hydrodynamického průměru byl pozorován pokles hydrodynamického průměru, což je u purifikace standardní jev vzhledem k vyčištění přebytku DAAL a zbavení se větších frakcí nanočástic. Nezvyklý byl ovšem růst velikosti nanočástic u kompletně přečištěného vzorku oproti odběru po ultrafiltraci. U výsledných hodnot indexu polydisperzity byl sledován postupný vzrůst, jež je taktéž abnormální. To nejspíše znamená, že zvýšení velikosti částic po dialýze a růst PDI AuDAAL_A₁ byl nejspíš dopad pravděpodobného mírného rozrušení obalů nanočástic a jejich následné částečné agregaci.

b) UV-VIS analýza

UV-VIS analýza stanovila změny maxima absorpce DAAL_A₁ v průběhu purifikace v souvislosti s hodnotou SPR AuDAAL_A₁ a intenzitou absorpčního maxima (Obr. 32).

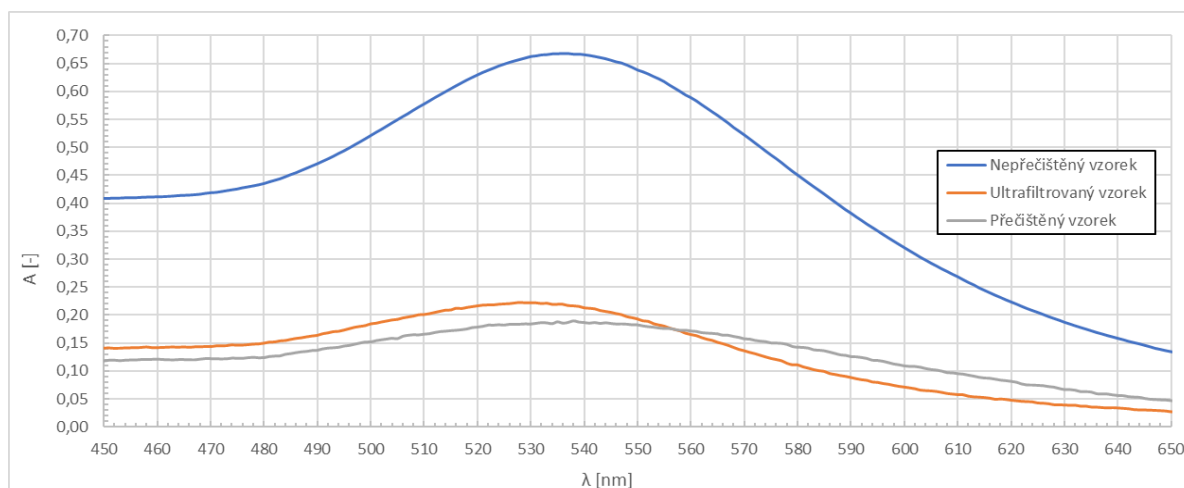


Obr. 32 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrovaného a čištěného vzorku AuDAAL_A₁ (plný průběh)

U absorpce DAAL_A₁ při ~220 nm můžeme sledovat obdobný trend jako u předešlých vzorků, tedy pokles absorpčního maxima. To značí, že purifikace byla úspěšná. Nicméně došlo k poklesu u SPR maxima nanočástic AuDAAL_A₁, což je vidět na detailu spekter na Obr. 33. Výsledky byly zpracovány taktéž v následující Tab. 13.

Tab. 13 – Shrnutí výsledků UV-VIS analýzy AuDAAL_A₁

Specifikace vzorku	Vlnová délka specifická pro maximum absorpce AuDAAL_A ₁ $\lambda_{MAX} [nm]$	Hodnota maxima absorpce AuDAAL_A ₁ $A_{MAX} [-]$
Nečištěný	537	0,668
Po ultrafiltraci	528	0,223
Přečištěný	538	0,190

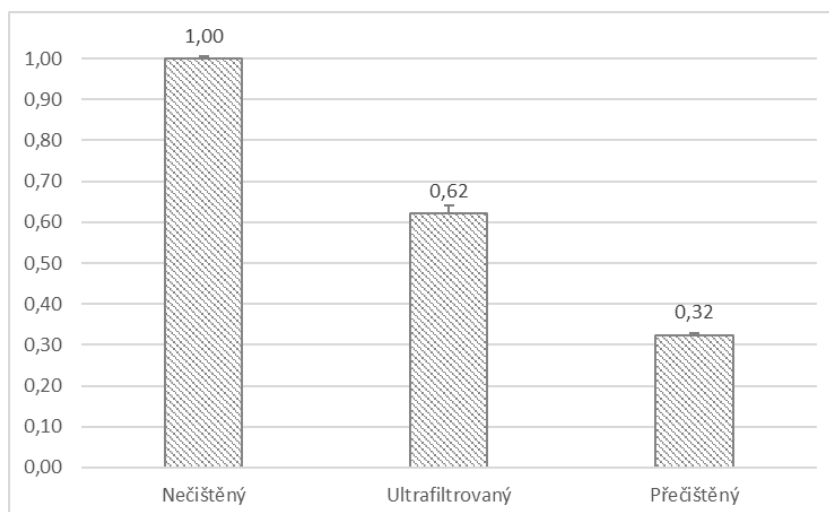


Obr. 33 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrovaného a čištěného vzorku AuDAAL_A₁ (detail oblasti specifické pro AuNPs)

Vzhledem k odstranění větších částic je absorpční maximum po ultrafiltraci posunuto ke kratší vlnové délce v porovnání s referenčním, nečištěným vzorkem. Po kompletním přečištění se absorpční maximum posouvá k delší vlnové délce, jelikož se objem částic zvýšil v zřejmě v důsledku lehkého narušení jejich obalu během dialýzy. Tyto děje byly doprovázeny snížením absorbance, jelikož v průběhu purifikace došlo ke ztrátám částic (ultrafiltrace) a jejich naředění (dialýza), tedy ke snížení jejich signálu. Ztráty byly posléze kvantifikovány metodou XRF.

c) XRF analýza

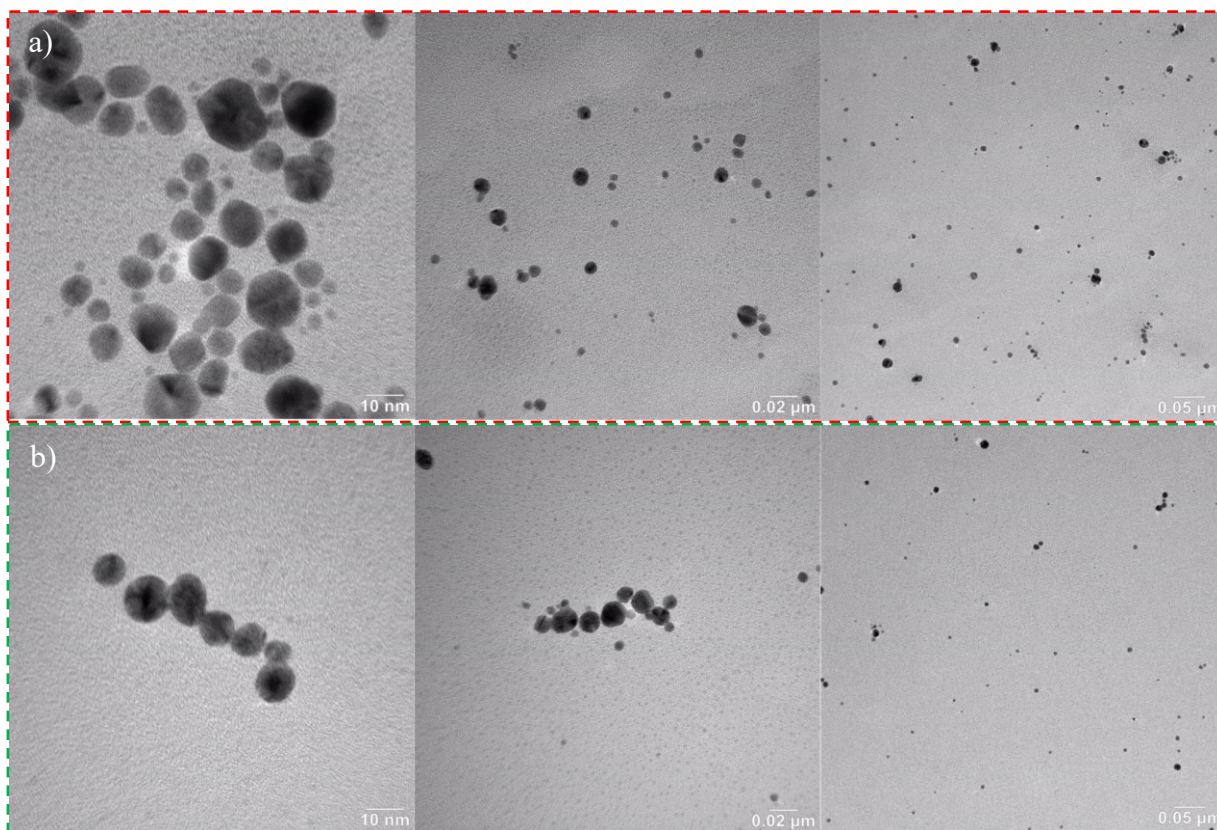
Relativní ztráty nanočástic v procesu purifikace jsou zaznamenány na Obr. 34. Ztráty pro vzorek AuDAAL_A₁ byly vyšší než 50 % a dosáhli až 68 %, zřejmě v důsledku jejich vyšší velikosti. Čištění tedy bylo úspěšné, ovšem za cenu nižšího výtěžku.



Obr. 34 - Graf ztrát v procesu purifikace vzorku AuDAAL_A₁

d) Reprezentativní snímky TEM

TEM stanovila morfologii a orientační velikost nanočástic. Snímky z TEM vzorku AuDAAL_A1 jsou shrnuty v Obr. 35.



Obr. 35 - Srovnání snímků z TEM vzorku AuDAAL_A1: a) nepřečištěný a b) přečištěný

TEM analýza poskytuje informaci o velikosti nanočástic, respektive velikosti zlatých jader, jelikož vzorky jsou při přípravě na TEM dehydratovány a nelze tak zobrazit polymerní obal nanočástice. Velikosti se pohybovaly u nečištěného vzorku v části a) Obr. 35 mezi 10-20 nm, což je značný nárůst oproti nanočásticím stabilizovaným pomocí DAC, jejichž velikost se pohybovala v řádu jednotek nanometrů. To je zřejmě dáno vlivem struktury polysacharidu, jež má zásadní vliv na vlastnosti nanočástic. [26] U přečištěného vzorku (Obr. 35 b) došlo ke snížení velikosti nanočástic pod 10 nm.

7.3.2 AuDADXA_A₁

a) Studium velikosti částic

Jako další byly studovány nanočástice připravené pomocí DADXA_A₁. Metoda DLS nám opět zprostředkovala údaje o hydrodynamickém průměru a indexu polydisperzity vzorků AuDADXA_A₁ (Tab. 14).

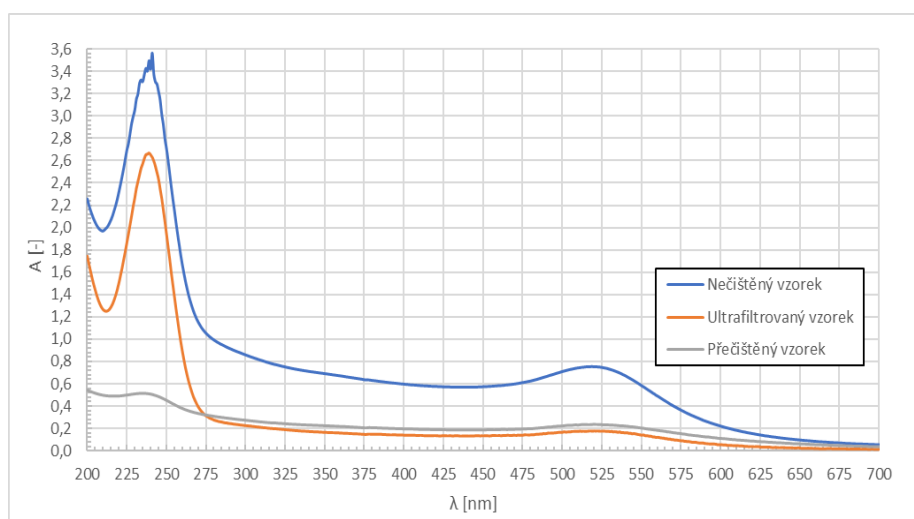
Tab. 14 - Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity vzorku AuDADXA_A₁

Specifikace vzorku	Hydrodynamický průměr d [nm]	Procentuální odchylka hydrodynamického průměru σ_o [%]	Index polydisperzity PDI [-]
Nepřečištěný	16	± 0,63	0,426
Po ultrafiltraci	16	± 3,14	0,383
Přečištěný	17	± 1,74	0,286

Při srovnání hydrodynamických průměrů nečištěného a ultrafiltrovaného vzorku můžeme vidět minimální změny odpovídající odchylce měření. Každopádně po dialýze a filtraci měl obal nanočástic tendenci opět zvyšovat svůj objem jako u předešlého vzorku AuDADXA_A₁. Co se týče indexu polydisperzity, u jeho hodnoty byl zaznamenán pokles, což značí nejen vyčištění vzorku od AuDADXA_A₁, ale úspěšné snížení polydisperzity nanočástic.

b) UV-VIS analýza

Metoda UV-VIS stanovila rozdíly vlnových délek a intenzit absorpčních maxim DADXA_A₁ a AuDADXA_A₁, viz Obr. 36.

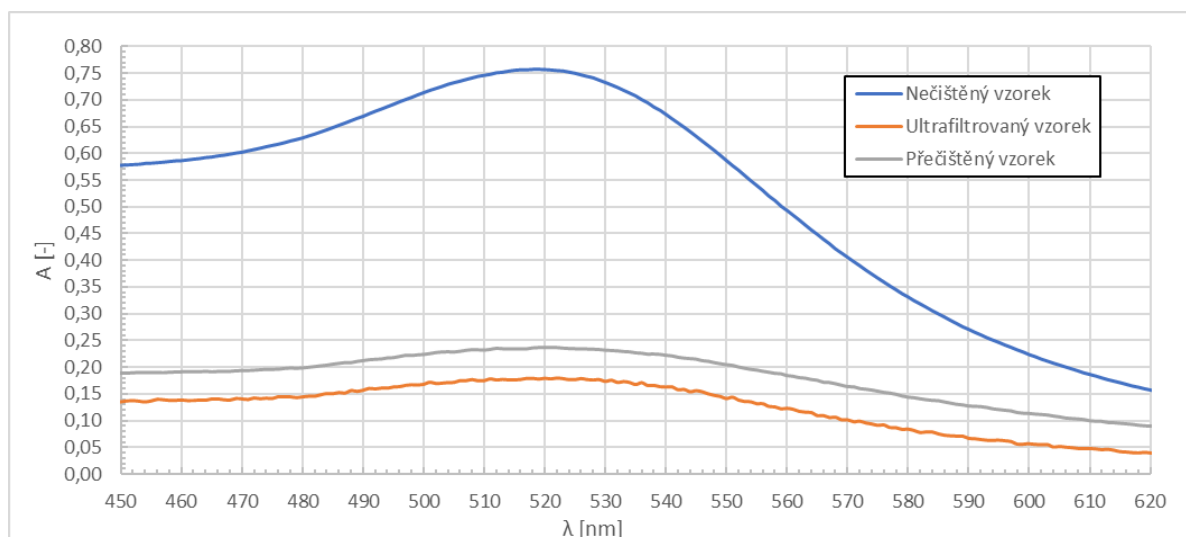


Obr. 36 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrovaného a čištěného vzorku AuDADXA_A₁ (plný průběh)

Analýza UV-VIS opět potvrdila obvyklý pokles absorpce DADXA_A₁, tedy vyčištění od přebytku DADXA_A₁ bylo účinné. Taktéž byl sledován opakovaný trend poklesu absorpce v oblasti SPR absorpce nanočástic AuDADXA_A₁, tedy opět došlo ke ztrátám v průběhu purifikace oproti referenčnímu nečištěnému vzorku, viz detail absorpčních spekter Obr. 37 a výsledky v Tab. 15.

Tab. 15 - Shrnutí výsledků UV-VIS analýzy AuDADXA_A₁

Specifikace vzorku	Vlnová délka specifická pro maximum absorpce AuDADXA_A ₁ $\lambda_{MAX} [nm]$	Hodnota maxima absorpce AuDADXA_A ₁ $A_{MAX} [-]$
Nečištěný	519	0,757
Po ultrafiltraci	522	0,180
Přečištěný	520	0,237

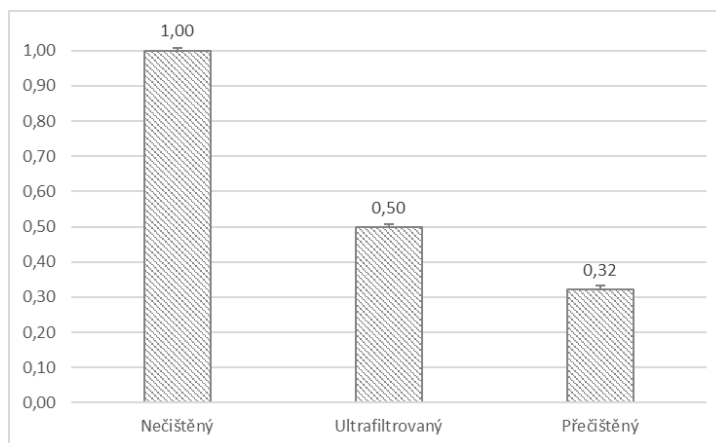


Obr. 37 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrovaného a čištěného vzorku AuDADXA_A₁ (detail oblasti specifické pro AuNPs)

Zajímavostí u tohoto vzorku byl mírný růst absorpce po celém procesu purifikace oproti absorpenci vzorku ultrafiltrovaného. Pravděpodobně mohlo v průběhu 48h dialýzy dojít místo k naředění roztoku spíše k zakoncentrování, tedy vzorek se zbavil přebytečné vody, což by vysvětlovalo zvýšení signálu pro AuNPs. Ztráty jako takové byly zaznamenány pomocí analýzy XRF, kde je znatelné, že opravdu nedošlo ke zvýšení množství nanočástic, pouze zakoncentrování.

c) XRF analýza

Výsledky analýzy XRF, zobrazující ztráty nanočástic AuDADXA_A₁, jsou zobrazeny formou sloupcového grafu na Obr. 38.

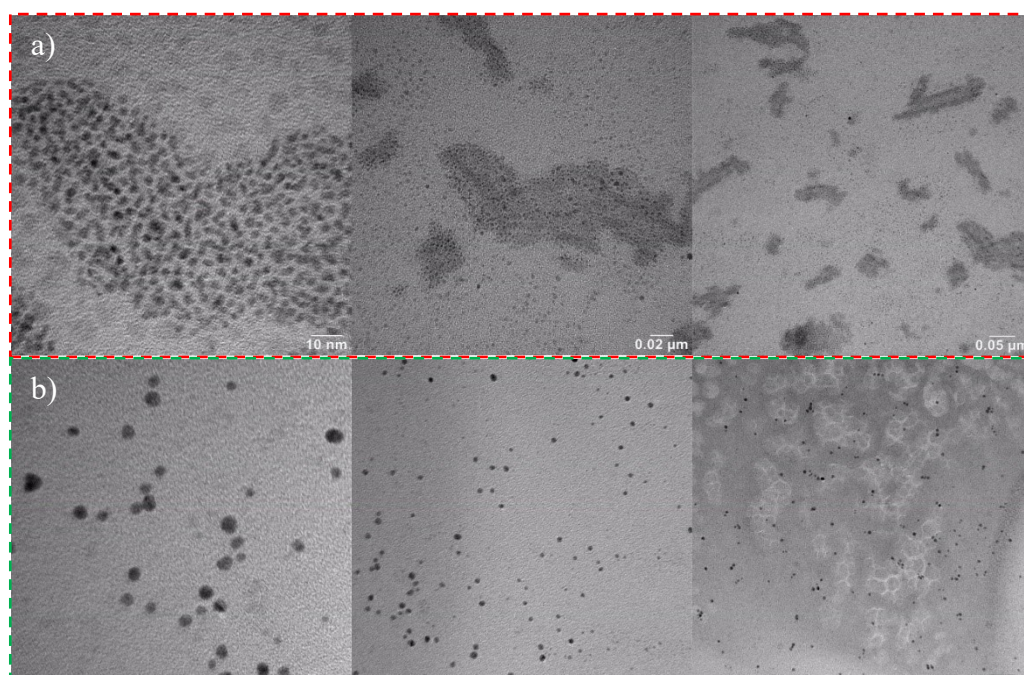


Obr. 38 - Graf ztrát v procesu purifikace vzorku AuDADXA_A₁

Výsledná data XRF analýzy dokázala, že vzorek AuDADXA_A₁ měl více než 50% ztráty oproti referenci (nečistěný vzorek AuDADXA_A₁), konkrétně 68 %. Nicméně dle předešlých testování vzorků byla potvrzena vysoká úspěšnost purifikačních kroků, zejména v souvislosti s odstraněním přebytečného polysacharidu.

d) Reprezentativní snímky TEM

Snímky z TEM ilustrující morfologii a velikost zlatých jader nanočástic vzorku AuDADXA_A₁ jsou na Obr. 39.



Obr. 39 - Srovnání snímků z TEM vzorku AuDADXA_A₁: a) nepřečištěný a b) přečištěný

Ze snímku TEM můžeme pozorovat, že v části a), tedy u nepřečištěného vzorku, mají nanočástice AuDADXA_A₁ tendence k tvorbě „nanočásticového mračka“, tedy tvorbě skupinek (clusterů) nanočástic. K tomu dochází zřejmě kvůli přítomnosti nadbytku DADXA_A, který lepí částice k sobě. Jádra zlatých nanočástic nepřečištěného vzorku měla většinou velikosti v nižších jednotkách nanometrů, avšak vyskytovala se zde i malá frakce větších částic s velikostí nad 10 nm. Oproti tomu přečištěný vzorek (Obr. 39b) měl užší distribuci, jelikož nanočástice se již neshlukovaly, měly mezi sebou dostatečný prostor a frakce nanočástic nad 10 nm byly separovány. Zbylé nanočástice tak měly velikost výrazně pod 10 nm.

7.3.3 AuDAH_A₁

Poslední studovaný vzorek z této série byl vzorek zlatých nanočástic připravených pomocí DAH_A₁. Je zajímavé, že v porovnání s ostatními vzorky se DAH_A choval nestandardně ve většině aspektů, od zbarvení až po velikost a polydisperzitu nanočástic. To je zřejmě důsledkem toho, na rozdíl od ostatních polysacharidů je hyaluronan heteroglukan, což má vliv na růst i stabilizaci AuNPs.

a) Studium velikosti částic

Vysoká hodnota hydrodynamického průměru nanočástic byla odhadována již vzhledem k modro-černému zbarvení vzorku AuDAH_A₁ po syntéze. Modro-černá barva totiž značí SPR maxima absorbance v oblastech delších vlnových délek, které jsou specifické právě pro nanočástice větších rozměrů. Jelikož rozměry nanočástic se i po přečištění pohybovaly ve vyšších desítkách nanometrů, bylo ultrafiltrování problematické a vzorek byl ultrafiltrován pouze pomocí 1 000 kDa nástavce, jelikož při pokusu ultrafiltrace skrze 300 kDa nástavec vzorek vykazoval naprosto totožné závěry jako při ultrafiltraci skrze 1 000 kDa nástavec, viz Tab. 16. Proto byly měřeny odběry z horního i dolního 1 000 kDa nástavce. Díky tomu bylo podrobněji sledováno zachycení frakcí větších nanočástic a zároveň velikost částic, které byly ultrafiltrovány.

Tab. 16 - Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity vzorku AuDAH_A₁

Specifikace vzorku	Hydrodynamický průměr d [nm]	Procentuální odchylka hydrodynamického průměru σ_o [%]	Index polydisperzity PDI [-]
Nepřečištěný	142	± 0,99	0,503
Po ultrafiltraci – horní část nástavce 1 000 kDa	104	± 0,29	0,236
Po ultrafiltraci – dolní část nástavce 1 000 kDa	43	± 1,16	0,479
Přečištěný	51	± 5,88	0,351

Nepřečištěný vzorek tak neobsahoval pouze klubka přebytečného DAH_A, ale i velké nanočástice. Polydisperzitu systému potvrdil index polydisperzity, jež nabyl hodnoty 0,503. Po následné ultrafiltraci vzorku AuDAH_A₁ byly frakce větších nanočástic, vykazujících modro-černé zbarvení, zachyceny v horní části nástavce spolu s přebytkem DAH_A. Oproti tomu frakce nanočástic s hydrodynamickým průměrem kolem 40 nm prošla ultrafiltračním nástavcem do jeho spodní části.

Zajímavostí bylo zlatavě žluté zbarvení této frakce, které indikovalo absenci SPR, což se děje jen u velmi malých nanočástic, označovaných někdy anglickým pojmem „nanoseeds, tedy v doslovném překladu „nanosemínka“. Vzhledem k zbarvení bylo odhadováno, že tato frakce obsahuje právě takovéto zárodky budoucích nanočástic. Vzhled vzorku po ultrafiltraci je demonstrován na Obr. 40. Takto malé nanočástice jsou také velmi nestabilní. Je proto možné, že pozorovaný hydrodynamický průměr kolem 40 nm je dán jejich shlukováním do celků (clusterů) navzájem volně propojených DAH, podobně jako to bylo pozorováno u DADXA.

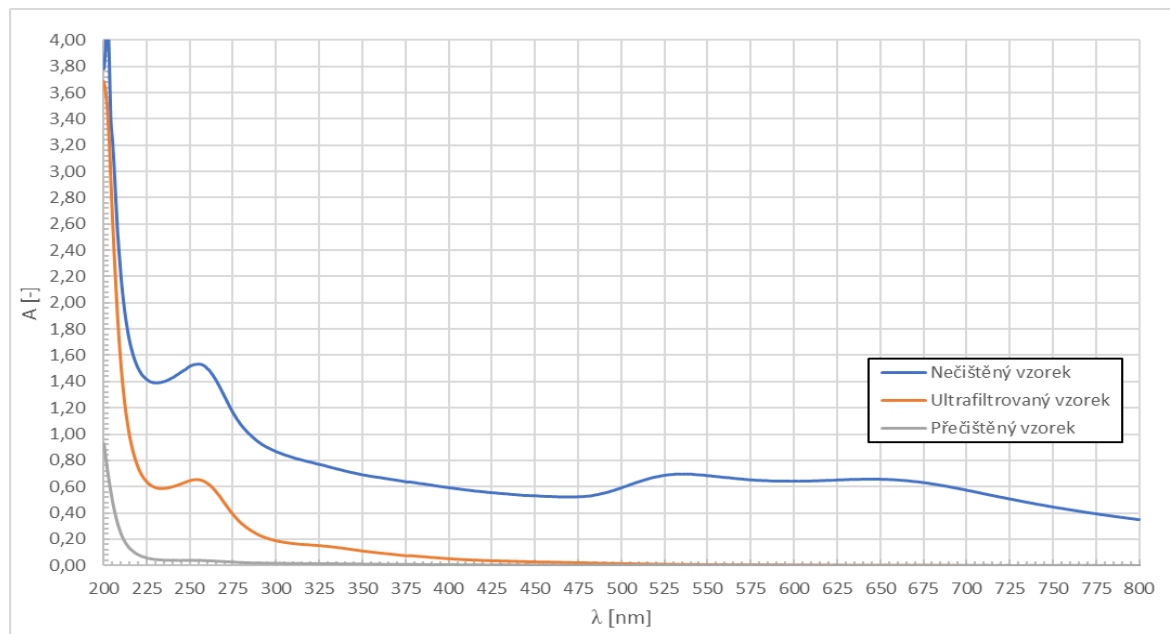


Obr. 40 – Výsledek ultrafiltrace vzorku AuDAH_A₁ pomocí 1 000 kDa nástavce

Při porovnání dat v Tab. 16 pro vzorek ultrafiltrovaný a ten následně přečištěný dialýzou můžeme sledovat opět zvýšení průměrné hodnoty hydrodynamického průměru nanočástic. To lze opět může vysvětlit zvětšením objemu polymerní vrstvy nanočástic v důsledku jejího narušení během dialýzy. Další informace o nanočásticích v obou frakcích ultrafiltrace a taktéž jejich porovnání s nepřečištěným a přečištěným vzorkem nám dále poskytla UV-VIS analýza vzorku.

b) UV-VIS analýza

Nejdříve byl sledován plný průběh absorpčních křivek od 200 do 800 nm. Zde se objevily abnormality, které jsou zobrazeny na následujícím Obr. 41.



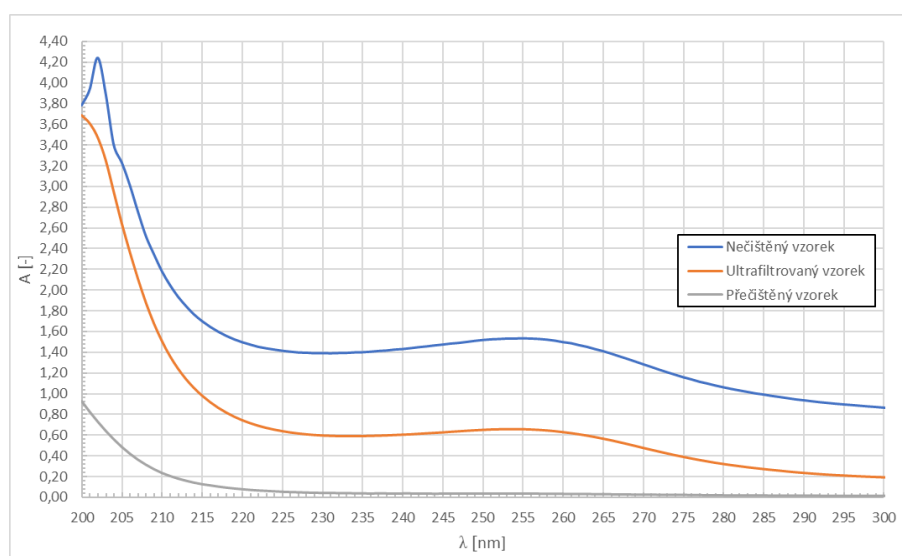
Obr. 41 - Naměřená absorpční spektra nečistěného, ultrafiltrovaného a čištěného vzorku AuDAH_A₁ (plný průběh)

Co se týče nepřechištěného vzorku AuDAH_A₁, tak zde byla sledována široká SPR absorpce v oblasti vlnových délek 475-700 nm se dvěma lokálními maximy. Taktéž byly pozorovány absorpce v oblasti vlnových délek 225-275 nm a 200-225 nm. Detail těchto oblastí poskytuje nadcházející Obr. 42 a konkrétní hodnoty absorpčních maxim Tab. 17. Oblast 225-275 nm v tomto případě nejspíše nepoukazovala na přebytek DAH v roztoku, jako v předešlých případech, avšak spíše refletovala právě výše zmíněné „nanoseeds“, jejichž zbarvení je spíše žluté. Přebytek DAH spíše zobrazovala druhá zmíněná oblast (200-225 nm), kde absorbuje také hyaluronan. V této oblasti sice můžeme pozorovat pokles, tedy vyčištění od DAH, ovšem při dialýze byla zaznamenána také ztráta signálu v oblasti 225-275 nm, „nanoseeds“ tedy pravděpodobně prošly póry dialyzační membrány (50 kDa).

Absence SPR absorpce ve spektru po ultrafiltraci je důkazem, že se ve spodní části ultrafiltračního nástavce (1 000 kDa) nacházely pouze „nanoseeds“ a část volného DAH. Jelikož DAH tvoří klubka kolem 100 nm a „nanosemínka“ jsou velká kolem 1-5 nm, což objasnilo hodnotu průměrného hydrodynamického průměru, která se pohybovala kolem 40 nm.

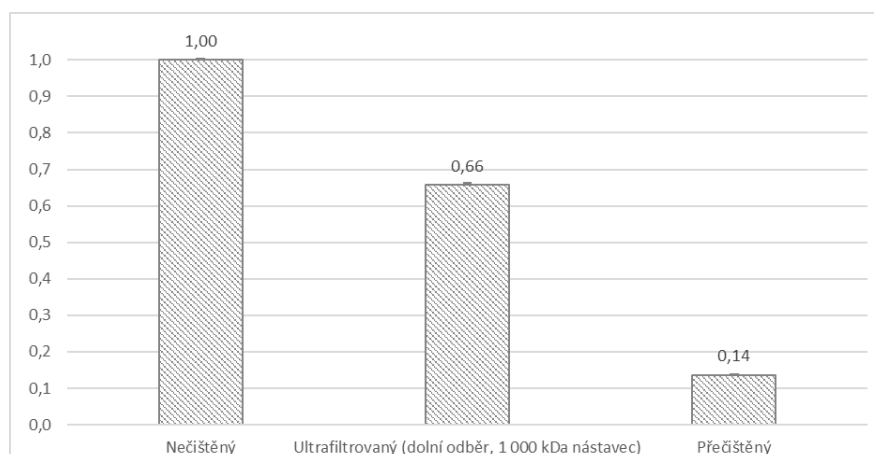
Tab. 17 - Shrnutí výsledků UV-VIS analýzy AuDAH_A₁

Specifikace vzorku	Vlnová délka specifická pro maximum absorpce DAH_A ₁ λ _{MAX} [nm]	Hodnota maxima absorpce DAH_A ₁ A _{MAX} [-]	Vlnová délka specifická pro maximum absorpce AuDAH_A ₁ λ _{MAX} [nm]	Hodnota maxima absorpce AuDAH_A ₁ A _{MAX} [-]
Nečištěný	202	4,240	255	1,535
Po ultrafiltraci – dolní část nástavce 1 000 kDa	200	3,684	254	0,656
Přečištěný	200	0,925	231	0,045


 Obr. 42 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrovaného a čištěného vzorku AuDAH_A₁ (detail oblasti specifické pro AuNPs a DAH)

c) XRF analýza

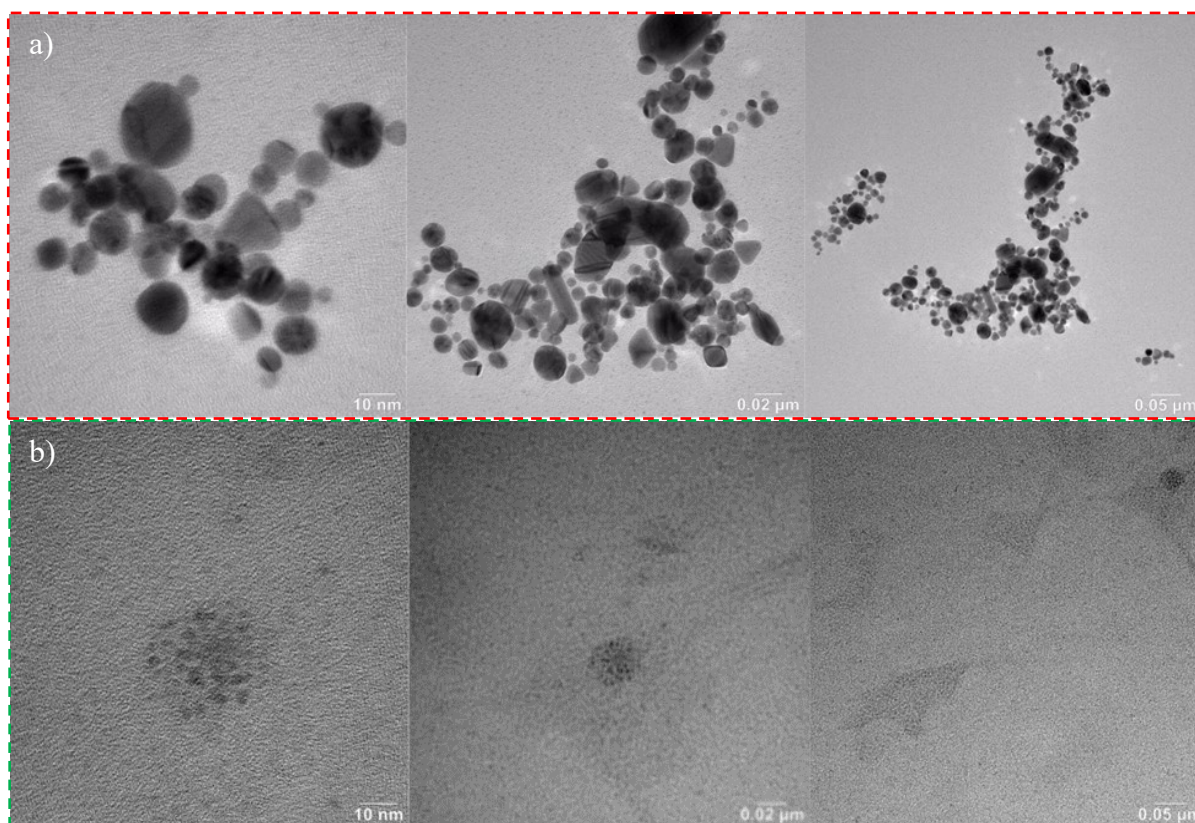
XFR analýza odhalila vysoké ztráty během purifikace, resp. po dialýze, viz Obr. 43.


 Obr. 43 - Graf ztrát v procesu purifikace vzorku AuDAH_A₁

Můžeme konstatovat, že po ultrafiltraci byl obsah zlata ve vzorku stále nad 50 % oproti vzorku referenčnímu (nečištěnému). Vzorek tedy obsahoval značný podíl malých „nanoseeds“. Oproti tomu po 48h dialýze a filtraci skrze 0,22 μm PES filtr byly ztráty tak vysoké, že obsah zlata pokles na hodnotu 0,14, tedy 14 %. To lze vysvětlit i malými rozměry nanočástic ve vzorku, což bylo potvrzeno snímky z TEM.

d) Reprezentativní snímky TEM

Pro analýzu morfologie a velikosti zlatých jader nanočástic vzorku AuDAH_A₁ byly vybrány snímky nečištěného vzorku a vzorku po ultrafiltraci skrze 1 000 kDa nástavce. Snímky těchto dvou vzorků můžeme sledovat na Obr. 44.



Obr. 44 - Srovnání snímků z TEM vzorku AuDAH_A₁: a) nepřečištěný a b) ultrafiltrovaný 1 000 kDa

Na Obr. 44 a) jsou nepřečištěné nanočástice vzorku AuDAH_A₁, u nichž můžeme pozorovat velmi zajímavé tvary. Na prostředním snímku lze pozorovat detail částic, kde můžeme vidět nejen polyedrické nanočástice, avšak i nanočástice tyčinkovitého a trojúhelníkového tvaru. Tyto tvary jsou například velmi dobré vzhledem k pronikání do těla buňky skrze biomembránu či pro Surface-enhanced Raman Scattering, což je analytická metoda využívající zesílení Ramanovského signálu právě na nerovnoměrném povrchu nanočástic.

Podobně v části b) jsou zaznamenány snímky ultrafiltrovaného vzorku a zde můžeme opravdu potvrdit výskyt výše zmíněných „nanosemínek“ o velikosti 1-5 nm, které jsou opět spojené do nanočásticových „obláčků“ pravděpodobně makromolekulami DAH_A.

7.4 Studium stability roztoků zlatých nanočástic

Dalším důležitým bodem, jemuž se bakalářská práce věnovala, bylo studium stability připravených koloidních roztoků zlatých nanočástic. Pro tyto potřeby byla zvolena analýza ZP nanočástic pomocí metody DLS a taktéž bylo studováno chování nanočástic v prostředí nadbytku N,N-Dimethylformamidu (DMF) při 40 °C.

a) Zeta potenciál vybraných vzorků AuDAX

Za účelem měření zeta potenciálu byly vybrány odběry vzorků před procesem čištění a po něm. Médium pro měření zeta potenciálu bylo UPW a pH vzorků bylo 3,5. U těchto odběrů byly sledovány především změny hodnoty zeta potenciálu, jež určuje elektrostatickou složku stabilizace nanočástic. Získané hodnoty shrnuje následující Tab. 18.

Tab. 18 – Výstupní data zeta potenciálu a jejich průměrná odchylka pro vybrané vzorky AuDAX

Vzorek	Průměrná hodnota zeta potenciálu ζ [mV]	Průměrná odchylka σ_{ζ} [mV]
AuDAC_A ₂ – nečištěný	-16,4	± 1,0
AuDAC_A ₂ – přečištěný	-15,3	± 1,5
AuDAC_B ₁ – nečištěný	-8,8	± 1,8
AuDAC_B ₁ – přečištěný	-1,2	± 1,3
AuDAH_B ₁ – nečištěný	-28,6	± 0,4
AuDAH_B ₁ – přečištěný	-22,1	± 0,4
AuDAAL_A ₁ – nečištěný	-17,6	± 0,5
AuDAAL_A ₁ – přečištěný	-12,6	± 0,3
AuDADXA_A ₁ – nečištěný	-23,5	± 0,8
AuDADXA_A ₁ – přečištěný	-1,7	± 0,4

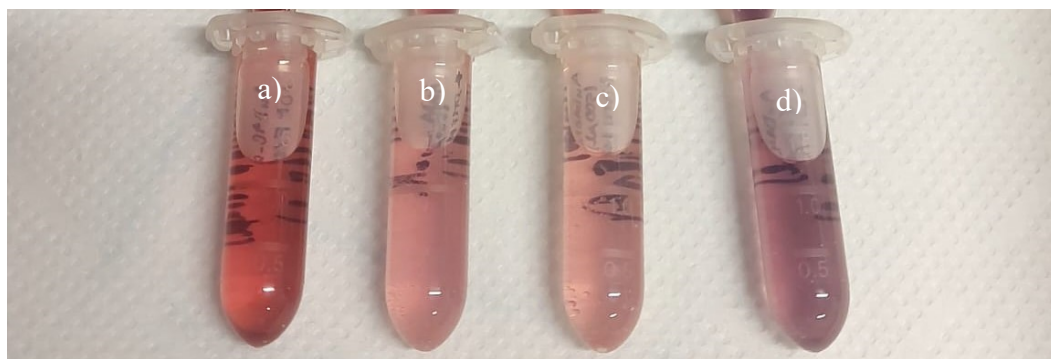
Z dat Tab. 18 můžeme pozorovat znatelný pokles hodnoty zeta potenciálu přečištěných vzorků oproti vzorkům přečištěným. To není překvapivé, vzhledem k odstranění velkých klubek polysacharidů. Hodnoty zeta potenciálu také reflektují obsah nabitých funkčních skupin v použitém polysacharidu. Hodnoty jsou tak výrazně zápornější u DAH a DAAL obsahujících -COOH skupiny. Naopak u DAC a DADXA je vidět posun k hodnotám bližším 0 mV. I přesto jsou nanočástice stabilní (nedochází k jejich agregaci). V tomto případě nanočástice tedy nejsou stabilizovány elektrostaticky, ale spíše jde o sterickou stabilizaci.

b) Stabilita vybraných vzorků AuDAX po přidavku DMF a následné změny teploty vzorku

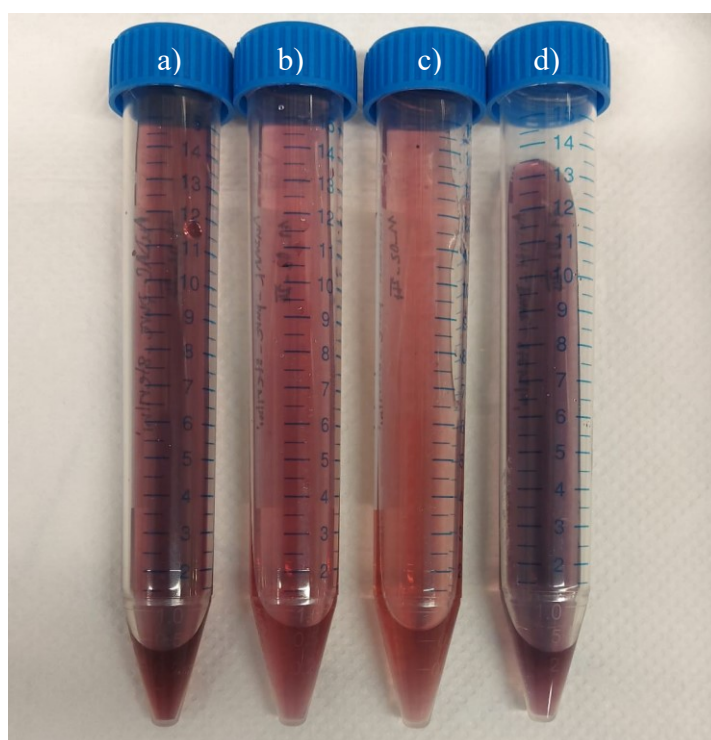
Pro lepší pochopení stability výsledných purifikovaných vzorků AuDAX byly vybrány vzorky AuDAC_A₂, AuDADXA_A₁ a taktéž vzorek AuDAAL_A₁ jež byl po studiu ultrafiltrace plně vyčištěn dle konečného purifikačního postupu. Následně byly vzorky testovány vzhledem k teplotě prostředí, kdy byla volena teplota 40 °C, jelikož teplota lidského těla se pohybuje kolem 37 °C, a tak byla vybrána hodnota vyšší.

Protože nedošlo z viditelné změně, bylo následně ke 100 µl vzorku přidáno 9,9 ml roztoku DMF a vzorky dále zahřívány. DMF by totiž mělo v případě nedostatečného vyčištění fungovat jako srážedlo pro přebytek DAX a také jako destabilizační činidlo vzhledem k vměstnávání molekul DMF a narušení obalu nanočástic. Tato pozorování prokázala, že zlaté nanočástice přečištěných vzorků ve vysokém nadbytku DMF zůstaly rozptýleny v roztoku a neměly tendence k agregaci ani po 24h při 40 °C.

Posledním testem byla dlouhodobá stabilita nanočástic, provedená na vzorcích určených pro testování cytotoxicity (AuDAC_C₁, AuDAAL_A₂, AuDADXA_A₂ a AuDAH_B₂), které byly napřed uchovávány 2 měsíce v lednici. Postup byl upraven tak, že k 500 µl vzorku bylo přidáno 1,5 ml DMF, tedy stále nadbytek oproti testovanému vzorku. Po přidavku DMF nebyl ani jeden vzorek vysrážen, následně byly vzorky ponechány za stálého míchání 24 h při 40 °C a ani po tomto kroku nebylo sledováno shlukování a vzorky v roztoku byly plně stabilní, viz Obr. 45 a 46 na str. 80.



Obr. 46 – Vzhled přečištěných vzorků po přidání přebytku DMF a temperaci na 40 °C po dobu 24 h: a) AuDAC_C₁, b) AuDAAL_A₂, c) AuDADXA_A₂, d) AuDAH_B₂



Obr. 45 - Vzhled přečištěných vzorků: a) AuDAC_C₁, b) AuDAAL_A₂, c) AuDADXA_A₂, d) AuDAH_B₂

7.5 Testování cytotoxicity AuDAX

Posledním bodem této práce byla analýza cytotoxicity purifikovaných roztoků zlatých nanočástic. Pro tyto potřeby byly nachystány vzorky AuDAC_C₁, AuDAAL_A₂, AuDADXA_A₂ a AuDAH_B₂. Následně byla stanovena hodnota IC₅₀ pro všechny vzorky, což je hodnota stanovující koncentraci testované látky, jež způsobí 50% inhibici růstu organismů, v našem případě buněčné linie NIH/3T3. Cytotoxicita vzorků a jejich hodnota IC₅₀ byly stanoveny pomocí MTT metody.

a) Stanovení koncentrace nanočástic vzorků AuDAX

V úvodu stanovení cytotoxicity purifikovaných koloidních roztoků AuDAX byla zjištěna koncentrace zlata v roztoku. (Tab. 19) Na základě toho byly vybrány koncentrace 5, 10, 25, 35 a 50 µl/ml, pouze u nejméně koncentrovaného vzorku AuDAAL_A₂ byla místo 50 µl/ml vybrána koncentrace 40 µl/ml. Testování probíhalo na buněčné linii 3T3/NIH v koncentraci 2·10⁵ buněk/ml. Koncentrace zlatých nanočástic, jejich dávkování do jamek mikrotitrační destičky a přidavek živného média jsou obsaženy v následující Tab. 19.

Tab. 19 – Hodnoty potřebné k provedení testu cytotoxicity

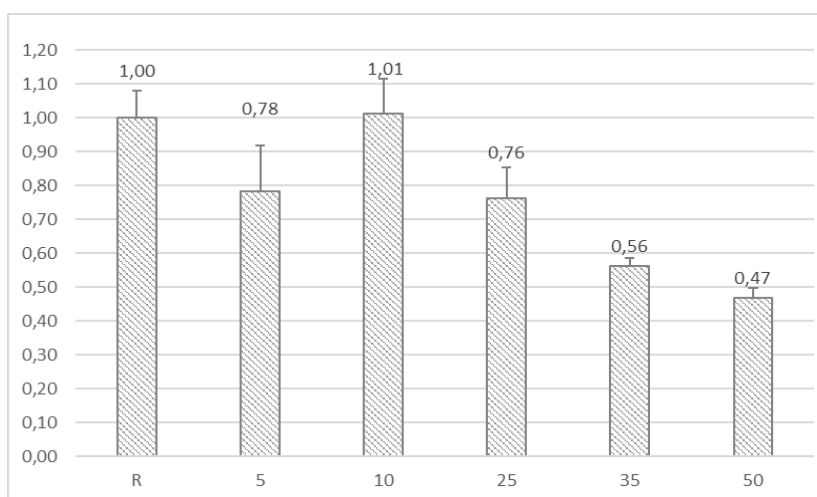
Označení vzorku	Koncentrace nanočástic ve vzorku c [µg/ml]	Testované koncentrace c_{test} [µg/ml]	Pipetovaný objem vzorku V_{vzorek} [µl]	Pipetovaný objem média V_{medium} [µl]
AuDAC_C ₁	148,2	5	3,4	96,6
		10	6,8	93,3
		25	16,9	83,1
		35	23,6	76,4
		50	33,7	66,3
AuDAAL_A ₂	56,0	5	8,9	91,1
		10	17,9	82,1
		25	44,6	55,4
		35	62,5	37,5
		40	71,4	28,6
AuDADXA_A ₂	65,6	5	7,6	92,4
		10	15,2	84,8
		25	38,1	61,9
		35	53,4	46,7
		50	76,2	23,8
AuDAH_B ₂	97,1	5	5,2	94,9
		10	10,3	89,7
		25	25,8	74,3
		35	36,1	63,9
		50	51,5	48,5

b) Hodnocení cytotoxicity vzorků AuDAX a stanovení hodnoty IC₅₀

Pro vyhodnocení výsledků měření cytotoxicity vzorků byla zvolena forma sloupcového grafu, jenž odráží relativní životaschopnost buněk. Obecně platné hodnoty sloužící ke zjištění, zda je daná koncentrace látky cytotoxická, je 30 % úmrtnost (0,3), jinými slovy 70 % relativní viabilita buněk (0,7) oproti referenci, kdy k buňkám nebyla přidána testovaná látka. Následně byly stanoveny hodnoty IC₅₀ jednotlivých vzorků. Grafy a hodnoty IC₅₀ jsou zpracovány níže.

Vzorek AuDAC_C₁

Obr. 47 ukazuje závislost životaschopnosti buněk na koncentraci AuDAC_C₁. Dle výše uvedených hodnot můžeme konstatovat, že vzorek AuDAC_C₁ při koncentracích 5, 10 a 25 µg/ml nebyl cytotoxický. Koncentrace 35 a 50 µg/ml již byly považovány za cytotoxické. Hodnota IC₅₀ byla stanovena na 45 µg/ml.

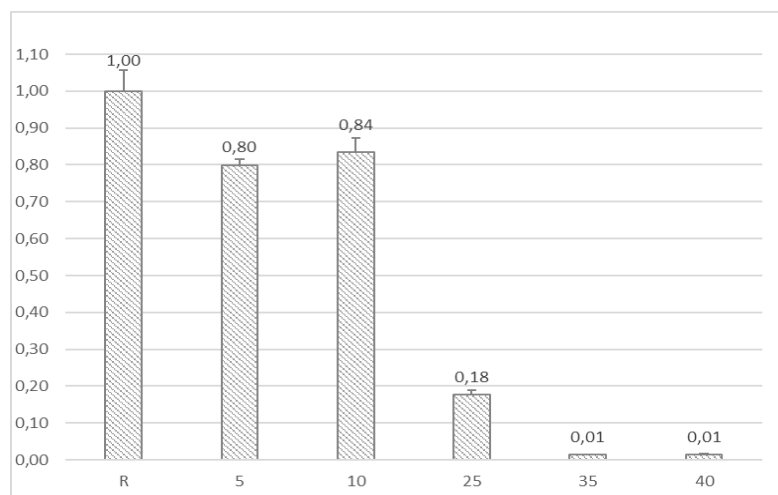


Obr. 47 – Souhrnný graf výsledků MTT pro vzorek AuDAC_C₁

Vzorek AuDAAL_A₂

Obr. 48, na následující str. 87, ukazuje závislost životaschopnosti buněk vzhledem ke koncentraci vzorku AuDAAL_A₂. Z výsledných dat můžeme říci, že vzorek AuDAAL_A₁ při koncentracích 5 a 10 µg/ml nevykazoval cytotoxicitu. Ovšem zbylé koncentrace (25, 35 a 40 µg/ml) už vykazovaly velmi vysokou buněčnou toxicitu.

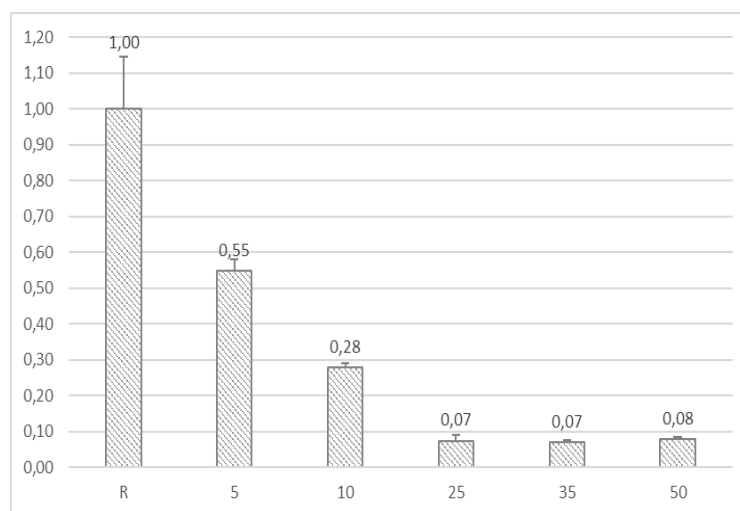
Je ale třeba poznamenat, že u tohoto vzorku byla před odsáváním rozpouštědla DMSO sledována pomocí mikroskopického stanovení vyšší viabilita buněk u koncentrace 25 µg/ml, nežli vyhodnotil test MTT. To může znamenat, že nanočástice vzorku AuDAAL_A₂ snížily schopnost adheze buněk k mikrotitrační destičce a při odsávání rozpouštědla byly buňky taktéž odděleny. Pro tento vzorek byla následně stanovena hodnota IC₅₀ na koncentraci 18 µg/ml.



Obr. 48 – Souhrnný graf výsledků MTT pro vzorek AuDAAL_A2

Vzorek AuDADXA_A2

Předposlední vzorek byl vzorek AuDADXA_A2. Obr. 49 demonstruje závislost životaschopnosti buněk na koncentraci AuDADXA_A2.

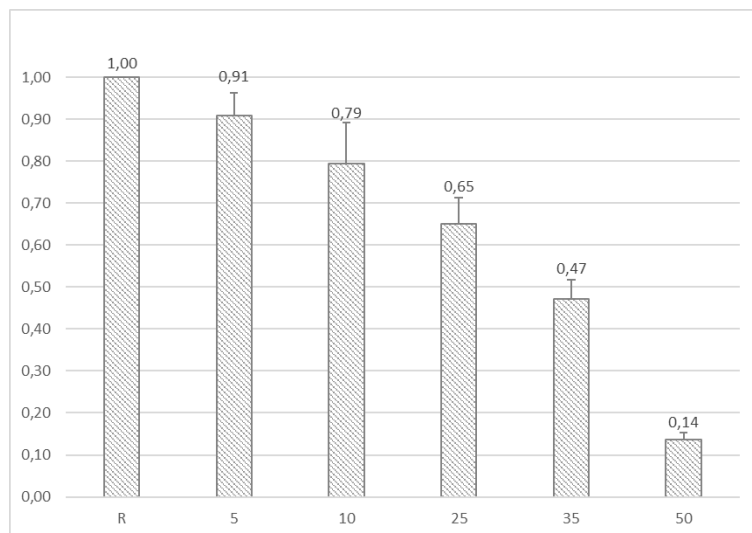


Obr. 49 - Souhrnný graf výsledků MTT pro vzorek AuDADXA_A2

U vzorku AuDADXA_A2 byla sledována nejvyšší cytotoxicita, kdy už i nejnižší koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ způsobila 45 % mortalitu buněk oproti referenci. Vzhledem k velikosti nanočástic stabilizovaných pomocí DADXA, jež se pohybuje v řádech jednotek nm, byly tyto závěry předvídatelné, jelikož takto malé zlaté nanočástice byly v různých studiích také vysoce cytotoxické, jak bylo shrnuto v teoretické části. Naše výsledky potvrzují tento trend. Hodnota IC_{50} byla tedy stanovena na koncentraci pouhých 5 $\mu\text{g/ml}$.

Vzorek AuDAH_B₂

Posledním testovaným vzorkem byl AuDAH_B₂. Závislost životaschopnosti buněk v závislosti na koncentraci AuDAH_B₂ je zobrazen na Obr. 50.



Obr. 50 - Souhrnný graf výsledků MTT pro vzorek AuDAH_B₂

U vzorku AuDAH_B₂ byly výsledky spíše pozitivní. Koncentrace 5 a 10 µg/ml nanočástic nevykazovaly toxicitu. Hůře buňky prosperovaly při koncentracích vyšších, avšak opět byl vzorek pozorován před odsátím rozpouštědla a při koncentraci 25 µg/ml byla pozorována viabilita buněk srovnatelná s předcházejícími koncentrace 5 a 10 µg/ml. U takto nízkých koncentrací byla dokonce opět sledována pomocí optického mikroskopu viabilita znatelně vyšší oproti referenci. To opět nasvědčuje, že nanočástice vzorku AuDAH_B₂ pomohly ke ztrátě adheze některých buněk a jejich případnému odsátí s médiem.

Naopak schopnost vzorku AuDAH_B₂ podporovat buňky k proliferaci při nižších koncentracích byla očekávána, vzhledem k tomu, že hyaluronát sodný jako takový je nápomocný v procesu tvorby nových buněk. Této vlastnosti by mohlo být využito například při porušení tkáně k urychlení a podpoření tvorby nové, zdravé tkáně. Hodnota IC₅₀ byla stanovena na koncentraci 33 µg/ml.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnovala charakterizaci koloidních roztoků zlatých nanočástic syntetizovaných za pomoci regioselektivně oxidované celulózy, alginátu sodného, dextranu a hyaluronátu sodného. V průběhu práce byl úspěšně zformulován optimalizovaný purifikační proces AuDAX s přihlédnutím na efektivitu čištění a ztrátám AuDAX. V závěrečné části práce byl sledován vliv AuDAX na viabilitu buněk, přičemž byla stanovena cytotoxicita vzorků.

AuDAC tvořily především nanočástice s hydrodynamickým průměrem kolem 10-30 nm dle DLS. Tyto koloidní roztoky byly paucidisperzí povahy, přičemž jejich index polydisperzity byl nižší než 0,3. SPR efekt nabýval maxima při vlnových délkách v intervalu 520-530 nm, což odpovídá i jejich velikosti. TEM analýza zobrazila AuDAC jako částice typicky kulovitého charakteru, tedy nedocházelo k abnormalitám v morfologii. Při studiu stability byly AuDAC stabilní, což potvrdila studie stability v roztoku DMF, a to i přes nízký naměřený zeta potenciál, jehož absolutní hodnota se v závislosti na použitém materiálu pohybovala v řádu jednotek mV. Roztoky AuDAC se nejevily jako cytotoxické v koncentracích 5-25 $\mu\text{g/ml}$ a jejich hodnota IC_{50} byla stanovena na hodnotu 45 $\mu\text{g/ml}$.

AuDAAL tvořily nanočástice o velikosti kolem 40-50 nm (dle DLS), přičemž hodnota indexu polydisperzity roztoků byla taktéž nižší než 0,3. Maximalní SPR efekt nanočástic byl sledován při 538 nm a částice měly spíše kulovitý tvar, avšak některé byly lehce hranaté (polyedrické). AuDAAL byly stabilní ve vodě i v roztoku DMF při teplotě 40 °C po dobu 24 h. Naměřený zeta potenciál byl stanoven na hodnotu -12,6 mV, která prokazuje stabilitu nanočástic a je způsobena negativně nabitým charakterem alginátu. Cytotoxicita byla prokázána u koncentrací vyšších 10 $\mu\text{g/ml}$, což ale nejspíše bylo způsobeno odsátím buněk od substrátu v důsledku možného poškození jejich adheze, jelikož obecně nanočástice větších velikostí jsou méně toxické nežli nanočástice o velikosti několika nm. Tento trend bohužel nebyl potvrzen. Hodnota IC_{50} byla následně stanovena pro koncentraci 18 $\mu\text{g/ml}$.

AuDAH tvořil klasické nanočástice o velikosti kolem 20 nm u materiálu DAH_B, avšak u materiálu DAH_A, který byl méně oxidován, se projevila jeho povaha coby heteroglukanu, a proto vznikl velmi polydisperzní koloidní systém, v němž se nacházely nanočástice o velikosti vyšších desítek nanometrů ale také „nanosemínka“ (nanoseeds) o velikosti nižších jednotek nanometrů. Pro tento vzorek byl SPR efekt velmi slabý, a nacházel se v oblasti pod 300 nm.

„Nanosemínka“, jež vzhledem k jejich nízké stabilitě tvořily přirozeně „nanočásticová mračna“, tedy clustery malých nanočástic vzájemně zřejmě propojených svými obaly, byla následně pozorována na snímcích TEM a taktéž byly v roztoku sledovány i větší nanočástice, které disponovaly různou morfologií. Vyskytovaly se zde nanočástice tyčinkové, trojúhelníkové, destičky i běžného kulovitěho tvaru. AuDAH částice byly v roztoku stabilní, a to i při testu v DMF a změně teploty na 40 °C a zeta potenciál byl stanoven na -22,1 mV. Cytotoxicita byla stanovena na vzorku AuDAH_B, který nevykazoval abnormality a hranice cytotoxicity byla stanovena na 10 µg/ml. Při koncentracích vyšších byla sledována mortalita vyšší než 30 %. IC₅₀ byla vyhodnocena na 33 µg/ml.

Posledním materiálem, jímž se zabývala tato práce, byl DADXA. AuDADXA tvořily menší nanočástice pod 20 nm dle DLS a index polydisperzity byl nižší než 0,3. Prakticky vykazoval obdobné chování jako AuDAC, ovšem vzhledem k výsledkům analýzy byla potvrzena větší úspěšnost vyčištění od DADXA oproti ostatním vzorkům. Maximum SPR efektu vykazoval AuDADXA při 520 nm, což potvrzuje menší rozměry nanočástic, což potvrdily i snímky TEM. Zeta potenciál přečištěného vzorku činil -1,7 mV. Stabilitu potvrdil i test přidání roztoku DMF a změny teploty roztoku na 40 °C, kdy nanočástice zůstaly rovnoměrně dispergovány v roztoku a nevykazovaly agregaci. Taktéž byla u roztoku AuDADXA potvrzena výše vyřčená teze ohledně cytotoxicity a velikosti částic, jelikož nanočástice byly vysoce cytotoxické, tedy AuDADXA se projevil jako vysoce cytotoxické pro buňky již při 5 µg/ml.

Závěrem lze říci, že se zdařilo připravit koloidní roztoky zlatých nanočástic připravených pomocí čtyř regioselektivně oxidovaných polysacharidů, které byly úspěšně purifikovány. Vzniklé roztoky tak mají velký potenciál pro budoucí biomedicínské aplikace vzhledem k volným aldehydovým skupinám, specifickým pro stabilizační vrstvu nanočástic, které otevírají možnosti sekundárního vázání látek. Díky tomu se takto připravené roztoky jeví jako možná budoucí varianta pro terapii, diagnostiku a zobrazování závažných onemocnění nebo při aplikacích v rámci TIRM, čemuž se bude věnovat budoucí výzkum.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] JEEVANANDAM, Jaison, Ahmed BARHOUM, Yen S CHAN, Alain DUFRESNE a Michael K DANQUAH. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology* [online]. 2018, roč. 9, s. 1050–1074. Získáno z: doi:10.3762/bjnano.9.98
- [2] KUMARI, Savita a Leena SARKAR. A review on nanoparticles: Structure, classification, Synthesis & Applications. *JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH* [online]. 2021, roč. 65, č. 08, s. 42–46. Získáno z: doi:10.37398/jsr.2021.650809
- [3] HOŠEK, Jan. *Úvod do nanotechnologie*. V Praze: České vysoké učení technické, 2010. ISBN 978-80-01-04555-8.
- [4] SÁNCHEZ, Samuel a Martin PUMERA. Nanorobots: The ultimate wireless self-propelled sensing and actuating devices. *Chemistry – An Asian Journal* [online]. 2009, roč. 4, č. 9, s. 1402–1410. Získáno z: doi:10.1002/asia.200900143
- [5] ŘEZANKA, Pavel. Nanočástice – nanočástice I. Nanočástice I – Nanočástice – KSICHT [online]. Získáno z: <https://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/nanocastice/1>
- [6] NORTON, S. A Brief History of Potable Gold. *Molecular Interventions* [online]. 2008, 2008-06-01, 8(3), 120-123 [cit. 2023-09-27]. ISSN 1534-0384. Dostupné z: doi:10.1124/mi.8.3.1
- [7] PLESKAČ, Matěj. Historie a současnost Nanotechnologie. *Nanoprotech* [online]. 22. březen 2016 [vid. 15. květen 2024]. Získáno z: <https://www.nanoprotech.cz/historie-a-soucasnost-nanotechnologie/>
- [8] ZOOM, redakce Prima. Nanotechnologii Vymysleli Staří římané. uměli triky, které Dnes Nenapodobíme. *Prima Zoom RSS* [online]. 13. září 2013 [vid. 4. říjen 2023]. Získáno z: <https://zoom.iprima.cz/historie/nanotechnologii-vymysleli-stari-rimane-umeli-triky-ktere-dnes-nenapodobime>
- [9] BAYDA, Samer, Muhammad ADEEL, Tiziano TUCCINARDI, Marco CORDANI a Flavio RIZZOLIO. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* [online]. 2020, 25(1) [cit. 2023-09-18]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25010112
- [10] SACCÀ, Barbara a Christof M. NIEMEYER. DNA origami: The art of folding dna. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2011, roč. 51, č. 1, s. 58–66. Získáno z: doi:10.1002/anie.201105846
- [11] GADGE, Ankita N., Shailesh J. WADHER a Amol D. LANDGE. *Gold Nanoparticle* [online]. 2020. Získáno z: https://ijshr.com/IJSHR_Vol.5_Issue.2_April2020/IJSHR004.pdf
- [12] CHANDRAN, Parvathy R. a Reny Thankam THOMAS. Gold nanoparticles in Cancer Drug Delivery. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering* [online]. 2015, s. 221–237. Získáno z: doi:10.1016/b978-0-323-32889-0.00014-5
- [13] KVÍTEK, Ondřej; SLEPIČKA, Petr; LYUTAKOV, Oleksiy a ŠVORČÍK, Václav. Nanostruktury zlata: příprava, vlastnosti a vybrané aplikace. Online. *Chemické listy*. 2016, roč. 110, č. 12, s. 922-930. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/128/128>. [cit. 2023-09-24].
- [14] ZEIN, Randa, Wissam SHARROUF a Kim SELTING. Physical properties of nanoparticles that result in improved cancer targeting. *Journal of Oncology* [online]. 2020, roč. 2020, s. 1–16. Získáno z: doi:10.1155/2020/5194780
- [15] ANU MARY EALIA, S a M P SARAVANAKUMAR. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* [online]. 2017, roč. 263, s. 032019. Získáno z: doi:10.1088/1757-899x/263/3/032019
- [16] CHEESEMAN, Samuel, Andrew J. CHRISTOFFERSON, Rashad KARIUKI, Daniel COZZOLINO, Torben DAENEKE, Russell J. CRAWFORD, Vi Khanh TRUONG, James CHAPMAN a Aaron ELBOURNE. Antimicrobial metal nanomaterials: From passive to stimuli-activated applications. *Advanced Science* [online]. 2020, roč. 7, č. 10. Získáno z: doi:10.1002/advs.201902913
- [17] D’HOLLANDER, Antoine, Evelien MATHIEU, Hilde JANS, Greetje VANDE VELDE, Tim STAKENBORG, Uwe HIMMELREICH, Pol VAN DORPE a Liesbet LAGAE. Development of nanostars as a biocompatible tumor contrast agent: Toward in vivo SERS imaging. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2016, roč. Volume 11, s. 3703–3714. Získáno z: doi:10.2147/ijn.s91340

- [18] NOVÁK, Josef, Lidmila BARTOVSKÁ, Ivan CIBULKA, Vladimír DOHNAL, Pavel CHUCHVALEC, Jiří KOLAFKA, Anatol MALIJEVSKÝ, Jaroslav MATOUŠ, Karel ŘEHÁK, Petr SLAVÍČEK, Josef ŠOBR a Petr VOŇKA. FYZIKÁLNÍ chemie: Bakalářský a magisterský kurz. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008.
- [19] WANG, Wenjie, Xiaofan DING, Qing XU, Jing WANG, Lei WANG a Xinhui LOU. Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, roč. 148, s. 541–548. Získáno z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.09.021
- [20] CORNIER, Jean, Cornelia M. KECK a Marcel Van de VOORDE, ed. *Nanocosmetics: From ideas to products* [online]. 1. vyd. S.l., Switzerland: SPRINGER NATURE, 2020 [vid. 15. říjen 2023]. Získáno z: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16573-4>
- [21] MOHAN BHAGYARAJ, Sneha a Oluwatobi Samuel OLUWAFEMI. *Nanotechnology: The science of the invisible. Synthesis of Inorganic Nanomaterials* [online]. 2018, s. 7–8. Získáno z: doi:10.1016/b978-0-08-101975-7.00001-4
- [22] IOP. De Broglie wavelength. De Broglie wavelength | iopspark [online]. Získáno z: <https://spark.iop.org/de-broglie-wavelength>
- [23] KRÁLOVÁ, Magda. Tunelování. Tunelování | Eduportál Techmania [online]. 2007 [vid. 8. listopad 2023]. Získáno z: <https://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/kvanta/kvantove-mechanicky-model/tunelovani>
- [24] AUFFAN, Mélanie, Jérôme ROSE, Mark R. WIESNER a Jean-Yves BOTTERO. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution* [online]. 2009, roč. 157, č. 4, s. 1127–1133. Získáno z: doi: 10.1016/j.envpol.2008.10.002
- [25] AUSTIN, Lauren A., Megan A. MACKEY, Erik C. DREADEN a Mostafa A. EL-SAYED. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in bionanomedicine, therapy, and drug delivery. *Archives of Toxicology* [online]. 2014, roč. 88, č. 7, s. 1391–1417. Získáno z: doi:10.1007/s00204-014-1245-3
- [26] DŮBRAVOVÁ, Alžběta, Monika MUCHOVÁ, David ŠKODA, Lenka LOVECKÁ, Lucie ŠIMONÍKOVÁ, Ivo KUŘITKA, Jan VÍCHA a Lukáš MÜNSTER. Highly efficient affinity anchoring of gold nanoparticles on chitosan nanofibers via dialdehyde cellulose for reusable catalytic devices. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2024, roč. 323, s. 121435. Získáno z: doi:10.1016/j.carbpol.2023.121435
- [27] LEWINSKI, Nastassja, Vicki COLVIN a Rebekah DREZEK. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* [online]. 2008, roč. 4, č. 1, s. 34–36. Získáno z: doi:10.1002/sml.200700595
- [28] ÚZIS ČR. Cytotoxicita: NZIP. NZIP.cz [online]. [vid. 27. listopad 2023]. Získáno z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/4577>
- [29] SANI, A., C. CAO a D. CUI. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A Review. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. 2021, roč. 26, s. 100991. Získáno z: doi:10.1016/j.bbrep.2021.100991
- [30] GU, Xiao, Zhixiang XU, Lipeng GU, Huayu XU, Fengxia HAN, Bo CHEN a Xuejun PAN. Preparation and antibacterial properties of gold nanoparticles: A Review. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2020, roč. 19, č. 1, s. 167–187. Získáno z: doi:10.1007/s10311-020-01071-0
- [31] RAI, Akhilesh, Asmita PRABHUNE a Carole C. PERRY. Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2010, roč. 20, č. 32, s. 6789. Získáno z: doi:10.1039/c0jm00817f
- [32] MOHAMADY HUSSEIN, Mohamed A., F. Guillermo BAÑOS, Mariusz GRINHOLC, Ahmed S. ABO DENA, Ibrahim M. EL-SHERBINY a Mosaad MEGAHED. Exploring the physicochemical and antimicrobial properties of gold-chitosan hybrid nanoparticles composed of varying chitosan amounts. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, roč. 162, s. 1760–1769. Získáno z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.08.046
- [33] MADKHALI, Osama A. A comprehensive review on potential applications of metallic nanoparticles as antifungal therapies to combat human fungal diseases. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2023, roč. 31, č. 9, s. 101733. Získáno z: doi:10.1016/j.jsps.2023.101733
- [34] BABAEI, Abouzar, Seyed Mahmoud MOUSAVI, Marzie GHASEMI, Neda PIRBONYEH, Masoud SOLEIMANI a Afagh MOATTARI. Gold nanoparticles show potential in vitro antiviral and anticancer activity. *Life Sciences* [online]. 2021, roč. 284, s. 119652. Získáno z: doi:10.1016/j.lfs.2021.119652

- [35] VÁVROVÁ, Alžběta, Tereza ČAPKOVÁ, Ivo KUŘITKA, Jan VÍCHA a Lukáš MÜNSTER. One-step synthesis of gold nanoparticles for catalysis and SERS applications using selectively dicarboxylated cellulose and hyaluronate. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2022, roč. 206, s. 927–938. Získáno z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.043
- [36] DIEZ-PASCUAL, Ana María a Abbas RAHDAR. Functional nanomaterials in biomedicine: Current uses and potential applications. *ChemMedChem* [online]. 2022, roč. 17, č. 16. Získáno z: doi:10.1002/cmdc.202200142
- [37] ALI, Heyam Saad, Babiker M. EL-HAJ, Salim SAIFULLAH a Muhammad KAWISH. Gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications* [online]. 2020, s. 43–58. Získáno z: doi:10.1016/b978-0-12-816960-5.00004-5
- [38] VIAL, Stephanie, Rui L. REIS a J. Miguel OLIVEIRA. Recent advances using gold nanoparticles as a promising multimodal tool for Tissue Engineering and regenerative medicine. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2017, roč. 21, č. 2, s. 92–112 [vid. 1. leden 2024]. Získáno z: doi:10.1016/j.cossms.2016.03.006
- [39] ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka. Sacharidy. *Obecná biochemie* [online]. Pardubice, Česká republika: Univerzita Pardubice, 2020 [vid. 1. leden 2024], s. 47-60. Získáno z: <https://www.bookport.cz/AccountSaml/SignIn/?idp=https://shibboleth.utb.cz/idp/shibboleth&returnUrl=/kniha/obecna-biochemie-8029/>
- [40] CONTIPRO A.S. Jaký je rozdíl mezi kyselinou hyaluronovou a hyaluronátem sodným? - Contipro. 2023, Contipro a.s. [online]. Získáno z: <https://www.contipro.cz/ha-vs-sha>
- [41] CYPHERT, Jaime M., Carol S. TREMPUS a Stavros GARANTZIOTIS. Size matters: Molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. *International Journal of Cell Biology* [online]. 2015, roč. 2015, s. 1–8. Získáno z: doi:10.1155/2015/563818
- [42] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): A Review. *Veterinární medicína* [online]. 2008, roč. 53, č. 8, s. 397–411. Získáno z: doi: 10.17221/1930-vetmed
- [43] LATEČKA, Filip. *Vývoj metody pro řízení molekulové hmotnosti selektivně oxidovaných polysacharidů*. Vedoucí Vícha, Jan. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů, 2021. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/47323>.
- [44] AKBAR, Moazzama, Azka YAQOOB, Awais AHMAD a Rafael LUQUE. Sodium alginate: An overview. *Sodium Alginate-Based Nanomaterials for Wastewater Treatment* [online]. 2023, s. 1–17. Získáno z: doi:10.1016/b978-0-12-823551-5.00012-4
- [45] MUDALIGE, Thilak, Haiou QU, Desiree VAN HAUTE, Siyam M. ANSAR, Angel PAREDES a Taylor INGLE. Characterization of nanomaterials. *Nanomaterials for Food Applications* [online]. 2019, s. 313–353 [vid. 2019]. Získáno z: doi:10.1016/b978-0-12-814130-4.00011-7
- [46] CHICEA, Dan, Alexandra NICOLAE-MARANCIUC, Aleksandr S. DOROSHKEVICH, Liana Maria CHICEA a Osman Murat OZKENDIR. Comparative synthesis of silver nanoparticles: Evaluation of Chemical Reduction Procedures, AFM and DLS size analysis. *Materials* [online]. 2023, roč. 16, č. 15, s. 5244. Získáno z: doi:10.3390/ma16155244
- [47] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. Kapitola 6: Kinetické vlastnosti disperzních soustav. In: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Praha, Česká republika: VŠCHT Praha, 2005 [vid. 2005], s. 114. Získáno z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/114.html
- [48] KLOUDA, Pavel. 16.2 Základní vztahy. In: *Moderní analytické metody*. Ostrava, Česká republika: Pavel Klouda, 2003, s. 77–78.
- [49] C. MARTÍNEZ, J., N. A. CHEQUER, J. L. GONZÁLEZ a T. CORDOVA. Alternative methodology for gold nanoparticles diameter characterization using PCA technique and UV-vis spectrophotometry. *Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2013, roč. 2, č. 6, s. 184–189. Získáno z: doi:10.5923/j.nn.20120206.06
- [50] MUNI. Rentgen-Fluorescenční Spektrometrie (XRF) - informační systém. Rentgen-fluorescenční spektrometrie (XRF) [online]. [vid. 5. leden 2024]. Získáno z: https://is.muni.cz/el/sci/podzim2017/C6920/um/XRFLIBS_teorie.pdf
- [51] REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA. Encyklopedie Fyziky. Transmisní elektronový mikroskop.: MEF [online]. Získáno z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1681-transmisni-elektronovy-mikroskop>
- [52] Transmission electron microscope. *Encyclopædia Britannica* [online]. Získáno z: <https://www.britannica.com/facts/transmission-electron-microscope/#media/1/602949/110686>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – Demonstrace barevné změny jednoho z Lykurgových pohárů [8].....	13
Obr. 2 – a) víceřetězcový přístup, b) DNA-origami přístup založený na scaffoldu [10]	15
Obr. 3 – Modely vybraných typů nanočástic [vytvořeno v Canva.com].....	16
Obr. 4 – Jednoduché schéma Turkevičovy metody [vytvořeno v ChemDraw]	18
Obr. 5 - Srovnání velikostí jednotlivých objektů v nanometrech [vytvořeno v Canva.com]...	19
Obr. 6 – Vztah velikosti nanočástice k počtu atomových slupek, celkovému počtu atomů a atomů povrchových [8].....	20
Obr. 7 – Tvarová různorodost nanočástic [16]	21
Obr. 8 – Závislost úhlu dopadu na rychlosti internalizace tyčinkových nanočástic.....	22
Obr. 9 – Grafické znázornění Zeta potenciálu [20]	23
Obr. 10 – Funkční modifikace povrchu zlatých nanočástic pro biomedicínské aplikace [vytvořeno v Canva.com]	27
Obr. 11 – Biomedicínské aplikace zlatých nanočástic (AuNPs) [vytvořeno v Canva.com]....	37
Obr. 12 - Strukturní vzorce vybraných polysacharidů [vytvořeno v ChemDraw]	40
Obr. 13 - Obecný mechanismus selektivní oxidace monomerní jednotky pomocí periodátu NaIO ₄ [vytvořeno v ChemDraw].....	41
Obr. 14 - Struktury dialdehydických derivátů daných polysacharidů (DAC – dialdehyd celulózy; DAH – dialdehyd hyaluronátu sodného; DADXA – dialdehyd dextransu; DAAL – dialdehyd alginátu sodného) [vytvořeno v ChemDraw]	42
Obr. 15 - Vzorový mechanismus syntézy zlatých nanočástic (AuDAC) pomocí dialdehydu celulózy (DAC) [vytvořeno v ChemDraw]	43
Obr. 16 - Detail předpokládané struktury obalu nanočástic připravených pomocí DAC [vytvořeno v ChemDraw].....	43
Obr. 17 – Schéma principu UV-VIS spektroskopie [vytvořeno v Canva.com]	47
Obr. 18 – Schéma transmisní elektronové mikroskopie (TEM) [52]	48
Obr. 19 - Srovnání vlivu dialýzy na proces čištění AuDAC_A ₁ (plný průběh).....	57
Obr. 20 - Srovnání vlivu dialýzy na proces čištění AuDAC_A ₁ (detail oblasti specifické pro AuNPs).....	58

Obr. 21 - Srovnání naměřených absorpčních spekter pro odběr po 24 a 48 hodinách dialýzy	59
Obr. 22 – Graf naředění vzorku AuDAC_A1 v průběhu dialýzy po dobu 24 a 48 h.....	59
Obr. 23 – Snímky z TEM nepurifikovaného, čerstvého vzorku AuDAC_A1	60
Obr. 24 – Vzorek s označením AuDAC_A1 dialyzovaný po dobu 168 hodin	60
Obr. 25 - Srovnání vlivu ultrafiltrace na proces čištění AuDAC_A2 (plný průběh)	62
Obr. 26 - Srovnání vlivu ultrafiltrace na proces čištění AuDAC_A2	63
Obr. 27 - Srovnání naměřených absorpčních spekter pro nečištěný vzorek AuDAC_A2 a následně ultrafiltrováný skrze 300 kDa nástavec (plný průběh).....	64
Obr. 28 – Graf ztrát AuDAC_A2 v průběhu ultrafiltrace	64
Obr. 29 – Srovnání snímků z TEM vzorku AuDAC_A2 ultrafiltrováný za použití: a) 1 000 kDa a b) 300 kDa nástavce.....	65
Obr. 30 – Naměřená absorpční spektra nečištěného a čištěného vzorku AuDAC_B1	67
Obr. 31 – Graf nežádoucích efektů v procesu purifikace vzorku AuDAC_B1.....	68
Obr. 32 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrováného a čištěného vzorku AuDAAL_A1 (plný průběh)	70
Obr. 33 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrováného a čištěného vzorku AuDAAL_A1 (detail oblasti specifické pro AuNPs).....	71
Obr. 34 - Graf ztrát v procesu purifikace vzorku AuDAAL_A1	71
Obr. 35 - Srovnání snímků z TEM vzorku AuDAAL_A1: a) nepřečištěný a b) přečištěný	72
Obr. 36 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrováného a čištěného vzorku AuDADXA_A1 (plný průběh).....	73
Obr. 37 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrováného a čištěného vzorku AuDADXA_A1 (detail oblasti specifické pro AuNPs)	74
Obr. 38 - Graf ztrát v procesu purifikace vzorku AuDADXA_A1	75
Obr. 39 - Srovnání snímků z TEM vzorku AuDADXA_A1: a) nepřečištěný a b) přečištěný..	75
Obr. 40 – Výsledek ultrafiltrace vzorku AuDAH_A1 pomocí 1 000 kDa nástavce.....	77
Obr. 41 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrováného a čištěného vzorku AuDAH_A1 (plný průběh).....	78

Obr. 42 - Naměřená absorpční spektra nečištěného, ultrafiltrovaného a čištěného vzorku AuDAH_A1 (detail oblasti specifické pro AuNPs a DAH).....	79
Obr. 43 - Graf ztrát v procesu purifikace vzorku AuDAH_A1.....	79
Obr. 44 - Srovnání snímků z TEM vzorku AuDAH_A1: a) nepřečištěný a b) ultrafiltrovaný 1 000 kDa	80
Obr. 46 - Vzhled přečištěných vzorku: a) AuDAC_C1, b) AuDAAL_A2, c) AuDADXA_A2, d) AuDAH_B2	83
Obr. 45 – Vzhled přečištěných vzorků po přidání přebytku DMF a temperaci na 40 °C po dobu 24 h: a) AuDAC_C1, b) AuDAAL_A2, c) AuDADXA_A2, d) AuDAH_B2	83
Obr. 47 – Souhrnný graf výsledků MTT pro vzorek AuDAC_C1.....	85
Obr. 48 – Souhrnný graf výsledků MTT pro vzorek AuDAAL_A2.....	86
Obr. 49 - Souhrnný graf výsledků MTT pro vzorek AuDADXA_A2.....	86
Obr. 50 - Souhrnný graf výsledků MTT pro vzorek AuDAH_B2.....	87

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ ZKRATEK

%	Procento
°C	Stupeň Celsia
<i>A</i>	Absorbance
AFM	Mikroskop atomárních sil
<i>A_{MAX}</i>	Hodnota maximální absorbance
AuDAAL_A ₁	První vzorek ze série vzorků připravených pomocí DAAL_A
AuDAAL_A ₂	Druhý vzorek ze série vzorků připravených pomocí DAAL_A
AuDAC_A ₁	První vzorek ze série vzorků připravených pomocí DAC_A
AuDAC_A ₂	Druhý vzorek ze série vzorků připravených pomocí DAC_A
AuDAC_B ₁	První vzorek ze série vzorků připravených pomocí DAH_B
AuDAC_C ₁	První vzorek ze série vzorků připravených pomocí DAC_C
AuDADXA_A ₁	První vzorek ze série vzorků připravených pomocí DADXA_A
AuDADXA_A ₂	Druhý vzorek ze série vzorků připravených pomocí DADXA_A
AuDAH_A ₁	První vzorek ze série vzorků připravených pomocí DAH_A
AuDAH_B ₁	První vzorek ze série vzorků připravených pomocí DAH_B
AuDAH_B ₂	Druhý vzorek ze série vzorků připravených pomocí DAH_B
AuNPs	Zlaté nanočástice
BSA	Albumin z krve skotu
<i>c</i>	Látková koncentrace
CellTiter 96	Kolorimetrický test pro přímé sledování viability a proliferace buněk
CML(K562)	Buňky leukemické – chronické myeloidní leukemie
-COOH	Karboxylové skupiny
COS-7 a COS-1	Buňky ledvin opice <i>Cercopithecus aethiops</i>
Coumarin-PEG-thiol	Thiolovaná molekula coumarinů s polyethylenglykolem
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromid
<i>d</i>	Hydrodynamický průměr nanočástic
Da	Dalton
DAAL	Dialdehyd alginátu sodného

DAAL_A	Pracovní materiál dialdehydu alginátu sodného s označením A
DAC	Dialdehyd celulózy
DAC_A	Pracovní materiál dialdehydu celulózy s označením A
DAC_B	Pracovní materiál dialdehydu celulózy s označením B
DAC_C	Pracovní materiál dialdehydu celulózy s označením C
DADXA	Dialdehyd dextransu
DADXA_A	Pracovní materiál dialdehydu dextransu s označením A
DAH	Dialdehyd hyaluronátu sodného
DAH_A	Pracovní materiál dialdehydu hyaluronátu sodného s označením A
DAH_B	Pracovní materiál dialdehydu hyaluronátu sodného s označením B
DAX	Dialdehyd X polysacharidu
D_i	Difúzní koeficient
DLS	Dynamický rozptyl světla
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECM	Extracelulární matrix
eV	Elektronvolt
FIFTC	Fluorescein isothyiocyanát
g	Gram
GSH	Glutathion
h	Hodina
h	Tloušťka nanovrstvy atomů
HA	Hyaluronát sodný
HeLa	Karcinomové buňky z nádoru děložního čípku
HepG2	Hepatocelulární karcinomové buňky
IC ₅₀	Poloviční maximální inhibiční koncentrace
IPD	Polymerační stupeň makromolekul
k_B	Boltzmannova konstanta

<i>l</i>	Litr
<i>l</i>	Tloušťka látky, jež prochází vzorek
LDH	Test na laktát dehydrogenázu
<i>m</i>	Metr
M	<i>mol/l</i>
MDA-MB-231	Karcinomové buňky prsu
MFS	Mononukleární fagocytární systém
mPEG-thiol	Thiolovaný monomethylenglykol
MTT	Test cytotoxicity vzorku
M_w	Hmotnostní střed molárních hmotností polymeru
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NIH/3T3	Myší fibroblasty
NP ⁻	Záporně nabitá nanočástice
NP ⁺	Kladně nabitá nanočástice
NP ⁰	Neutrální nanočástice
PAL	Povrchově aktivní látky
<i>PDI</i>	Index polydisperzity
PEI2	Polyethylimin s nízkou molekulovou hmotností
PES	Polyethersulfon
pH	Záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkového koeficientu
PLL	Poly-L-lysin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
<i>r</i>	Poloměr částic
RAW264.7	Myší makrofágy
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní forma kyslíku
<i>S</i>	Siemens
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SERS	Povrchově zesílený Ramanův rozptyl/Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie

SPR	Povrchová plazmonová rezonance
STM	Skenovací tunelový mikroskop
t	Čas
T	Termodynamická teplota
t_{DLA}	Doba trvání dialýzy
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TIRM	Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína
$T_m(\infty)$	Teplota tání objemového materiálu
$T_m(r)$	Teplota tání nanočástice
Trypan blue	Test k hodnocení životaschopnosti buněk na základě modrého barvení neživých buněk při poškození biomembrány
UPW	Ultra-power water – ultračistá voda
UV	Ultrafialová
UV-VIS	UV-VIS spektroskopie
V	Volt
XRF	Rentgenová fluorescenční spektroskopie
ZP	Zeta potenciál
α	Nastavitelný parametr určený z experimentálních dat
ε	Molární absorpční koeficient
ζ	Zeta potenciál
λ_{MAX}	Vlnová délka specifická pro maximum absorbance
σ_θ	Procentuální odchylka hydrodynamického průměru nanočástic
$\sigma_{\theta\zeta}$	Průměrná odchylka zeta potenciálu
Φ	Světelný tok záření prošlého měřeným vzorkem
Φ_0	Světelný tok záření dopadajícího na vzorek

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 - Historické milníky v oboru nanotechnologií po roce 1900 [9].....	14
Tab. 2 – Cytotoxicita zlatých nanočástic (testování in vitro) [27]	29
Tab. 3 - Cytotoxicita zlatých nanočástic (testování in vivo) [29]	32
Tab. 4 – Srovnání parametrů přípravy vzorků zlatých nanočástic (AuDAX).....	53
Tab. 5 – Průměrné hodnoty naměřených dat pro vzorek AuDAC_A1 nečištěný a dialyzovaný po dobu 24, 48, 72, 144 a 168 hodin	55
Tab. 6 – Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity vzorových DAX	56
Tab. 7 – Přehled hodnot maxim absorpance A_{MAX} a jejich specifických vlnových délek λ_{MAX} v závislosti na době dialýzy pro purifikaci vzorku AuDAC_A1	58
Tab. 8 – Průměrné hodnoty naměřených dat pro vzorek AuDAC_A2 nečištěný a ultrafiltrovaný pomocí ultrafiltračních nástavců 1 000, 300 a 100 kDa.....	61
Tab. 9 - Přehled hodnot maxim absorpance A_{MAX} a jejich specifických vlnových délek λ_{MAX} v závislosti na době dialýzy pro purifikaci vzorku AuDAC_A1	63
Tab. 10 – Vyhodnocení dat DLS analýzy procesu čištění na vzorek AuDAC_B1.....	66
Tab. 11 – Shrnutí výsledků UV-VIS analýzy AuDAX_B1	67
Tab. 12 – Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity vzorku AuDAAL_A1	69
Tab. 13 – Shrnutí výsledků UV-VIS analýzy AuDAAL_A1.....	70
Tab. 14 - Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity vzorku AuDADXA_A1.....	73
Tab. 15 - Shrnutí výsledků UV-VIS analýzy AuDADXA_A1	74
Tab. 16 - Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity vzorku AuDAH_A1	76
Tab. 17 - Shrnutí výsledků UV-VIS analýzy AuDAH_A1.....	79
Tab. 18 – Výstupní data zeta potenciálu a jejich průměrná odchylka pro vybrané vzorky AuDAX.....	81
Tab. 19 – Hodnoty potřebné k provedení testu cytotoxicity	84