



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

# FUNKCIONALIZACE ZLATÝCH NANOČÁSTIC PRO ZOBRAZOVÁNÍ

FUNCTIONALIZATION OF GOLD NANOPARTICLES FOR IMAGING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JANA JAKUBECHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. JANA DRBOHLAVOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor  
**Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

**Studentka:** Bc. Jana Jakubechová

**ID:** 137238

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2014/2015

## NÁZEV TÉMATU:

**Funkcionalizace zlatých nanočástic pro zobrazování**

## POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Provedte literární rešerši v oboru využití zlatých nanočástic v senzorce (biosenzorce). Seznamte se s metodami jejich přípravy a zejména funkcionalizace pro zajištění biokompatibility a využití při zobrazování (in vitro, in vivo). Dále zjistěte, jaké metody se využívají pro charakterizaci cytotoxicity a fyzikálních a chemických vlastností těchto nanočástic. 2) Navrhněte vlastní protokol přípravy včetně funkcionalizace jejich povrchu vybranými molekulami. 3) Provedte syntézu a funkcionalizaci povrchu nanočástic v laboratoři v dostatečném množství. 4) Poté zjistěte základní fyzikální a chemické vlastnosti funkcionalizovaných zlatých nanočástic včetně jejich cytotoxicity. 5) Ze získaných výsledků odvoďte, zda jsou připravené zlaté nanočástice vhodné pro imaging. V případě potřeby navrhněte optimalizaci protokolu přípravy a funkcionalizace. Výsledky porovnejte s relevantními publikacemi.

## DOPORUČENÁ LITERATURA:

- 1) CAO, J.; et al.: „Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review“, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, 2014, roč. 195, s. 332-351. ISSN: 0925-4005.
- 2) LIU, H.; ZHAN, F.; LIU, F. et al.: „Visual and sensitive detection of viable pathogenic bacteria by sensing of RNA markers in gold nanoparticles based paper platform“, BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, 2014, roč. 62, s. 38-46. ISSN: 0956-5663.

**Termín zadání:** 9.2.2015

**Termín odevzdání:** 22.5.2015

**Vedoucí práce:** Ing. Jana Drbohlavová, Ph.D.

**Konzultanti diplomové práce:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*Předseda oborové rady*

**UPOZORNĚNÍ:**

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

## **Abstrakt**

Diplomová práca sa zaoberá syntézou zlatých nanočastíc s následnou funkcionalizáciou povrchu tak, aby boli vhodné pre *in vitro* zobrazovanie. Z tohto hľadiska musia zlaté nanočastice vykazovať výhodné optické vlastnosti, vysokú stabilitu, monodisperzitu a hlavne by nemali javiť známky cytotoxicity. K dosiahnutiu stanovených požiadavok bola prevedená syntéza sférických zlatých nanočastíc na základe Turkevichovej metódy a modifikácia povrchu pomocou glutatiónu a polyetylén glykolu. K charakterizácii nanočastíc boli využité analýzy ako SEM, DLS, UV-VIS a Zeta potenciál. Výsledné nanočastice boli podrobené testu toxicity s využitím MTT na bunkovej kultúre HEK 293.

## **Abstract**

The diploma thesis deals with synthesis of gold nanoparticles and their surface functionalization suitable for *in vitro* imaging. In this view there are requirements for optical properties such as stability, monodispersity and no presence of cytotoxicity. In order to fulfill these demands the synthesis by Turkevich method with surface modification by glutathione and polyethylenglycol was performed. Analytical methods such as DLS, SEM and Zeta potential measurement were utilized to characterize the physical and chemical properties of synthesized gold nanoparticles. Finally, MTT assay was performed to evaluate toxicity of gold nanoparticles using HEK 293 cell line.

## **Kľúčové slová**

Zlaté nanočastice, Syntéza, Funkcionalizácia, Cytotoxicita, Zobrazovanie.

## **Keywords**

Gold nanoparticles, Synthesis, Functionalization, Cytotoxicity, Imaging.

## **Bibliografická citácia diela**

JAKUBECHOVÁ, J. *Funkcionalizace zlatých nanočástic pro zobrazování*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Ústav biomedicínského inženýrství, 2013. 74 s., Vedoucí práce: Ing. Jana Drbohlavová, Ph.D.

## Prehlásenie

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu na tému Funkcionalizace zlatých nanočástic pro zobrazování som vypracovala samostatne pod vedením vedúcej diplomovej práce s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autorka uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto práce som neporušila autorské práva tretích osôb, hlavne som nezasiahla nedovoleným spôsobom do cudzích autorských, či osobnostných práv a som si plne vedomá následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúcich autorského zákona č. 121/2000 Sb., vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákonníka č. 40/2009Sb.

V Brne dňa 22.5. 2015

.....

(podpis autora)

## Pod'akovanie

Ďakujem vedúcej diplomovej práce Ing. Jane Drbohlavovej, Ph.D. za odborný dohľad, vecné pripomienky a cenné rady pri spracovaní práce, taktiež za jej čas a ochotu pomôcť s akýmkoľvek problémom. Ďalej by som rada poďakovala celému tímu LabSensNano a všetkým, ktorí ma akýmkoľvek spôsobom podporili pri písaní tejto práce.

V Brne dňa 22.5. 2015

.....

(podpis autora)

Výzkum popsáný v této diplomové práci byl realizován v laboratořích podpořených z projektu SIX; registrační číslo CZ.1.05/2.1.00/03.0072, operační program Výzkum a vývoj pro inovace.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Súčasný stav riešenej problematiky</b>	<b>12</b>
2.1	Zlaté nanočastice a ich vlastnosti .....	12
2.1.1	Stabilita zlatých nanočastíc .....	12
2.1.2	Optické vlastnosti zlatých nanočastíc .....	13
2.2	Metódy prípravy zlatých nanočastíc .....	14
2.2.1	Turkevichova metóda .....	15
2.2.2	Brustova metóda .....	16
2.2.3	Martinova metóda .....	16
2.2.4	Zelená syntéza .....	17
2.3	Funkcionalizácia zlatých nanočastíc .....	18
2.3.1	Glutatión .....	20
2.3.2	Polyetylén glykol .....	21
2.3.3	Dendriméry .....	22
2.3.4	Bielkoviny/ aminokyseliny .....	23
2.3.1	Protilátky .....	23
2.3.2	Lipidy .....	24
2.4	Techniky slúžiace k zobrazovaniu pomocou AuNPs .....	25
2.4.1	Výpočtová tomografia .....	25
2.4.2	Fotoakustické zobrazovanie .....	26
2.4.3	Pozitrónová emisná tomografia .....	27
2.4.4	Jednofotónová emisná výpočtová tomografia .....	27
2.5	Cytotoxicita AuNPs .....	28
2.5.1	Prienik zlatých nanočastíc do bunky .....	29
2.5.2	Účinok reakčných činidiel na cytotoxicitu .....	30
2.5.3	Cytotoxicita <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i> .....	31
2.6	Metódy merania cytotoxicity .....	32

2.6.1	Kolorimetrické testy .....	32
	MTT test .....	33
	LDH test.....	34
	Test založený na ATP.....	34
2.6.2	Mikroskopické metódy pre hodnotenie toxicity.....	34
2.7	Metódy charakterizácie zlatých nanočastíc .....	37
2.7.1	Rastrovacia elektrónová mikroskopia .....	37
2.7.2	Transmisná elektrónová mikroskopia.....	38
2.7.3	Energeticky disperzná röntgenová spektroskopia .....	39
2.7.4	Absorpčná spektroskopia v ultrafialovej a viditeľnej oblasti .....	39
2.7.5	Dynamický rozptyl svetla .....	40
2.7.6	Zeta potenciál .....	40
<b>3</b>	<b>Experimentálna časť</b>	<b>42</b>
3.1	Chemikálie .....	42
3.2	Použité prístroje .....	43
3.3	Syntézy zlatých nanočastíc .....	43
3.3.1	Modifikácia syntetizovaných zlatých nanočastíc .....	44
3.4	Metódy charakterizácie zlatých nanočastíc .....	45
3.4.1	Analýza pomocou rastrovacej elektrónovej mikroskopie.....	45
3.4.2	Dynamický rozptyl svetla a meranie Zeta potenciálu .....	45
3.4.3	Spektroskopia vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti .....	45
3.5	Cytotoxicita syntetizovaných AuNPs.....	45
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskusia</b>	<b>47</b>
4.1	Stabilita AuNPs.....	47
4.2	Analýza AuNPs pomocou rastrovacej elektrónovej mikroskopie .....	48
4.3	Analýza AuNPs pomocou dynamického rozptylu svetla .....	51
4.3.1	Zhodnotenie výsledkov DLS a SEM analýzy .....	58
4.4	Zeta potenciál.....	59
4.5	Absorpčná spektroskopia vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti .....	59

4.6	Cytotoxicita.....	60
<b>5</b>	<b>Záver</b>	<b>62</b>
	<b>Zoznam skratiek</b>	<b>64</b>
	<b>Zoznam literatúry</b>	<b>66</b>

# Zoznam obrázkov

<i>Obr.1 Ukážka rôznych veľkostí sférických AuNPs v koloidnej forme. Nanočastice s priemerom 2 nm sú príliš malé na to aby rozptyľovali svetlo, preto je roztok číry [3].</i>	12
<i>Obr. 2 Schematické znázornenie javu SPR [7].</i>	13
<i>Obr. 3 Zhlukovanie zlatých nanočastíc funkcionalizovaných glutatiómom v dôsledku tvorby vodíkových mostíkov [18].</i>	15
<i>Obr. 4 Racionálny vzorec TOAB (vľavo) a CTAB (vpravo) [22,23]</i>	16
<i>Obr. 5 TEM snímok internalizácie zlatých nanočastíc (čierne bodky) pripravených pomocou zelenej syntézy do nádorovej bunky MCF-7[26].</i>	18
<i>Obr. 6 Ukážka nožnej funkcionalizácie a potenciálne aplikácie AuNPs s rôznymi makromolekulami ako tioalkylovaná DNA a RNA, proteíny, peptidy, karboxylové kyseliny, poly(amidoamin) dendriméry [34].</i>	19
<i>Obr. 7 AuNP funkcionalizovaná reťazcami kyseliny merkaptononánovej. Tiolová skupina sa viaže na AuNP a karboxylová skupina sa orientuje do priestoru [34].</i>	20
<i>Obr. 8 Štruktúra glutatiómu (<math>\gamma</math>-L-Glutamyl-L-cysteínglycín)[37].</i>	20
<i>Obr. 9 Fluorescenčné snímky tumoru myši, zachytené 1 min (a), 30 min (b), 2 h (c) po intravenóznom podaní PEG-AuNPs-Pc4. (d) po intravenóznom podaní samostatného liečiva Pc4, ktoré nie je detekovateľné ani po 2 h [42].</i>	21
<i>Obr. 10 Dendriméry obalujúce zlaté nanočastice [44].</i>	22
<i>Obr. 11 AuNPs funkcionalizované monoklonálnymi-anti-tau-protilátkami slúžiace k detekcii tau proteínov zodpovedných za Alzheimerovu chorobu [47].</i>	24
<i>Obr. 12 CT snímky hepatómu potkana (označeného šípkou) pred intravenóznym podaním PEG-AuNPs (a) a 1 hodinu po intravenóznom podaní PEG-AuNPs (c) [48].</i>	26
<i>Obr. 13 Snímka SPECT a fluorescenčná snímka nádoru myši zobrazeného pomocou AuNPs s glutatiómom značených rádionuklidom <math>^{198}\text{Au}</math> [57].</i>	28
<i>Obr. 14 Tvorba reaktívnych foriem kyslíka pri prestupe zlatých nanočastíc do bunky, spôsobujúcich nekrózu a tým toxicitu buniek.</i>	29
<i>Obr. 15 Ukážka prestupu nanočastíc cez plazmatickú membránu pomocou fagocytózy, pinocytózy a receptorovo sprostredkovanvej endocytózy [63].</i>	30
<i>Obr. 16 Princíp MTT, WST-8 a ATP testu [67].</i>	33
<i>Obr. 17 Štruktúrny vzorec MTT a formazánu [68].</i>	33
<i>Obr. 18 SEM snímka chitozánom obalovaných AuNPs. Nanočastice sa zobrazujú svetlejšie a pozadie tmavšie v dôsledku nízkej energie a rýchlosti sekundárnych elektrónov [80].</i>	37
<i>Obr. 19 TEM snímka zlatých nanočastíc (v krúžku) vo vnútri bunkovej línie HeLa [82].</i>	38
<i>Obr. 20 Absorpčné spektrá zlatých nanočastíc s typickým absorpčným maximom pri 525–555 nm. [86].</i>	40
<i>Obr. 21 Vznik Zeta potenciálu.[90]</i>	41
<i>Obr. 22 Bunková línia HEK 293 zachytená pomocou optického mikroskopu použitá pri meraní</i>	

<i>cytotoxicity [95]</i> .....	46
<i>Obr. 23 SEM snímky zlatých nanočastíc vzorky A1 bez modifikácie GSH pri zväčšení 300 kx (vľavo) a 500 kx (vpravo).</i> .....	48
<i>Obr. 24 SEM snímky zlatých nanočastíc vzorky A2 bez modifikácie GSH pri zväčšení 500 kx (vľavo) a 300 kx (vpravo).</i> .....	49
<i>Obr. 25 SEM snímky zlatých nanočastíc modifikovaných pomocou GSH: vzorka A1 vľavo a A2 vpravo pri zväčšení 500 kx.</i> .....	49
<i>Obr. 26 SEM snímky PEG modifikovaných zlatých nanočastíc vzorky B pri zväčšení 300 kx (vľavo) a 450 kx (vpravo).</i> .....	50
<i>Obr. 27 SEM snímka zlatých nanočastíc vzorky C pri zväčšení 300 kx.</i> .....	51
<i>Obr. 28 DLS analýza veľkosti nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky A1 bez povrchovej modifikácie.</i> .....	52
<i>Obr. 29 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke A1 bez povrchovej modifikácie.</i> .....	52
<i>Obr. 30 DLS analýza veľkosti nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky A2 bez povrchovej modifikácie.</i> .....	53
<i>Obr. 31 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke A2 bez povrchovej modifikácie.</i> .....	53
<i>Obr. 32 DLS analýza veľkosti nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky A1 s GSH.</i> .....	54
<i>Obr. 33 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke A1 s modifikáciou GSH.</i> .....	54
<i>Obr. 34 DLS analýza veľkosti nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky A2 s GSH.</i> .....	55
<i>Obr. 35 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke A2 s modifikáciou GSH.</i> .....	55
<i>Obr. 36 DLS analýza znázorňujúca veľkosť nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky B.</i> .....	56
<i>Obr. 37 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke B.</i> .....	56
<i>Obr. 38 DLS analýza znázorňujúca veľkosť nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky C.</i> .....	57
<i>Obr. 39 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke C.</i> .....	58
<i>Obr. 40 Absorpčné pásma syntetizovaných zlatých nanočastíc.</i> .....	60
<i>Obr. 41 Porovnanie cytotoxicity AuNPs pri koncentráciách 5, 10, 30, 50, 80 <math>\mu\text{l/ml}</math></i> .....	61

# 1 Úvod

Zlaté nanočastice si získali vysokú pozornosť v biomedicínskych aplikáciách vďaka svojim vynikajúcim elektrochemickým a optickým vlastnostiam ako je silný rozptyl svetla, povrchová plazmónová absorpcia, zhášanie fotoluminiscencie, lokálne zosilnenie poľa. Tieto vlastnosti predurčujú ich využitie v zobrazovacích aplikáciách zahŕňajúc odvetvie medicíny. Ukázalo sa, že zlaté nanočastice predchádzajú rôzne obmedzenia bežne používaných kontrastných látok ako je nízka fotostabilita, nedostatočná stabilita *in vivo* a *in vitro*, ktorá je nasledovaná rýchlim odstránením látky z organizmu.

Pre spomínané bioaplikácie musí byť však zabezpečená čo najmenšia toxicita nanočastíc. Mnohé výskumy potvrdzujú, že nanočastice sú netoxické s porovnaním k ostatným kovovým nanočasticiam vyrábaných z oxidu titaničitého či zinočnatého alebo platiny. Navyše toxicita býva odstraňovaná povrchovou funkcionalizáciou zabezpečujúcou vyššiu biokompatibilitu k živým bunkám a tkanivám.

Mokrú chemickú syntézu prostredníctvom redukcie soli kyseliny tetrachlorozlatej za pomoci rôznych redukčných činidiel patria medzi najrozšírenejší a najjednoduchší spôsob prípravy zlatých nanočastíc. Medzi tieto syntézy sa radí aj Turkevichova metóda, ktorá bola prevedená v tejto diplomovej práci. Zlaté nanočastice ďalej podliehali povrchovej modifikácii glutatiómom a polyetylénglykolom. Na získanie optických vlastností bola prevedená UV-VIS analýza. Charakterizácia tvaru, disperzity a veľkosti nanočastíc bola determinovaná na základe DLS a SEM analýzy. Stabilita nanočastíc bola stanovená pomocou Zeta potenciálu. Nakoniec boli zlaté nanočastice podrobené kolorimetrickému MTT testu za použitia bunkovej línie HEK 293.

## 2 Súčasný stav riešenej problematiky

### 2.1 Zlaté nanočastice a ich vlastnosti

Zlaté nanočastice (AuNPs), taktiež známe ako koloidné zlato je suspenzia zlatých častíc so submikroskopickými rozmermi, ktoré sa môžu nachádzať v rôznych tvaroch ako sú nanoguličky, nanotyčinky, nanotrubičky, nanokocky, nanovláčna atď. Vyznačujú sa nielen výbornými optickými, elektronickými vlastnosťami ale taktiež svojou chemickou stabilitou, ktorá býva znásobená ich povrchovou modifikáciou a funkcionalizáciou (viď. kapitola 2.4). Tieto vlastnosti sú však závislé od ich tvaru, veľkosti a spôsobu prípravy. Napríklad sférické nanočastice majú vínovo červenú farbu (Obr.1), zatiaľ čo nanotyčinky majú modrú alebo čiernu farbu [1,2].



*Obr.1 Ukážka rôznych veľkostí sférických AuNPs v koloidnej forme. Nanočastice s priemerom 2 nm sú príliš malé na to aby rozptyľovali svetlo, preto je roztok číry [3].*

#### 2.1.1 Stabilita zlatých nanočastíc

Stabilita AuNPs vychádza z teórie Derjaguin-Laudau-Verwey-Overbeck (DLVO). Klasická DLVO teória uvažuje častice ako nekonečne plochý pevný povrch s jednotnou hustotou náboja. Okrem toho povrchové napätie je konštantné a jednotné, pričom medzi časticami a rozpúšťadlom sa neobjavujú žiadne chemické reakcie (na rozpúšťadlo vplýva iba jeho dielektrická konštanta). Z toho vyplýva, že spočíva v rovnováhe medzi Van der Waalsovými silami a odpudivými Coulombovskými silami, zatienená faktorom Debye-Hückel. Podľa tejto teórie je celkový potenciál interakcie

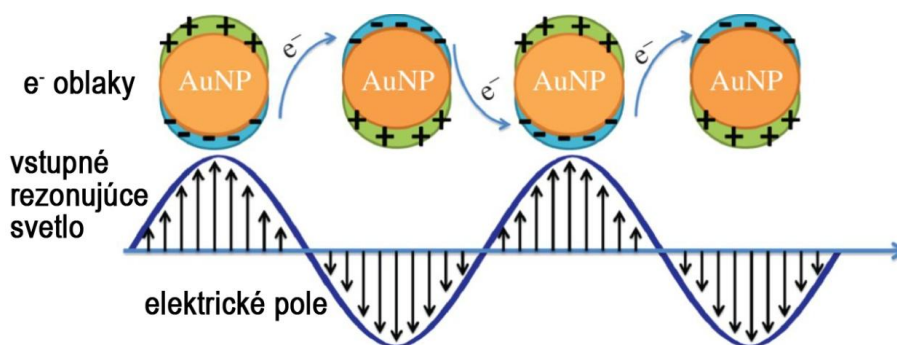
( $V_{total}$ ) medzi dvoma AuNPs daný sumou elektrostatického odpudzovania  $V_{elec}$  a Van der Waalsovými príťažlivými silami  $V_{vdW}$ .

$$V_{total} = V_{vdW} + V_{elec} \quad (1)$$

V prípade nanočastíc funkcionalizovaných povrchovo aktívnymi látkami ako napr. alkántioly a polymérmí sa odporivé sily znásobujú prekryvaním ich dlhých reťazcov a interakciou s okolitými molekulami rozpúšťadla [4,5].

### 2.1.2 Optické vlastnosti zlatých nanočastíc

Jedným z najvýznamnejších rysov AuNPs je absorpcia viditeľného svetla, čo je výsledkom povrchovej plazmónovej rezonancie (SPR z angl. surface plasmon resonance). SPR je prítomná len u častíc s nanorozmermi, čím sa predurčuje ich využitie v biomedicínskych aplikáciách k zobrazovaniu. Ak na zlatú nanočasticu dopadá svetlo, dochádza na jej povrchu k spoločnej oscilácii vodivých elektrónov, ktorá je indukovaná vzájomným pôsobením elektromagnetického poľa. Oscilácia elektrónov okolo povrchu nanočastice spôsobuje separáciu náboja a tak vytvára dipól kmitajúci v smere elektrického poľa svetla (Obr. 2) [6].



Obr. 2 Schematické znázornenie javu SPR [7].

Bolo zistené, že pásmo SPR môže byť ovplyvnené nielen veľkosťou, tvarom, teplotou, ale aj vzájomnou vzdialenosťou AuNPs v roztoku. Ak sú AuNPs blízko pri sebe alebo sú v tesnej blízkosti podobnému druhu nanočastice, SPR pásmo bude výrazne posunuté a farba roztoku sa môže zmeniť z červenej na modrú [8].

SPR všeobecne slúži na určenie adsorpcie látok ako sú polyméry, DNA alebo proteíny na povrchu rovinného kovu (zlato, striebro), alebo na povrchu kovových nanočastíc. Taktiež môže byť použitá na zvýšenie citlivosti niekoľkých

spektroskopických meraní, vrátane zhášania fluorescencie a Ramanovho rozptylu. Je to základný princíp pre aplikácie kolorimetrických biosenzorov a rôznych senzorov pre lab-on-chip [9].

## 2.2 Metódy prípravy zlatých nanočastíc

Vo všeobecnosti sú rozlišované dva základné princípy, ktorými možno zlaté nanočastice syntetizovať, a to bottom-up a top-down. Syntéza top-down zahŕňa mechanické „rozomletie“ zlata až na požadované nanorozmery a ich následnú stabilizáciu pridaním koloidných ochranných látok. Celý proces sa deje za prítomnosti šablóny, vďaka ktorej sú AuNPs jednotné v tvare a veľkosti [1,10]. Na princípe top-down funguje napríklad syntéza nanočastíc pomocou naparovania kovov, pri ktorej sú však náročné požiadavky na aparatúru a celkovo je ťažké dosiahnuť úzku distribúciu častíc [1].

Preto sa mnoho obľúbenejšími stali práve mokré chemické syntézy založené na princípe bottom-up, z hľadiska ich vyššej účinnosti a pohodlnosti. Navyše tento princíp sa zaobíde bez drahej a zložitej aparatúry, pretože na ich prípravu postačí bežné laboratórne sklo. Proces prípravy je založený na chemickej redukcii soli zlata alebo priamo kyseliny tetrachlorozlatitej niekoľkými spôsobmi, napríklad elektrochemickou cestou, kontrolovanou dekompozíciou metastabilných organokovových zlúčenín [1]. Aby sa predišlo zhlukovaniu nanočastíc, ich rast je regulovaný pomocou stabilizátorov ako sú napr. donorové ligandy, polyméry a povrchovo aktívne látky, ktoré sú prehľadne uvedené v Tab. 1 [11].

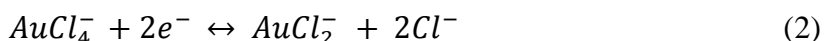
Tab. 1 Ukážka možných rozmanitých stabilizačných látok AuNPs

Druh stabilizačnej látky	Názov stabilizačnej látky	Referencie
polysacharid	beta-1,3-glukán s karboxylovou skupinou dextrán, chitozán, alginát	[12]
proteín	fibroín, ľudský sérový albumín, bombesín,	[13]
živica, disacharid	arabská guma, maltóza	[14]
kopolymér	poly(dimetylsiloxán)- <i>b</i> - poly(metylmetakrylát)- <i>b</i> -poly(2,2,3,3,4,4,4- heptafluorobutylmetakrylát)	[15]

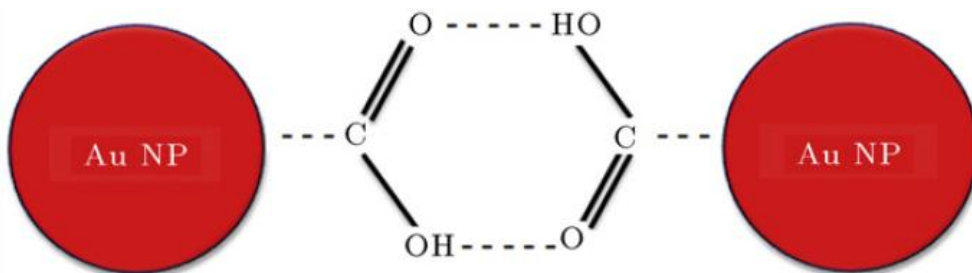
Medzi dve základné metódy založené na redukcii iónov zlata patrí Turkevichova a Brustova metóda. Ich odvođením vzniklo mnoho ďalších syntéz napr. Martinova metóda alebo zelené syntézy, ktoré využívajú k syntéze zlatých nanočastíc prírodné reakčné látky [16].

### 2.2.1 Turkevichova metóda

Túto najjednoduchšiu možnú metódu vynašla skupina vedcov na čele s J. Turkevichom v roku 1951, pričom v roku 1970 bola zdokonalená G. Frensom. Vo všeobecnosti sa používa k syntéze monodisperzných guľovitých zlatých nanočastíc vo vodnom roztoku. Táto metóda pozostáva z pridania roztoku citrátu sodného do vodného roztoku kyseliny tetrachlorozlatej zahriatej na 100 °C a následného varenia po dobu 30 minút. Kolloidné zlato vzniká vďaka dvojitému účinku iónov citrátu, ktoré pôsobia ako redukčné a taktiež ako aj obalovacie činidlo. K redukcii  $\text{HAuCl}_4$  dochádza vtedy, keď roztok začne meniť farbu [17]. Pridaním citrátu sa  $\text{Au}^{\text{III}}$  redukuje na  $\text{Au}^0$  ako ukazuje nasledujúca rovnica:



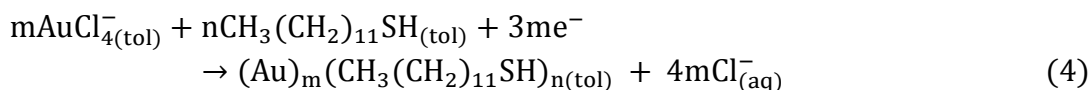
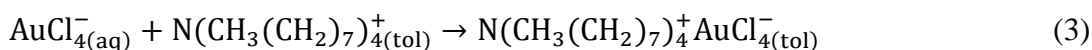
Konečná farba roztoku je rubínovo červená. K syntéze väčších častíc sa pridáva menšie množstvo citrátu sodného, čím sa oslabí stabilita AuNPs a tak sa začnú zrážať do väčších zhlukov. Na stabilitu takto pripravených nanočastíc vplýva vo veľkej miere pH roztoku. Bolo zistené, že nanočastice pripravené pomocou Turkevichovej metódy a funkcionalizované cysteínom a glutatiónom sú stabilné v rozmedzí pH od 4,5 do 10. V prípade nanočastíc s pH mimo tohto rozmedzia dochádza k ich agregácii na základe tvorby vodíkových mostíkov, ako ukazuje Obr. 3 [18].



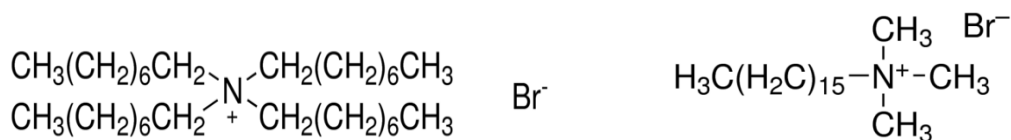
Obr. 3 Zhlukovanie zlatých nanočastíc funkcionalizovaných glutatiónom v dôsledku tvorby vodíkových mostíkov [18].

### 2.2.2 Brustova metóda

História tejto metódy siaha do roku 1994, kedy ju vynašiel Brust a Schiffrin. Spočíva v dvojfázovej syntéze AuNPs s využitím silnej interakcie zlata a funkčnej tiolovej skupiny. Vďaka tejto interakcií sú vzniknuté AuNPs veľmi stabilné, vhodné k ďalšej manipulácii a funkcionalizácii. Brustova metóda zahŕňa reakciu redukcie  $\text{AuCl}_4^-$  iónov s  $\text{NaBH}_4$  (antikoagulačné a redukčné činidlo) za prítomnosti dodekántiolu alebo bromidu cetyltrimetylamónneho (CTAB) ako obal'ovacieho činidla [19] a bromidu tetraoktylamónneho (TOAB) [20,21] ako redukčného činidla v toluéne (Obr. 4). TOAB slúži ako stabilizačná látka a katalyzátor fázového prenosu. Metóda môže byť popísaná nasledujúcimi rovnicami (tol znamená toluén):



Namiesto borohydridu sodného môžu byť použité aj alternatívne reagenty ako trietylborohydrid lítny, hexadecylbenzénamin, glutatión, 2-propylmagnézium bromid, ktoré spôsobujú redukciu  $\text{Au}^{\text{III}}$  [19].



Obr. 4 Racionálny vzorec TOAB (vľavo) a CTAB (vpravo) [22,23]

### 2.2.3 Martinova metóda

Túto metódu vynašili Martin a Eah v roku 2010 ako reakciu redukcie  $\text{HAuCl}_4$  s  $\text{NaBH}_4$  bez použitia akýchkoľvek stabilizátorov, ktorej výsledkom je stabilné, monodisperzné zlato bez povrchovej funkcionalizácie. Zásadným krokom je však stabilizovanie reagujúcich látok vo vodných zásobných roztokoch s  $\text{HCl}$  (reakcia s  $\text{HCl}$  musí trvať viac ako 3 mesiace), a  $\text{NaOH}$  (reakcia s  $\text{NaOH}$  musí trvať viac ako 3 týždne). „Nahé“ AuNPs sú ďalej obal'ované vrstvou 1-dodekánthiolu a potom prenesené do hexánu pretrepávaním roztoku vody, acetónu a hexánu po dobu 30 sekúnd. Vzhľadom k tomu, že všetky produkty reakcie ostávajú vo fáze vodného acetónu (acetón je polárne

rozpúšťadlo, čo znamená že po čase sa oddelí od nepolárneho hexánu), nie je potrebné konečné prečisťovanie. Táto metóda je jednoduchá, rýchla (všetky procedúry trvajú menej než 10 minút), lacná, ľahko adaptabilná, priateľská k životnému prostrediu a práve z hľadiska tohto aspektu praktická pre mnohé aplikácie [24].

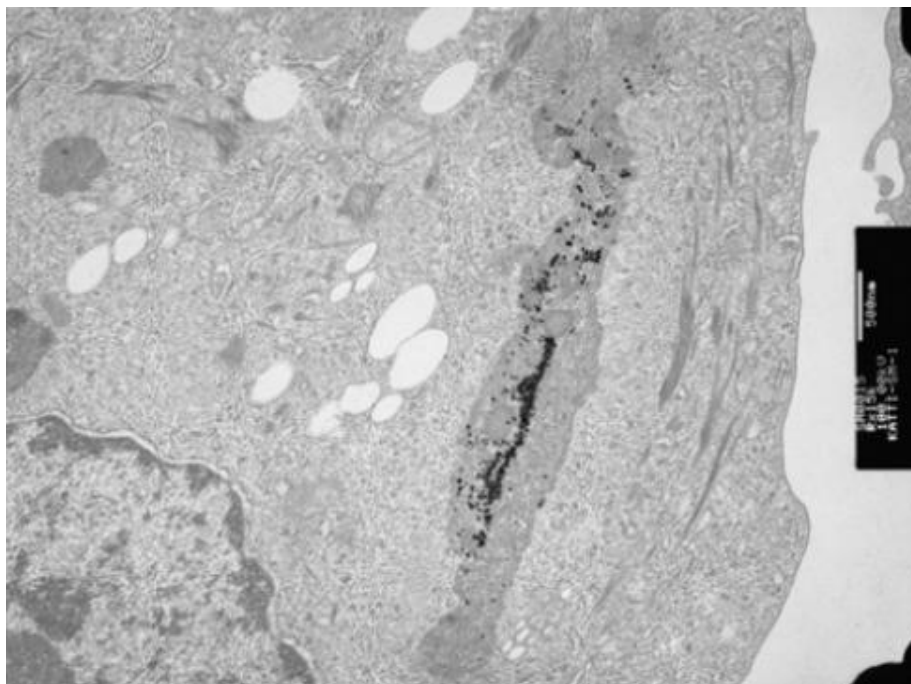
#### 2.2.4 Zelená syntéza

Snahou zelenej syntézy je aplikácia takých redukčných a stabilizačných činidiel, ktoré nezaťažujú životné prostredie. V posledných rokoch si získali svoju pozornosť najmä AuNPs syntetizované prostredníctvom rastlín [25,26], mikroorganizmov [27] a baktérií [28] vďaka jednoduchosti a nezávadnosti k životnému prostrediu.

Nayak et al. syntetizoval AuNPs pomocou vývaru z cibule, ktorý zmiešal s roztokom HAuCl<sub>4</sub>. K redukcii zlatitých Au<sup>3+</sup> iónov na ióny Au<sup>0</sup> dochádza práve vďaka prítomnosti vitamínu C (kyselina askorbová) v cibuli. Vzniknuté guľovité a kubické AuNPs s veľkosťou približne 100 nm boli stabilizované 2% vodným roztokom chitozánu. To, že takto vyrobené nanočastice nepoškodzujú živé bunky, bolo dokázané prostredníctvom ich internalizácie cez endocytózu do nádorových buniek prsníka MCF-7 (Obr. 5) [26].

Elia et al. pripravoval AuNPs taktiež redukčnou reakciou iónov AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>. Ako redukčné a ochranné činidlá použil extrakty z rastlín – Šalvia lekárska, Verbena citrónová, Pelargónia vonná a granátové jablko. Rozmery nanočastíc záviseli od použitých činidiel, avšak najväčšie rozmery (~30–70 nm) vykazovali AuNPs za použitia extraktu z granátového jablka. Biokompatibilita bola testovaná v petriho miske na L-bunkách myších fibroblastov pridaním rôznych množstiev takto vyrobených AuNPs. Bunky boli sledované po dobu 1–3 dní a výsledné rastové krivky určujúce množstvo buniek sa takmer zhodovali s kontrolnou rastovou krivkou (určujúca bunkové kultúry bez použitia AuNPs) [25].

J. Annamalai a T. Nallamuthu sa zaoberali vo svojej štúdií syntézou AuNPs pomocou vodného extraktu *Chlorella vulgaris* a HAuCl<sub>4</sub>. Podarilo sa im pripraviť nanočastice s rozmermi 2–10 nm. *C. vulgaris* obsahuje hydroxylové, karboxylové a amino funkčné skupiny, ktoré slúžia ako redukčné a obal'ovacie činidlo v jednom kroku. Test toxicity pripravených nanočastíc bol preukázaný na ľudských patogénnych bunkách, baktériách a kvasinkách (*E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *C. albicans*). Bolo zistené, že *C. vulgaris* účinne znížila koncentráciu iónov AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> a vytvorila biokompatibilnú nanočasticu vhodnú pre ďalšie aplikácie [29].

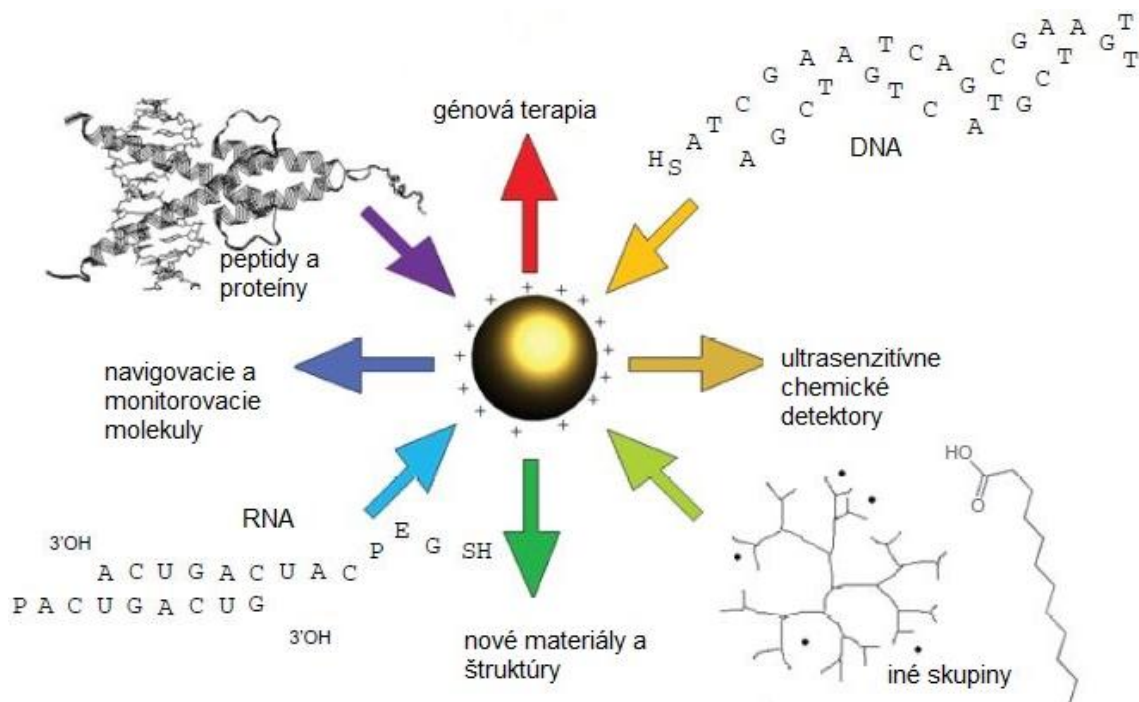


*Obr. 5 TEM snímok internalizácie zlatých nanočastíc (čierne bodky) pripravených pomocou zelenej syntézy do nádorovej bunky MCF-7[26].*

### **2.3 Funkcionalizácia zlatých nanočastíc**

Funkcionalizácia AuNPs je dôležitá z hľadiska zachovania ich stability a funkčnosti. K funkcionalizácií sa používajú rôzne chemické zlúčeniny, a to buď anorganické ako napríklad  $\text{SiO}_2$  [30], alebo organické, ako sú napríklad biomolekuly (*Obr. 6*). Vo všeobecnosti sa využívajú látky ako oligo/polypeptidy, oligonukleotidy, RNA/DNA molekuly, protilátky, povrchové bunkové receptory atď. [31].

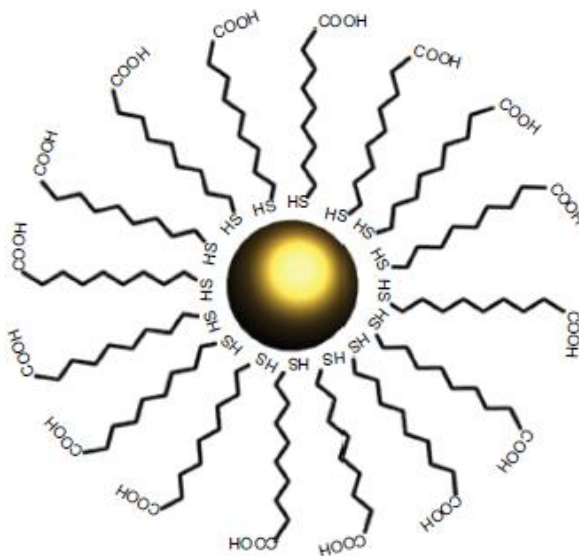
Tieto látky sa môžu naviazať prostredníctvom elektrostatických interakcií, alebo prostredníctvom chemických väzieb [32]. Je vhodné, aby daná funkcionalizačná látka obsahovala funkčné skupiny ako je amino ( $-\text{NH}_2$ ), karboxylová ( $-\text{COOH}$ ) a tiolová ( $-\text{SH}$ ), ktoré umožňujú naviazanie ďalších látok [33]. V niektorých prípadoch je potreba pre naviazanie týchto látok funkčné skupiny aktivovať. Napríklad k aktivácii karboxylových skupín sa zvyčajne pridávajú tzv. crosslinkery ako EDC (1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) karbodiimid) a NHS (N-hydroxysukcinimid), ktoré umožňujú kovalentne viazať proteíny a ostatné špecifické biomolekuly s obsahom  $-\text{COOH}$  skupín. EDC viaže NHS ku karboxylovým skupinám, za vytvorenia NHS esteru.



Obr. 6 Ukážka možnej funkcionalizácie a potenciálne aplikácie AuNPs s rôznymi makromolekulami ako tioalkylovaná DNA a RNA, proteíny, peptidy, karboxylové kyseliny, poly(amidoamin) dendriméry [34].

Existujú dva možné prístupy ako vhodne funkcionalizovať zlaté nanočastice a to pomocou priameho naviazania stabilizačného činidla s funkčnou skupinou alebo pomocou výmeny ligandov zo stabilizačného činidla [35]. Vo veľkej miere bývajú AuNPs stabilizované proti zhlukovaniu pomocou dlhých uhl'ovodíkových reťazcov merkaptokarboxylových kyselín (Obr. 7). Jeden koniec reťazca sa naviaže na povrch AuNPs a druhý koniec, ktorý obsahuje funkčnú karboxylovú skupinu je orientovaný do priestoru, vid'. Takto funkcionalizovaná AuNPs zabezpečuje stabilizáciu častice z hľadiska elektrostatickej odpudivej sily a rovnako umožňuje konjugáciu ďalších molekúl [34].

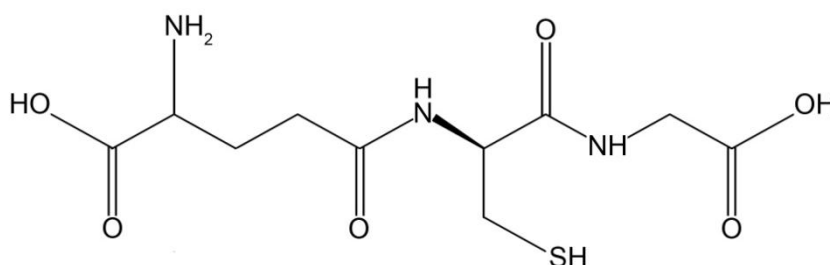
V nasledujúcich kapitolách sú spomenuté najvýznamnejšie látky pre funkcionalizáciu AuNPs, kde je vyzdvihnutá ich dôležitosť v biomedicínskych aplikáciách, a to najmä v zobrazovaní.



Obr. 7 AuNP funkcionalizovaná reťazcami kyseliny merkaptobenzoovej. Tiolová skupina sa viaže na AuNP a karboxylová skupina sa orientuje do priestoru [34].

### 2.3.1 Glutatión

Glutatión (GSH) sa v syntézach AuNPs používa ako obal'ovacie činidlo, pre zabezpečenie stability a zníženie toxicity. GSH je lineárny tripeptid pozostávajúci z troch aminokyselín a to: L-glutamátu, L-cysteínu a glycínu. Udržiava optimálny redoxný potenciál pre správnu funkciu bunkových proteínov. Napomáha sa telu zbavovať rôznych toxínov (napr. formaldehyd, bezopyrén) a ťažkých kovov (ortuť, arzén, kadmium). Je považovaný za najsilnejšiu protirakovinovú látku syntetizovanú ľudským telom. Jeho najvyššie zastúpenie sa nachádza v cytozole u takmer všetkých bunkových typov [36,37]. Každá molekula glutatiónu obsahuje jednu amino skupinu, dve karboxylové skupiny a vďaka prítomnosti L-cysteínu obsahuje jednu tiolovú skupinu. Početné funkčné skupiny glutatiónu umožňujú naviazanie ďalších štruktúr na povrch zlatých nanočastíc [38].

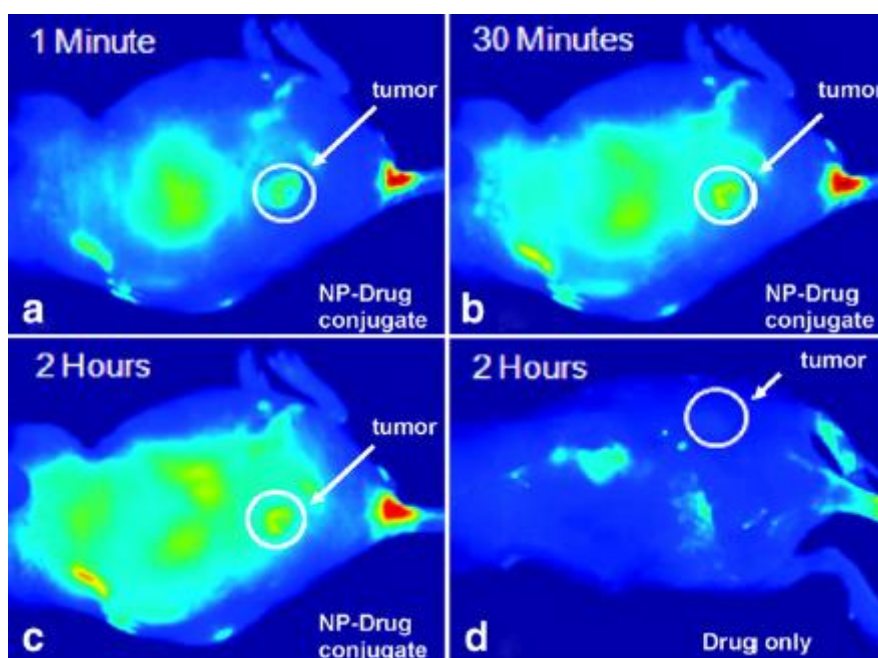


Obr. 8 Štruktúra glutatiónu ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteínglycín)[37].

### 2.3.2 Polyetylénglykol

Polyetylénglykol (PEG) môže byť pri syntézach zlatých nanočastíc použitý k zlepšeniu farmakokinetiky a biodistribúcie liečiv. Modifikácia AuNPs pomocou PEG zabezpečuje predĺženie jeho výskytu v tele 4–5 krát viac ako bez jeho obsahu [39]. Dlhšia doba pretrvávania PEG-AuNPs je spôsobená tým, že vďaka hydrofilnej povahe PEG sa takto funkcionalizované nanočastice dokážu vyhnúť makrofágom, ktoré zabezpečujú vyňatie z krvného obehu. Tým, že nanočastice zostávajú v obehu dlhšie, zabezpečujú efektívnejšie interakcie s cieľovými bunkami [40,41].

Vďaka tomu, že PEG-AuNPs majú schopnosť viazať sa na bunkovú membránu môžu slúžiť ako donášači liečiv. V tomto prípade môžu byť AuNPs obalované samostatným PEG, alebo v spojení s rôznymi inými molekulami ako je biotín, peptidy alebo oligonukleotidy a tak pomáhať k internacionalizácii nanočastíc do cieľových buniek (Obr. 9) [42]. V tejto štúdií boli PEG-AuNPs naviazané na hydrofóbne liečivo Pc4, ktoré sa využíva vo fotodynamickej terapii. Naviazanie k povrchu AuNP je uskutočnené cez väzbu amino skupiny na Pc4: N-Au.



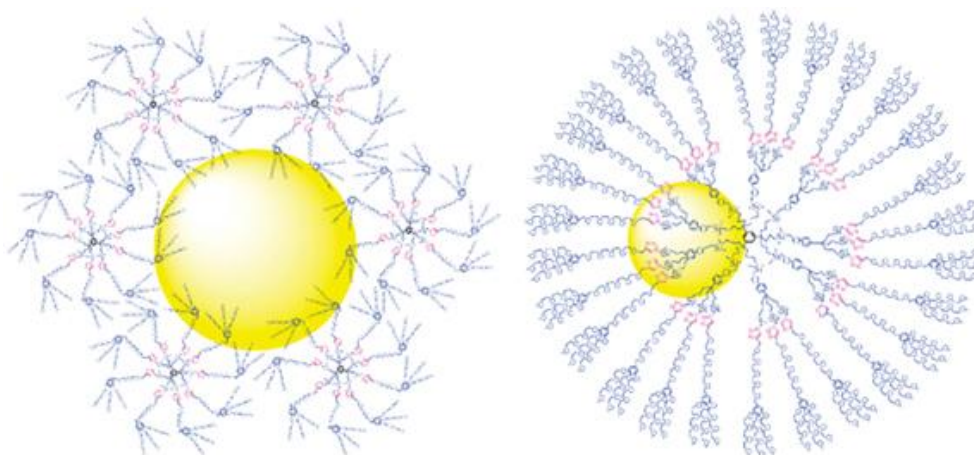
Obr. 9 Fluorescenčné snímky tumoru myši, zachytené 1 min (a), 30 min (b), 2 h (c) po intravenóznom podaní PEG-AuNPs-Pc4. (d) po intravenóznom podaní samostatného liečiva Pc4, ktoré nie je detekovateľné ani po 2 h [42].

Akonáhle takto funkcionalizovaná AuNPs dosiahne miesto nádoru, je použité žiarenie o vlnovej dĺžke 670 nm k odpojeniu liečiva od PEG-AuNPs a zahájená fototerapia.

PEG-AuNPs môžu rovnako slúžiť v bunkovom a medzibunkovom označovaní biologických komponentov. Vizualizácia PEG-AuNPs v bunkách či organizme sa dosahuje napríklad naviazaním tiolu a fluorescenčného farbiva (kumarín) [31]. Účinnosť takýchto nanočastíc s naviazanou kyselinou lipoovou bola napríklad testovaná pri zobrazovaní podkožného nádoru myši A431 pomocou fluorescenčnej mikroskopie [43].

### 2.3.3 Dendriméry

Dendriméry patria do triedy rozvetvených, monodisperzných syntetických makromolekúl s jasne definovaným zložením. Majú guľovité zloženie a postupným pridaním vrstiev špecifických chemických skupín okolo centrálného jadra vytvárajú tzv. generácie [41]. Vďaka výborným fyzikálno-chemickým vlastnostiam sú v syntéze AuNPs používané buď ako základná zložka alebo ako stabilizačné činidlá (viď Obr. 10)



Obr. 10 Dendriméry obalujúce zlaté nanočastice [44].

Usporiadanie dendrimérov umožňuje syntézu AuNPs, kde sú koncové aminy transformované na acetylové funkčné skupiny, čím zabraňujú toxicite a nešpecifickému viazaniu sa k bunkovej membráne. AuNPs modifikované dendrimérmí sa môžu prostredníctvom amino skupín na ich konci spájať s ligandmi slúžiacimi pre označovanie. Napríklad AuNPs modifikované dendrimérmí použitím generácie PAMAM môžu byť acetylované pre *in vivo* CT zobrazovanie myši po intravenózne

injekcií. Absorpčný koeficient RTG lúčov dokazuje, že absorpcia AuNPs s dendrimérmi alebo acetylovaných AuNPs s dendrimérmi je mnohonásobne vyššia než jódové kontrastné látky v rovnakej molárnej koncentrácii. Wang et. al. zistili, že po intravenóznejskej injekcií acetylovaných zlatých nanočastíc s dendrimérmi dochádza k výbornému rozoznaniu celého krvného riečišťa, dolnej dutej žily a pľúcnej žily [45].

### 2.3.4 Bielkoviny/ aminokyseliny

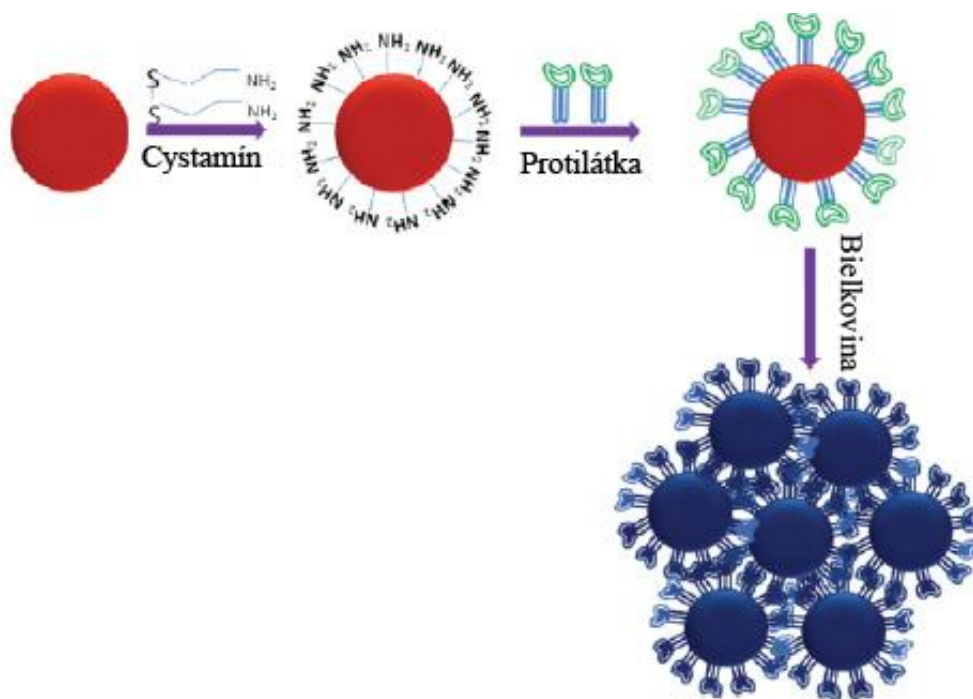
Funkcionalizácia pomocou aminokyselín a bielkovín pomáha zvyšovať účinnosť nanočastíc pri internalizácii do buniek, pri doručovaní, označovaní a zobrazovaní *in vivo*, či *in vitro*. Do bunky prenikajú prostredníctvom endocytózy alebo mikropinocitózy a ich distribúcia je závislá na koncentracii peptidu a nanočastice. Takto funkcionalizované AuNPs sa používajú taktiež ako nosiče liečiv či génov. Za spoľahlivé donášače génov bez produkcie toxicity môžu byť považované AuNPs funkcionalizované s aminokyselinami (lyzín, polylyzín, glycín) naviazané na DNA. Primárne aminové skupiny týchto aminokyselín prispievajú k zvýšeniu väzbovej kapacity ku kationovej skupine na DNA. Funkcionalizované AuNPs nesúce konjugáty siRNA-PEG slúžia ako efektívne inhibítory rakovinových génov. V tejto súvislosti slúži peptid, konkrétne Arg-Gly-Asp naviazaný na PEG-AuNPs spolu so signálnym peptidom Lys-Lys-Lys-Arg-Lys na označovanie jadra nádorových buniek.

AuNPs funkcionalizované peptidmi sa taktiež bohato využívajú v zobrazovaní rakovinových nádorov. Zvyčajne sa k zlatým nanočasticiam funkcionalizovanými peptidmi naviaže látka, ktorá býva nahromadená v rakovinových bunkách alebo látka, ktorá má k týmto bunkám vysokú afinitu. Ako príklad môže slúžiť bielkovina Bombesin zložená zo 14 aminokyselín. Z hľadiska jej vysokej afinity ku gastrínu, ktorý býva nahromadený v nádoroch, môže slúžiť v spojení s AuNPs k účinnému zobrazovaniu nádorových buniek [31].

#### 2.3.1 Protilátky

Protilátky môžu byť adsorbované na povrch AuNPs cez hydrofóbne a iónové interakcie, alebo cez chemisorbciu natívnych tiolových skupín prítomných vo svojej chemickej štruktúre. Stabilita takto funkcionalizovaných nanočastíc môže byť upevnená pridaním monovrstvy NHS esterov, ktoré majú tendenciu reagovať s primárnymi aminmy protilátok a tak vytvárať stabilnejšiu štruktúru. AuNPs modifikované s protilátkami špecifickými k danému typu rakovinej bunky môžu slúžiť k ich zobrazovaniu. Napríklad AuNPs značené s protilátkami epiteliálneho rastového faktoru

boli inkubované s orálnymi epiteliálnymi rakovinovými bunkami a nerakovinovými epiteliálnymi bunkami. Mikroskopickou analýzou bolo zistené, že konjugáty sa viažu k bunkám šesťkrát vyššou afinitou ako u nerakovinových buniek [46]. Rovnako môžu takto funkcionalizované nanočastice slúžiť k detekcii tau proteínov spôsobujúce Alzheimerovu chorobu. Pri styku tau proteínu so zlatými nanočasticami funkcionalizovanými s monoklonálnymi-anti-tau-protilátkami dochádza k vzniku agregátov, ktoré sú charakteristické svojou modrou farbou na rozdiel od počiatočných červených nanočastíc (Obr. 11) [47].



Obr. 11 AuNPs funkcionalizované monoklonálnymi-anti-tau-protilátkami slúžiace k detekcii tau proteínov zodpovedných za Alzheimerovu chorobu [47].

### 2.3.2 Lipidy

Spolu s oligonukleotidmi, bielkovinami a protilátkami môžu aj lipidy slúžiť k funkcionalizácii AuNPs. Naviazaním tiolovaných lipidov, alkántiolov a apolipoproteínov - proteínovej súčasti cholesterolu HDL (vysokodenzitný lipoproteín) na povrch AuNPs, je možné syntetizovať HDL-AuNPs. Lipidy sú adsorbované na AuNPs cez hydrofóbne interakcie medzi lipidovými reťazcami a tiolovými skupinami.

Prirodzený HDL v tele napomáha odvádzať cholesterol z krvného riečiska a tak zabráňovať jeho usadeniu a vzniku aterosklerózy. Zvyšovanie hladiny HDL indukuje

menšiu pravdepodobnosť nárastu aterosklerózy. HDL-AuNPs môžu byť použité pre zobrazovanie buniek makrofágov *in vivo*, pretože práve hustota makrofágov je indikátorom vzniku aterosklerózy. Takýto experiment bol prevedený na myšiach, vykŕmených tak, aby mali vysoký cholesterol. Po injekcií HDL-AuNPs boli prevedené CT skeny aorty, ktoré ukazujú, že funkcionalizované nanočastice sa nahromadili práve v aterosklerotických miestach, čo naznačuje, že tieto nanočastice môžu byť v budúcnosti využité v zobrazovaní aterosklerózy [46].

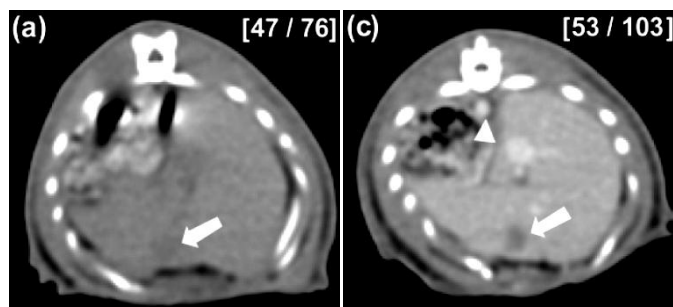
## 2.4 Techniky slúžiace k zobrazovaniu pomocou AuNPs

Zobrazovanie na molekulárnej úrovni umožňuje detegovať a kvantitatívne merať funkciu biologických a bunkových procesov *in vitro* a *in vivo*. Dôležitou súčasťou sú rôzne kontrastné látky, bez ktorých sa molekulárne zobrazovanie bunkových procesov nezaobíde. S výskumom a vývojom látok pre zobrazovanie je automaticky spojený väčší progres v detegovaní a liečbe ochorení. Medzi modalities molekulárneho zobrazovania patrí optické zobrazovanie, výpočtová tomografia, zobrazovanie pomocou ultrazvuku, zobrazovanie na nukleárnej báze ako je pozitronová emisná tomografia a jednofotónová emisná tomografia PET a SPECT, atď. [45].

### 2.4.1 Výpočtová tomografia

CT (z angl. computed tomography) patrí k najrozšírenejším diagnostickým prístrojom v nemocniciach, z hľadiska jej frekvencií využívania a k vynaloženým nákladom. Dosiahnutie kvalitného zobrazovania si však vyžaduje vývoj vhodnej kontrastnej látky pre zvýšenie kontrastu medzi rôznymi typmi tkanív. Zlaté nanočastice sú pre takéto využitie vhodnými kandidátmi vďaka svojim optickým vlastnostiam ako je rozptyl svetla a povrchová plazmónová rezonancia, a tak ponúkajú väčšie výhody oproti klasickým kontrastným látkam na báze jódu. Jód sa ako kontrastná látka využíva preto, lebo spomedzi nekovových atómov má najvyšší absorpčný koeficient röntgenových lúčov. Medzi jeho nevýhody patrí však rýchle odstránenie z organizmu obličkami, ktoré spôsobuje krátky zobrazovací čas. Atómové číslo a elektrónová hustota zlata má vyšší absorpčný koeficient röntgenových lúčov než jód, čo znamená, že AuNPs by mali byť schopné zvyšovať CT kontrast. Ďalej nanočastice vykazujú nízku toxicitu a ich povrch môže byť ľahko modifikovaný molekulami s funkčnými skupinami, vďaka ktorým dosahujú výsledné nanočastice vhodné vlastnosti pre aplikácie v molekulárnom zobrazovaní [45]. Dongkyu et. al. preukázali že AuNPs modifikované PEG môžu slúžiť nielen na zobrazovanie krvného riečiska, ale aj k detekcií hepatómu (Obr. 12). Navyše

zvyšujú absorpčný koeficient až 5,7 krát oproti bežne používanej kontrastnej látke na báze jódu [48].



Obr. 12 CT snímky hepatómu potkana (označeného šípkou) pred intravenóznym podaním PEG-AuNPs (a) a 1 hodinu po intravenóznom podaní PEG-AuNPs (c) [48].

K zlepšeniu kvality zobrazovania pomocou CT na bunkovej a molekulárnej úrovni sa využíva celá rada funkcionalizačných činidiel ako sú peptidy, DNA, PEG [39], alebo protilátky [49]. Reuveni et. al. dokázali pomocou CT a AuNPs funkcionalizovanými s antiepidermálnym rastovým faktorom detegovať tumor, ktorý postihuje epitelové bunky na hlave a nose. Výsledky ukazujú, že tumor neviditeľný pod CT s klasickou kontrastnou látkou dokážu práve takto značené nanočastice detegovať. Táto skutočnosť ukazuje, že pomocou AuNPs je možné detegovať aj nádory v rannom štádiu [50].

#### 2.4.2 Fotoakustické zobrazovanie

Fotoakustické zobrazovanie má široké využitie v medicínskej diagnostike. Je založené na fotoakustickom efekte, na základe ktorého je zobrazovaná optická absorpcia tkaniva. Krátky laserový pulz dopadá na tkanivo, spôsobuje jeho rýchly ohrev a akustickú emisiu vďaka termálnemu rozširovaniu buniek v tkanive. K detekcii tejto akustickej emisie je využívané ultrazvukové pole [51].

Fotoakustická zobrazovacia technika môže odhaliť nádory selektívnym označovaním nádorových buniek, ktoré nadmerne exprimujú epidermálny rastový faktor (EGFR). Mallidi et. al. preukázali, že zlaté nanočastice funkcionalizované protilátkami s EGFR môžu slúžiť k efektívnemu zobrazovaniu podkožného nádoru [52]. Zhang et. al. taktiež využili PEG-AuNPs o veľkosti 20 a 50 nm, ako kontrastnú látku k zobrazovaniu ložiska nádoru myši. PEG-AuNPs vykazujú vysoký fotoakustický kontrast na rozdiel od tkaniva myši *ex vivo* [53].

### 2.4.3 Pozitrónová emisná tomografia

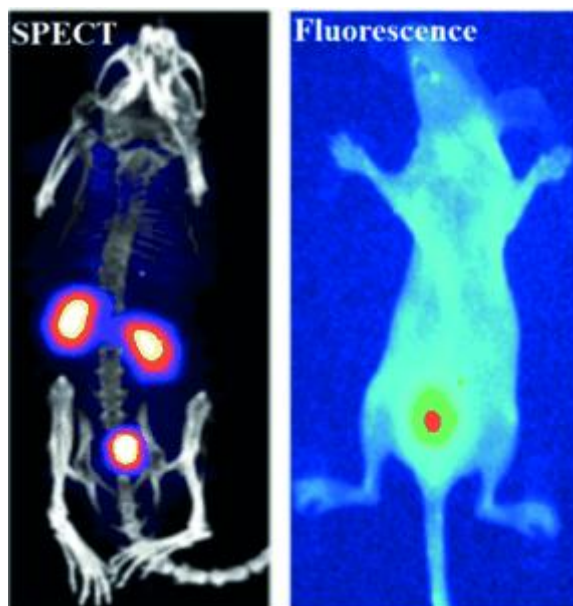
Pozitrónová emisná tomografia (PET) je zobrazovacia metóda založená na anihilácii pozitrónov s elektrónmi. Pri anihilácii dochádza k vzniku dvoch fotónov gama žiarenia, ktoré sú od seba odpudzované a následne detegované [54]

Berry et. al. vyvinuli biokompatibilné zlaté nanočastice rôznych veľkostí, ktoré môžu byť využité pre zobrazovanie pomocou PET. Nanočastice boli funkcionalizované s HIV Tat-PTD proteínom a testované *in vitro* na ľudskej línii fibroblastov. Výsledky ukazujú úspešný prechod nanočastíc do jadra bunky s veľkosťou 5 nm, zatiaľ čo nanočastice o veľkosti 30 nm ostávali v plazmatickej membráne, kvôli úzkym rozmerom jadrových pórov [55]. Podobný prípad dokazuje výskumný tím Ocampo-Garcia et. al, ktorí syntetizovali zlaté nanočastice o veľkosti 5 nm značené rádionuklidom  $^{99m}\text{Tc}$  a naviazané na peptid HIV-Tat(49-57). Popísané nanočastice slúžili ako multifunkčný systém s vlastnosťami vhodnými pre cieľnú terapiu rádionuklidov [56].

### 2.4.4 Jednofotónová emisná výpočtová tomografia

Jednofotónová emisná výpočtová tomografia (SPECT) patrí medzi ďalšie zobrazovacie metódy, ktorá sa sústreďuje na zobrazenie funkcie jednotlivých orgánov. Pred vyšetrením je do organizmu podané rádiofarmakum a to najčastejšie vnútrožilne. Pomocou scintilačnej kamery sa snímajú gama lúče vysielané z rádiofarmaka a premieňajú sa na elektrický signál, ktorý následne vytvára digitálny obraz v počítači [54].

Zhou et. al. preukázali, že zlaté nanočastice môžu slúžiť ako kontrastná látka pre SPECT zobrazovanie (Obr. 13). Zaoberali sa jedнокrokovou syntézou AuNPs s rádionuklidom zlata ( $^{198}\text{Au}$ ) obalovaných glutatiónom, ktoré emitujú žiarenie v blízkej infračervenej oblasti. Farmakokinetické štúdie ukazujú, že syntetizované nanočastice vykazujú rýchly polčas distribúcie (5 min) a požadovaný polčas rozpadu (12,7 h). Ďalej bolo zistené, že samotný rádionuklid  $^{198}\text{Au}$  nezachytáva energiu gamma žiarenia optimálne, avšak spolu so syntetizovanými zlatými nanočasticami môže byť veľmi ľahko detegovaný, a to nielen pomocou SPECT ale aj pomocou fluorescenčného zobrazovania. Tieto nanočastice teda predstavujú do budúcnosti potenciálnu kontrastnú látku aj pre potreby duálneho zobrazovania [57].

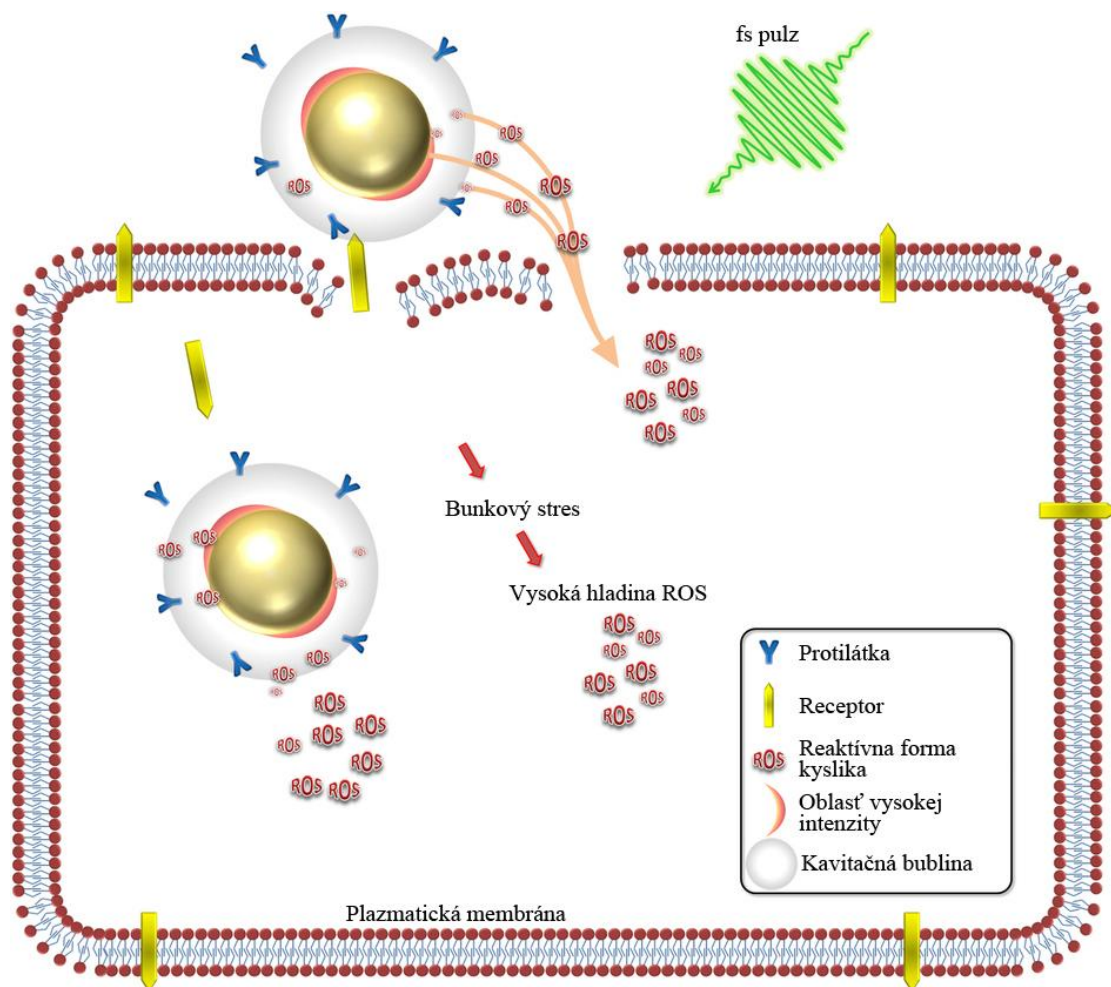


Obr. 13 Snímka SPECT a fluorescenčná snímka nádoru myši zobrazeného pomocou AuNPs s glutatiómom značených rádionuklidom  $^{198}\text{Au}$  [57].

## 2.5 Cytotoxicita AuNPs

Vo všeobecnosti môžu nanočastice pri styku s biologickým prostredím vyvolať tvorbu reaktívnych foriem kyslíka, pričom ich zvýšené hladiny spôsobujú rôzne zmeny v bunkovom prostredí. Najčastejšie dochádza k aktivácii stresových signálnych dráh, k priamemu poškodeniu bunkových organel ako napr. mitochondrií a v neposlednom rade k fragmentácii jadrovej DNA, čo vedie k zastaveniu bunkového cyklu, apoptóze či zápalovým prejavom [58]. Úloha funkcionalizácie nanočastíc spočíva v minimalizácii prejavov nekrózy.

Pri nekróze dochádza k narušeniu rovnováhy vnútorného prostredia vplyvom poškodenia integrity cytoplazmatickej membrány, a tak k objemovým zmenám bunky. Vnútorne prostredie bunky sa uvoľňuje do okolitého prostredia, čo vyvoláva reťazovú reakciu spôsobujúcu poškodenie okolitých buniek. Nastáva rozsiahla deštrukcia tkaniva sprevádzaná zápalovými reakciami. Apoptóza funguje na rozdiel od nekrózy na celkom odlišnom princípe, pri ktorom nedochádza k poškodzovaniu okolitých buniek. Jadrová DNA sa štiepi na rovnaké úseky, mení sa charakter organel a bunka sa zmršťuje. Proces končí rozpadom bunky do apoptických teliesok, ktoré sú následne fagocytované bielymi krvinkami. Tento dej je využívaný v deštrukčných procesoch nádorových buniek za pomoci zlatých nanočastíc (Obr. 14) [59].



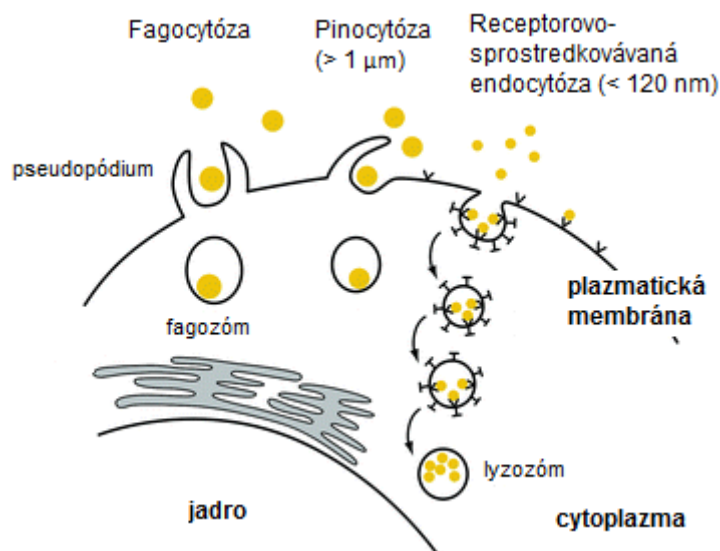
Obr. 14 Tvorba reaktívnych foriem kyslíka pri prestupe zlatých nanočastíc do bunky, spôsobujúcich nekrozu a tým toxicitu buniek.

### 2.5.1 Prienik zlatých nanočastíc do bunky

Bunka si zachováva svoju funkciu vďaka kontrole cez početné procesy, medzi ktoré patrí aj intracelulárna signalizácia vyvolaná naviazaním ligandu na receptor bunkového povrchu [60]. Na absorpcii AuNPs do bunky sa podieľajú rôzne bunkové mechanizmy ako je fagocytóza, pinocytóza (Obr. 15), avšak dominantným mechanizmom internalizácie AuNPs, ktorý využívajú mnohé bunkové línie je práve energeticky závislá receptorovo sprostredkovaná endocytóza [61]. Po prestupe nanočastíc do bunky cez tieto endocytické cesty sa ďalej AuNPs pohybujú pozdĺž endolyzozomálnej siete v rámci váčkov pomocou motorových proteínov a cytoskeletu. Pre prístup k cieľovému komponentu v cytoplazme alebo v jadre sa musia AuNPs oddeliť od endolyzozomálnej siete a pohybovať sa cez preplnenú cytoplazmu k cieľovým častiam bunky. Fyzikálne

vlastnosti AuNPs dovoľujú prestup do bunky dokonca aj prostredníctvom nešpecifickej väzby [60].

Absorpcia a distribúcia AuNPs v bunke závisí od mnohých faktorov ako je ich náboj, povrchové úpravy, veľkosť, tvar, koncentrácia a doba pôsobenia nanočastíc. Napríklad v štúdií, kde sa skúmal príjem nanočastíc pomocou kombinovanej metódy multifotónového zobrazovania spojeného s UV/Vis spektroskopickou analýzou bolo preukázané, že internalizácia častíc je vysoko závislá od veľkosti nanočastíc. AuNPs s veľkosťou 50–80 nm sú v priebehu 24 hodín prijímané bunkou vo väčšej miere ako nanočastice s priemerom 15–30 nm. Avšak v priebehu prvých 10 hodín vykazujú vyššiu rýchlosť absorpcie menšie nanočastice [62].



Obr. 15 Ukážka prestupu nanočastíc cez plazmatickú membránu pomocou fagocytózy, pinocytózy a receptorovo sprostredkávanej endocytózy [63].

### 2.5.2 Účinok reakčných činidiel na cytotoxicitu

Drvivá väčšina AuNPs je vyrábaná redukčnými metódami za použitia  $\text{HAuCl}_4$  vrátane mnohých ďalších agresívnych a toxických činidiel ako napríklad hydrazín, CTAB, TOAB alebo aj v predchádzajúcej kapitole spomínaný borohydrid sodný. Samotný CTAB je toxický už len v submikromolárnom množstve. Voľné molekuly CTAB sa môžu v roztoku objavovať kvôli nedostatočnému čisteniu alebo desorpcií z povrchu nanočastice. Alkily et. al jednoznačne potvrdili, že voľné molekuly CTAB spôsobujú toxicitu, keď porovnávali vyrobené AuNPs s ich odcentrifugovaným supernatantom. Supernatant vykazoval rovnakú toxicitu ako samotné AuNPs aj keď

neobsahoval žiadne nanočastice [64]. Práve preto by bolo potrebné k zlepšeniu biokompatibility AuNPs použiť netoxické reagenty, alebo z hľadiska funkcionalizácie znížiť toxicitu AuNPs. V mnohých výskumoch sa vedci pri výrobe AuNPs snažia nahradiť klasické redukčné a stabilizačné činidlá prírodnými látkami a zamedziť tak toxickým účinkom týchto látok. [25,26]

Toxicita zlatých nanočastíc teda silne závisí nielen od zlúčeniny, pomocou ktorej je syntetizovaná, ale rovnako od ich veľkosti a dokonca výsledky cytotoxicity sa môžu líšiť aj s použitím rôznych bunkových kultúr. Napríklad citrátom obalované AuNPs s priemerom 13 nm vykazovali toxicitu na bunkách ľudského karcinómu pľúc, avšak na bunkách ľudského karcinómu pečene nebola detegovaná žiadna toxicita po aplikácii nanočastíc v rovnakom množstve [64].

### 2.5.3 Cytotoxicita *in vivo* / *in vitro*

Mnoho štúdií a výskumov *in vitro* dokazuje, že AuNPs nie sú cytotoxické. Napríklad na základe MTT testu nebola preukázaná cytotoxicita pri aplikácii AuNPs s priemerom 4, 12 a 18 nm, za použitia rôznych obalovacích činidiel (citrát, cysteín, glukóza, biotín, CTAB) na bunkovú líniu ľudskej leukémie. Taktiež aplikácia AuNPs na ľudské dendritické bunky imunitného systému nevyvolávala toxicitu a rovnako nemenila fenotyp buniek. Na druhej strane však existujú výsledky výskumov *in vitro*, kde AuNPs toxicitu vykazujú. Napríklad nanočastice s priemerom 1,4 nm spôsobujú deštrukciu mitochondrií na celej rade buniek (epiteliálne: HeLa, endoteliálne: SK-Mel-28, fibroblasty: L929, fagocyty: j774A1), avšak rovnako bolo preukázané, že tie isté nanočastice s priemerom 15 nm nespôsobujú žiadne poškodenie bunky [64].

Aj keď tieto poznatky nepredpovedajú toxicitu *in vivo*, poskytujú aspoň nejaký základ pre pochopenie mechanizmu toxicity a absorpcie AuNPs na bunkovej úrovni. Alkilany et al. overoval cytotoxicitu citrátom obalovaných AuNPs (s priemerom 3, 5, 8, 12, 17, 37, 50, 100 nm) na bunkách myši. Zistilo sa, že najmenšie nanočastice (3 a 5 nm) a najväčšie nanočastice (50 a 100 nm) dávkované v rovnakom množstve nemali toxický charakter, avšak AuNPs so strednými hodnotami (8–37 nm) mali letálne účinky, ktoré sa prejavovali nechutou do jedla, stratou váhy, a celkovo kratšou dobou života. Zaujímavosťou však je, že tieto „smrtiace“ AuNPs boli testované *in vitro* na bunkovej línii HeLa, kde nespôsobovali žiadnu cytotoxicitu [64].

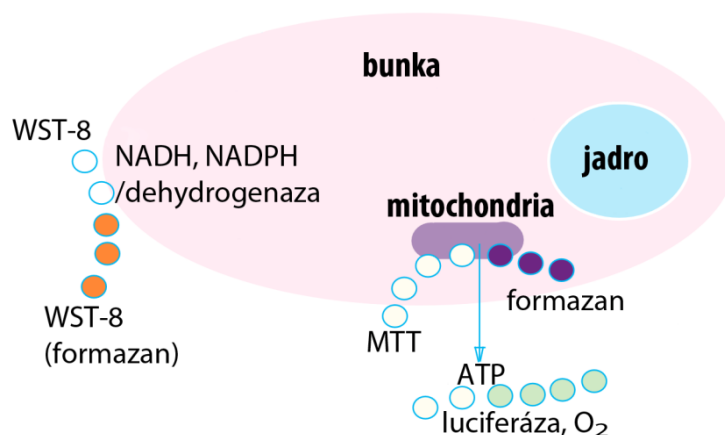
## 2.6 Metódy merania cytotoxicity

Existuje mnoho testov, ktorými možno zisťovať toxicitu buniek vystavovaných zlatým nanočasticiam [64]. Medzi najviac používané patria tie, kde sa hodnotí integrita bunkovej membrány pomocou farbiva (tryptánová modrá, propidium jodid). Tieto farbivá zdravá bunka odmieta, avšak ak je narušená bunková membrána farbivá preniknú do bunky a zafarbia vnútrobunkové komponenty. Prípadne sa môže integrita membrány sledovať na základe priechodu látok, ktoré sa za normálnych okolností nachádzajú len vo vonkajšom, alebo vnútornom prostredí bunky, avšak z hľadiska narušenia membrány budú prechádzať z vnútrobunkového prostredia do medzibunkového a naopak [65].

### 2.6.1 Kolorimetrické testy

Kolorimetrické testy sú v mnohých štúdiách hlavným nástrojom, ktorý sa používa na hodnotenie cytotoxicity. Môžu sa ďalej rozdeľovať na testy, kde sa hodnotí integrita plazmatickej membrány alebo mitochondriálna aktivita. Neutrálna červená (3-amino-7-dimetylamino-2-metylfenazín hydrochlorid) patrí medzi základné farbivo a s kombináciou iných farbív sa používa v rôznych kolorimetrických testoch pre meranie cytotoxicity nanočastíc. Je to slabé kationové farbivo hromadiace sa v lyzozómoch, ktoré prechádza plazmatickou membránou pomocou difúzie. V prípade narušenia membrány nahromadené farbivo uniká z bunky, čo je hlavným znakom medzi živou a mŕtvou bunkou. Cytotoxicita sa kvantitatívne hodnotí pomocou spektrometrického merania, na základe množstva neutrálnej červene.

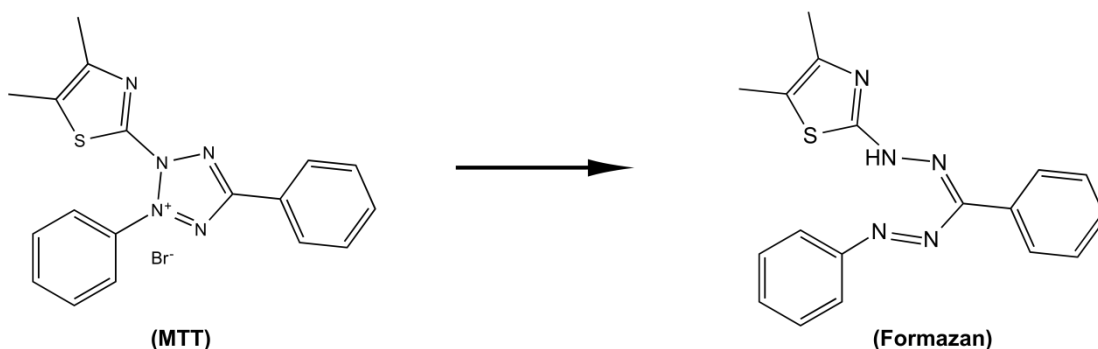
Medzi ďalšie najčastejšie používané kolorimetrické testy sa radia testy s využitím tetrazoliových solí, ktoré sú založené na kvantifikácii produkcie rozpustného formazánu. Medzi tieto testy patria MTS (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium), XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid), WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium), (Obr. 16). Nižšie v texte sú spomenuté aj iné testy, ktoré sa rovnako radia do kolorimetrických metód [66].



Obr. 16 Princíp MTT, WST-8 a ATP testu [67].

### MTT test

Tento test je pomenovaný podľa zloženia MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5 difenyltetrazolium bromid) (Obr. 17). V porovnaní s ostatnými technikami má mnoho výhod, pretože nevyžaduje veľkú fyzickú manipuláciu s modelovými bunkami a taktiež sa vyznačuje ľahko reprodukovateľnými výsledkami.



Obr. 17 Štruktúrny vzorec MTT a formazánu [68].

Test využíva fluorescenčný alebo chromogenetický indikátor a z hľadiska jeho univerzálnosti patrí k veľmi populárnym testom na meranie cytotoxicity *in vitro*. Je založený na konverzácii vo vode rozpustného MTT farbiva do nerozpustných kryštálov formazánu v živých bunkách, ktoré vykazujú mitochondriálnu aktivitu, pretože táto aktivita je charakteristická pre životaschopné bunky. Za redukciu MTT je zodpovedný práve redukovaný pyridínový kofaktor nikotínamidadenínindinukleotid (NADH). Nevýhodou tohto testu môže byť exocytóza kryštálov formazánu, čo vedie k skresleniu výsledkov [69,70].

Vzrast alebo pokles formazánu v životaschopných bunkách môže byť detegovaný na základe merania jeho koncentrácie prostredníctvom optickej hustoty. K meraniu sa zvyčajne používa plátkový čítač, nastavený na vlnovú dĺžku 570 nm [69].

### **LDH test**

V tomto teste sa ako indikátor cytotoxicity meria hladina extracelulárnej LDH (laktát dehydrogenáza), ktorá je uvoľňovaná z buniek s narušenou bunkovou membránou. LDH je oxidoreduktáza, ktorá katalyzuje vzájomnú konverziu laktátu a pyruvátu, kde NADH je redukovaný na NAD. LDH aktivita sa meria na základe úbytku NADH a jeho absorpčného maxima, ktoré dosahuje 340 nm [71].

### **Test založený na ATP**

Tento membránový test je založený na interakcii zlúčeniny a prenášača, pomocou merania aktivity ATP (adenozíntrifosfát). Transmembránové proteíny sprostredkujú prenos substrátov proti koncentračnému gradientu za použitia energie získanej z hydrolýzy ATP. Táto transportná aktivita môže byť ľahko detegovaná pomocou kolorimetrickej metódy.

Zlaté nanočastice môžu inhibovať metabolickú aktivitu buniek, obzvlášť aktivitu ATP a tak znižovať hladinu ATP v bunkách, čo následne spôsobuje dysfunkciu mitochondrií. Táto redukcia je meraná pomocou luciferázy, ktorá produkuje stabilný luminiscenčný signál úmerný množstvu ATP v bunke. Signál vzniká vďaka konverzií luciferínu na luminiscenčný oxyluciferín, pričom bolo preukázané, že so zvyšujúcou sa koncentráciou AuNPs sa luminiscenčný signál znižuje [72].

## **2.6.2 Mikroskopické metódy pre hodnotenie toxicity**

Medzi rozšírené techniky hodnotenia bunkovej cytotoxicity patrí fluorescenčná mikroskopia. Z tohto hľadiska kvalitatívne určuje väzbu medzi nanočasticami a bunkami. Taktiež sa používa pri zobrazovaní umiestnenia nanočastíc v bunke. Spolu s mikroskopiou vo svetlom poli slúži k pozorovaniu zmien bunkovej alebo nukleárnej morfológie. Kvantitatívne hodnotenie môže byť dosiahnuté použitím konfokálnej mikroskopie.

Ďalšou technikou hodnotiacou toxicitu buniek pôsobením nanočastíc je mikroskopia atomárnych síl AFM (z angl. atomic force microscopy) [73]. Spoločne s RTG kryštalografiou a elektrónovou mikroskopiou patrí medzi zobrazovacie metódy,

ktoré ukazujú štruktúrne detaily biologických vzoriek ako sú proteíny, nukleové kyseliny, bunkové membrány a samotné bunky v ich prirodzenom prostredí. Okrem toho sa používa na meranie povrchovej plochy nanočastice, čo je kľúčové pri skúmaní toxicity AuNPs. TEM podáva detailné informácie *in vitro* o absorpcii nanočastice bunkou a jej lokalizácii v bunke pomocou vizualizácie a spolu so spektroskopickými metódami charakterizuje zloženie bunky pred a po vystavení bunky nanočasticiam [66].

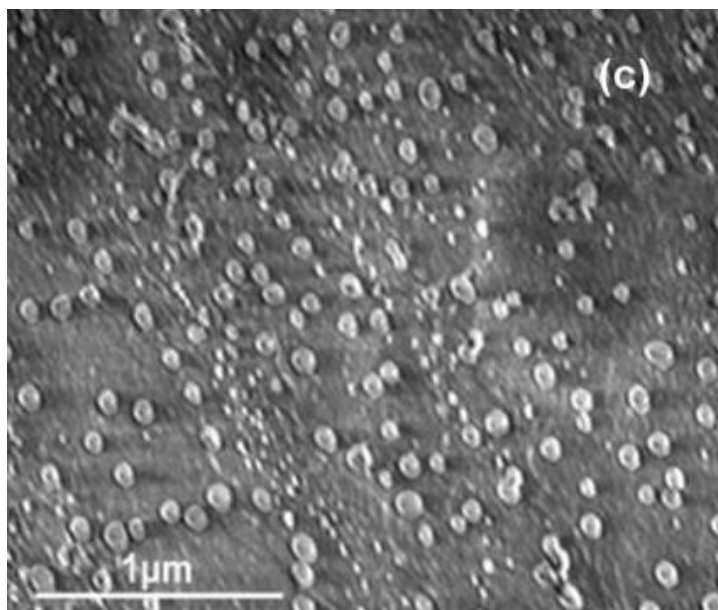
Tab. 2 Tabuľka testov cytotoxicity rôznych AuNPs.

tvar, priemer a koncentr. AuNPs	spôsob syntézy AuNPs	funkcionalizácia	bunkový prienik	test toxicity	použité bunkové kultúry	výsledky cytotoxicity	referencie
4-5 nm (2,2 mg/l; 46 mg/l)	neuvádza	PMA, PEG	neuvadený	test inhibície rastu riasy (72 h), test resazurin (24 h)	riasa <i>Pseudokirchmeriella subcapitata</i> . Epiteliálne bunky žiabrov pstruha dúhového RTGill-W1	PEG-AuNPs sú menej toxické v porovnaní s amfifilickými AuNPs na línii RTGill-W1, amfifilicky obalované AuNPs vykazujú vyššiu toxicitu ako PEG-AuNPs	[74]
tyčinky 31-45x14-20 nm/guličky 39-47 nm (9 µg/ml)	metóda seed-growth pomocou NaBH <sub>4</sub> , CTAB, AgNO <sub>3</sub> , k. askorbová,	žiadna	makropinocytóza	MTS (24 h)	MDCK II	guličky vykazujú vyššiu toxicitu ako tyčinky	[75]
13 nm (142 µg/ml), 45 nm (13 µg/ml)	HAuCl <sub>4</sub> + citrát	žiadna	neuvadený	DFs test	ľudské ADSCs	po odstránení AuNPs z bunky sa obnovuje proliferačná kapacita a lipogenická funkcia	[76]
guličky; 5 nm (0,53 mg/l), 25 nm (0,1 mg/l)	HAuCl <sub>4</sub> + citrát	žiadna	neuvadený	neuvadený	pečeňový zajačí tumor Vx2 (24 h)	žiadna alebo veľmi malá toxicita bez morfológických a histologických zmien	[77]
45 nm (10-30 mg/ml), 13 nm (75-210 mg/ml)	Au/citrát podľa Turkewicha	žiadna	45 nm AuNPs-endocytóza; 13 nm AuNPs-fagocytóza	pozorovaná miera apoptózy (3-6 dní)	ľudské fibroblasty	vyššia miera apoptózy u AuNPs s priemerom 45 nm	[76]
60 nm (0,1-100 µg/ml)	neuvádza	žiadna	endocytóza	MTT, LDH, ROS, ELISA test, (24-48 h)	myšie makrofágy	AuNPs neovplyvňujú životaschopnosť bunky a ani membránovú integritu	[78]

## 2.7 Metódy charakterizácie zlatých nanočastíc

### 2.7.1 Rastrovacia elektrónová mikroskopia

Táto mikroskopická technika určuje tvar, veľkosť a morfológiu povrchu vzoriek, pričom poskytuje zobrazenie s vysokým rozlíšením. Výsledný obraz vzniká vďaka interakciám elektrónov s preparátom. V dôsledku tejto interakcie atómy na vzorke prijímu energiu, čím dochádza k uvoľneniu sekundárnych tzv. Augerových elektrónov, spätne rozptýlených elektrónov, difraktovaných spätne rozptýlených elektrónov, krátkovlnných fotónov, viditeľných fotónov a tepla. Práve sekundárne elektróny sa však využívajú k zobrazeniu povrchu preparátu. Z vyvýšených miest na preparáte sa dostáva do detektoru väčšie množstvo sekundárnych elektrónov, čo je charakteristické svetlými miestami na výslednom obraze (Obr. 18). Spätne rozptýlené elektróny sú zodpovedné za výsledný kontrast pri meniacom sa zložení vzorku. Nanočastice sa musia pred pozorovaním vysušiť, aby sa zamedzilo elektrickej vodivosti [79].

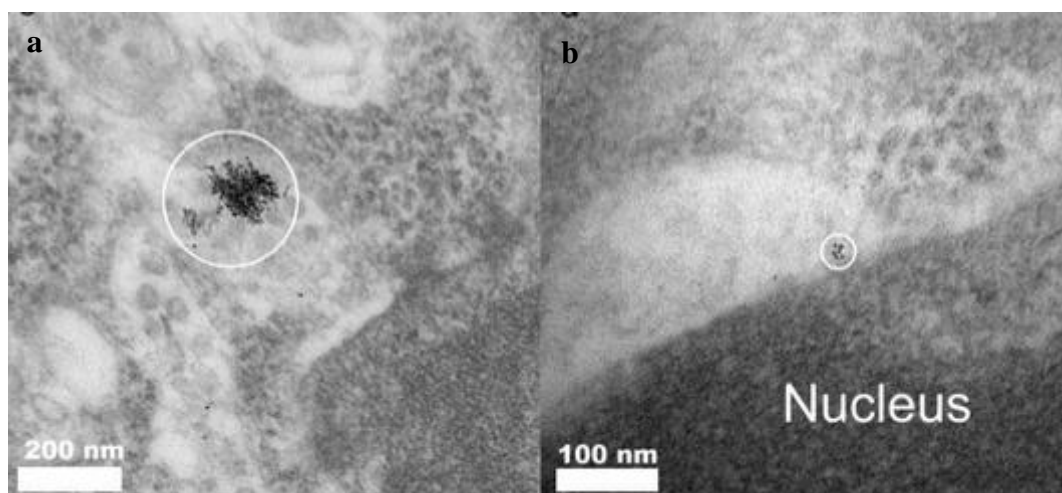


*Obr. 18 SEM snímka chitozánom obalovaných AuNPs. Nanočastice sa zobrazujú svetlejšie a pozadie tmavšie v dôsledku nízkej energie a rýchlosti sekundárnych elektrónov [80].*

### 2.7.2 Transmisná elektrónová mikroskopia

Transmisná elektrónová mikroskopia patrí medzi základné techniky, ktoré pomáhajú zistiť tvar, veľkosť, morfológiu a priestorovú distribúciu nanočastíc. Rovnako ako SEM, aj TEM využíva k zobrazovaniu prúd elektrónov. Amplitúda a zmena fázy vysielaného zväzku elektrónov zabezpečujú zmenu kontrastu, ktorý je funkciou hrúbky nanočastíc. Dôležitou súčasťou TEM analýzy je teda príprava vzorky, nakoľko úspešné zobrazenie nanočastíc závisí na kontraste preparátu a pozadia. Nanočastice sú pred analýzou vysušované a následne nanosené na medenú mriežku, ktorá je pokrytá tenkou vrstvou uhlíka. Materiály s vyššou elektrónovou hustotou než je elektrónová hustota amorfného uhlíka sú ľahko detegované. Medzi tieto materiály patrí väčšina oxidov, polymérov a kovov vrátane zlata [81].

Okrem tvaru a veľkosti môže byť pomocou TEM zachytená priestorová distribúcia nanočastíc vo vnútri buniek. Gu et. al pozoroval pomocou TEM prienik a distribúciu zlatých nanočastíc funkcionalizovaných pomocou PEGu a kyseliny merkaptopropiónovej na nádorových bunkách typu HeLa. Zo snímok sú viditeľné vačky obsahujúce AuNPs. Pri použití vysokého rozlíšenia je možné vidieť, že niektoré monodisperzné nanočastice si udržiavajú ich pôvodnú morfológiu a veľkosť. Obr. 19a ukazuje agregát pozostávajúci zo stovky nanočastíc, čo dokazuje, že aj agregované nanočastice môžu vstupovať do bunky. Na Obr. 19b sú vyobrazené nanočastice, ktoré prenikli do jadrovej obálky, avšak elektrónová hustota chromatinu (zobrazuje sa veľmi tmavo) nedovoľuje tieto nanočastice identifikovať vo vnútri jadra [82].



Obr. 19 TEM snímka zlatých nanočastíc (v krúžku) vo vnútri bunkovej línie HeLa [82].

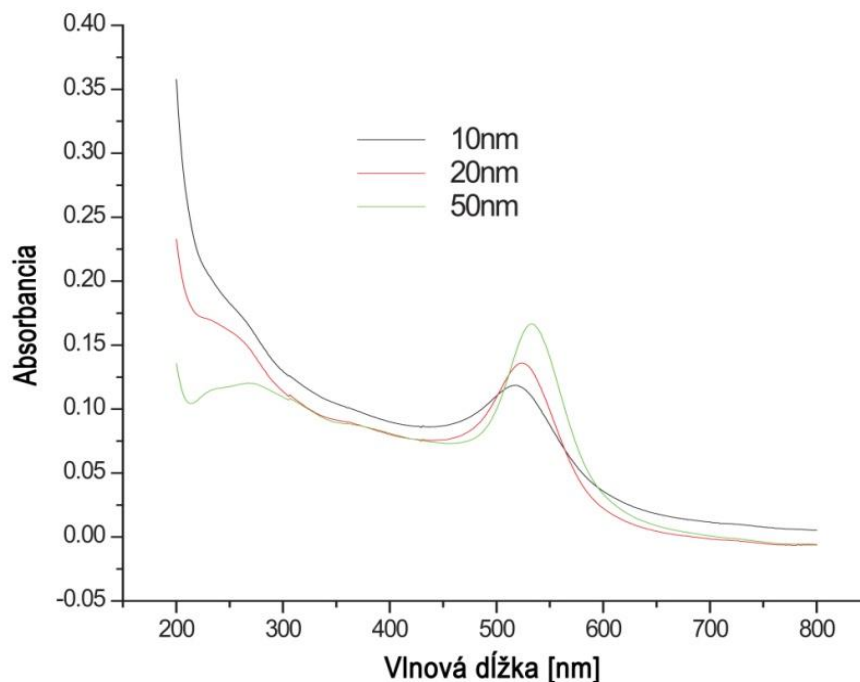
### 2.7.3 Energeticky disperzná röntgenová spektroskopia

Energeticky disperzná röntgenová spektroskopia (EDX) patrí medzi chemické mikroanalytické techniky používané v spojení so SEM, optickým mikroskopom alebo environmentálnym rastrovacím elektrónovým mikroskopom [83]. Cieľom tejto techniky je charakterizovať prvkové zloženie a prítomnosť nečistôt, ktoré daná analyzovaná vzorka obsahuje. EDX deteguje röntgenové lúče emitované zo vzorky ako dôsledok jej bombardovania elektrónovým zväzkom a tak poskytuje kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu vzorky. Pri kvalitatívnej analýze sú jednotlivé energie fotónov porovnávané so známymi hodnotami odpovedajúcim jednotlivým prvkom. Kvantitatívne výsledky sú dosiahnuté relatívnym počtom detegovaných RTG fotónov konkrétnej energie. Pri analýze môže dochádzať k prekryvaniu jednotlivých pík, čo je spôsobené prechodmi RTG fotónov medzi jednotlivými vrstvami v obale atómu častice [84,85].

### 2.7.4 Absorpčná spektroskopia v ultrafialovej a viditeľnej oblasti

Molekulová absorpčná spektroskopia v ultrafialovej a viditeľnej oblasti (UV-VIS) je rozšírená metóda pre charakterizáciu optických vlastností zlatých nanočastíc a ich nanokonjugátov, pretože intenzita a pozícia pásma SPR prislúcha ich veľkosti, tvaru, prípadne agregácií. Zaoberá sa meraním a interpretáciou elektrónových spektier molekúl látok, ktoré absorbujú elektromagnetické žiarenie v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm a tak vykresľuje závislosť veľkosti a pomeru kovových nanočastíc v roztoku v podobe absorpčných pásiem.

Absorpčné spektrum je charakteristické svojou energiou prechodu reprezentovanou vlnovou dĺžkou v nm a intenzitou absorpčných pásov reprezentovaných ako miera absorpcie v oblasti maxima pásu vyjadrená pomocou transmitancie alebo absorbancie. Roztoky zlatých nanočastíc absorbujú z bieleho slnečného žiarenia vlnové dĺžky v rozsahu 380–770 nm. Absorpčné maximum zlatých nanočastíc sa pohybuje okolo 520 nm a so zvyšujúcou sa veľkosťou dochádza k posunu pík smerom k vyšším vlnovým dĺžkam. (Obr. 20) [86]. Podobnú skutočnosť preukázal aj Wang et. al, keď citrátom stabilizované AuNPs modifikoval ľudským sérovým albumínom (HSA). Vplyvom modifikácie dochádza k zväčšovaniu nanočastíc a tým pádom k posunu píku k vyšším vlnovým dĺžkam o 2-4 nm a k jeho jemnému rozšíreniu [87]. Tento experiment bol však prevedený hneď po modifikácii HSA. K posunu spektra píku môže dochádzať aj v dôsledku starnutia nanočastíc, ale rovnako aj v dôsledku zmien média v ktorom sú rozpustené [88].



Obr. 20 Absorpčné spektrá zlatých nanočastíc s typickým absorpčným maximom pri 525–555 nm. [86].

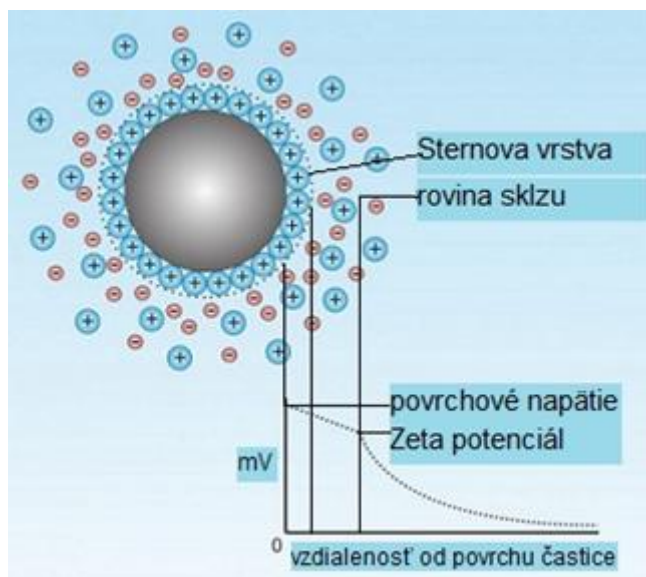
### 2.7.5 Dynamický rozptyl svetla

Vďaka povrchovej plazmónovej rezonancii poskytujú zlaté nanočastice výrazný rozptyl svetla, ktorý je jedným z princípov tejto metódy. Laserový lúč prechádza cez tlmič na kyvetu, v ktorej sú umiestnené zlaté nanočastice. Na základe Brownovho pohybu nanočastíc (menšie nanočastice sa pohybujú rýchlejšie, väčšie zas pomalšie) sú detektorom zachytávané výkyvy intenzity rozptýleného svetla pod uhlom  $173^\circ$  alebo  $90^\circ$ . Uhol natočenia detektoru závisí od použitého prístroja. Dynamický rozptyl svetla (DLS z angl. dynamic light scattering) je teda analytická metóda bohato používaná na stanovenie hydrodynamickej veľkosti a monodisperzity zlatých nanočastíc. Rovnako umožňuje analýzu stability a kvality nanočastíc po biokonjugácii na základe merania zmeny priemernej veľkosti nanočastice. Zároveň bolo dokázané, že DLS je schopný priamo a kvantitatívne merať väzbovú stechiometriu medzi proteínom pripojeným na AuNP a cieľovým analytom proteínu v roztoku [89].

### 2.7.6 Zeta potenciál

Meranie veľkosti Zeta potenciálu sa využíva k charakterizácii zmien elektrického potenciálu na rovine sklzu, a tak účinne predpovedá stabilitu a funkciu nanočastíc

v rôznych prostrediach. Táto rovina sa vytvára v dôsledku prítomnosti kvapaliny, ktorá nanočasticu obklopuje. Ióny, ktoré obklopujú nanočasticu v kvapaline sú usporiadané do dvoch vrstiev. Vo vnútornej tzv. Sternovej vrstve (Obr. 21), sa ióny silne viažu k nanočastici, pričom vo vonkajšej tzv. difúznej oblasti sa ióny viažu veľmi slabo. Potenciál vzniká v dôsledku difúzie nanočastice v roztoku, čiže s ňou aj jej „dvojvrstvy“. Potenciál vzniknutý na hranici tejto dvojvrstvy sa nazýva Zeta potenciál. Používa sa ku kvantifikácii povrchového náboja, koncentrácie, iónovej sily a pH prostredia zlatých nanočastíc. Vo všeobecnosti je vysoký Zeta potenciál ( $>25$  mV alebo  $< -25$  mV) charakteristický pre stabilné nanoštruktúry. Ak sa Zeta potenciál blíži k nule, príťažlivosť medzi nanočasticami presahuje odpudivé sily, čo vedie k ich aglomerácií [5]. Zeta potenciál môže rovnako potvrdiť naviazanie modifikačnej látky na povrch zlatej nanočastice, tak že pridaním modifikačnej látky k nanočasticiam sa Zeta potenciál značne približuje k Zeta potenciálu modifikačnej látky [87].



Obr. 21 Vznik Zeta potenciálu.[90]

## 3 Experimentálna časť

### 3.1 Chemikálie

Tab. 3 Zoznam použitých chemikálií

Názov	Chemický vzorec	Čistota	CAS číslo	Výrobca
Kyselina tetrachlorozlatitá, trihydrát	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\geq 49,0 \%$	16961-25-4	Sigma Aldrich
Citrát sodný, dihydrát	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\geq 98,0 \%$	6132-04-3	Sigma Aldrich
Glutatión	$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$	$> 98,0 \%$	70-18-8	Calbiochem
Polyetylén glykol s molárnou hmotnosťou 4000 g/mol	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$	$\geq 90,0 \%$	25322-68-3	Merck
3-[4,5-dimetyl-tiazol-2-yl]-2,5 difenyltetrazolium bromid (MTT)	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{S}$	$\geq 98,0 \%$	298-93-1	Sigma Aldrich
Dodecylsulfát sodný	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	$\geq 98,0 \%$	151-21-3	Merck

Pre prípravu roztokov a na prečisťovanie nanočastíc bola použitá voda Millipore získaná pomocou prístroja Millipore® Synergy® s UV. Pri meraní cytotoxicity bolo používané komerčne dostupné EMEM médium (Sigma Aldrich).

## 3.2 Použité prístroje

- Rastrovací elektrónový mikroskop Tescan FE MIRA II LMU
- pH meter Cybescan PC 6500
- Mikroskopový čítač Infinite M200 Pro, Tecan
- Spektrofotometer Spectronic Helios Alfa
- Zetasizer Nano ZS ZEN 3500, Malvern Instruments Ltd.
- Chladič Huber Petite Fleur
- Laboratórna sušička Memmert
- Varič a magnetická miešačka Heidolph MR Hei-end
- Ultracentrifúga Minispin plus Eppendorf
- Ultrazvuk SONOREX DIGITAL 10P

## 3.3 Syntézy zlatých nanočastíc

V experimentálnej časti boli všetky syntézy zlatých nanočastíc prevedené na základe Turkevichovej metódy pri rôznych koncentráciách kyseliny tetrachlorozlatej a citrátu sodného s malými úpravami podľa referencií [36,91,92]. Pre jednoduchú orientáciu sú vzorky ďalej označené písmenami A, B, C. Vzorka A bola pripravená nasledovne: pri zahriatí roztoku s  $\text{HAuCl}_4$  na  $97\text{ }^\circ\text{C}$  za stáleho miešania pri 700 otáčkach došlo k pridaniu celého množstva citrátu sodného. Roztok bol nasledovne varený po istý čas. Vzorka B bola pripravovaná rovnako ako vzorka A, ale navyše v olejovom kúpeli v kruhovej banke, a po zmene farby vplyvom redukcie zlatitých iónov citrátom sodným refluxovaná pri  $10\text{ }^\circ\text{C}$ . U vzorky C bol citrát sodný prikvapkávaný postupne (1kvapka/1sekunda) do roztoku kyseliny tetrachlorozlatej. Presné pomery chemikálií v jednotlivých syntézach a parametre ako je doba varenia ukazuje Tab. 4.

Nanočastice boli po každej syntéze trikrát prečisťované vo vode pomocou ultracentrifúgy Minispin plus Eppendorf. Po odpipetovaní supernatantu boli nanočastice rozdispergované vo vode pomocou ultrazvuku. Centrifugácia prebiehala pri 14500 otáčkach po dobu 10 min pre vzorky A2, B, C a 15 min v prípade vzorky A1.

Tab. 4 Jednotlivé množstvá chemikálií potrebných k syntéze AuNPs

	<b>HAuCl<sub>4</sub> [93]</b>	<b>Doplnené vodou na objem [ml]</b>	<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [93]</b>	<b>Doplnené vodou na objem [ml]</b>	<b>Objemový pomer roztoku HAuCl<sub>4</sub> a C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [ml]</b>	<b>Doba varenia [min]</b>
<b>A1</b>	19,65	100	512,60	25	100:5,7	15
<b>A2</b>	19,65	100	512,60	25	100:1,34	15
<b>B</b>	4,10	100	114,60	10	100:10	15
<b>C</b>	19,69	100	2,98	100	4:100	20

### 3.3.1 Modifikácia syntetizovaných zlatých nanočastíc

Pre modifikáciu povrchu zlatých nanočastíc bol použitý glutatión. Vzhľadom k jeho známej funkcií v organizme v boji proti vzniku voľných kyslíkových radikálov, sa dá predpokladať, že môže zamedzovať a znižovať cytotoxicitu zlatých nanočastíc. Navyše obsahuje tiolovú skupinu, ktorá vykazuje veľmi dobrú afinitu k zlatu. Ako ďalšia povrchová modifikačná látka bol zvolený široko používaný polyetylénglykol k zlepšeniu monodisperzity a biokompatibility zlatých nanočastíc k bunkám a tkanivám organizmu.

Vzorky A1 a A2 boli modifikované pridaním glutatiónu v pomere 5 mg glutatiónu na 10 ml pripraveného prečisteného roztoku za stáleho miešania po dobu 1 minúty pri 300 otáčkach.

Vzorka B bola modifikovaná pridaním PEG v pomere 10 mg na 10 ml pripraveného prečisteného roztoku za stáleho miešania po dobu dvoch hodín pri 650 otáčkach, aby došlo k dostatočnej výmene ligandov citrátu k PEG.

### **3.4 Metódy charakterizácie zlatých nanočastíc**

#### **3.4.1 Analýza pomocou rastrovaciej elektrónovej mikroskopie**

Analýza základného rozmeru a tvaru pripravených zlatých nanočastíc bola prevedená pomocou rastrovacieho elektrónového mikroskopu Tescan FE MIRA II LMU. Vzorky k pozorovaniu boli pripravované drop-coatingem 5  $\mu\text{l}$  prečistených zlatých nanočastíc na kremíkovom waferi a vysušených v sušičke pri 60  $^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.4.2 Dynamický rozptyl svetla a meranie Zeta potenciálu**

Analýza DLS a Zeta potenciálu boli získané pomocou prístroja Zetasizer Nano ZS ZEN 3500 od Malvern Instruments Ltd na Mendelovej Univerzite v Brne. DLS analýza prebiehala pri teplote 23  $^{\circ}\text{C}$  za použitia 40  $\mu\text{l}$  prečisteného roztoku zlatých nanočastíc. Meranie Zeta potenciálu prebiehalo pri teplote 25  $^{\circ}\text{C}$  s množstvom 1 ml prečistených nanočastíc v elektrochemickej kyvete.

#### **3.4.3 Spektroskopia vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti**

UV-VIS meranie zlatých nanočastíc bolo prevedené pomocou dvojlúčového spektrofotometra Spectronic Helios Alfa na Fakulte Chemickej, VUT v Brne. K analýze boli použité 3 ml prečistených nanočastíc. K získaniu výsledných optických vlastností bola použitá wolfrámová lampa a merané spektrum v rozmedzí vlnových dĺžok od 400 do 700 nm.

### **3.5 Cytotoxicita syntetizovaných AuNPs**

Pre určenie cytotoxicity zlatých nanočastíc boli zvolené nasledujúce navážky (vzorka A1 = 0,7 mg; vzorka A2 = 1,1 mg; vzorka B = 0,17 mg), ktoré boli rozdispergované v 1 ml EMEM média. Prečistené nanočastice boli vysušené pri 60  $^{\circ}\text{C}$ .

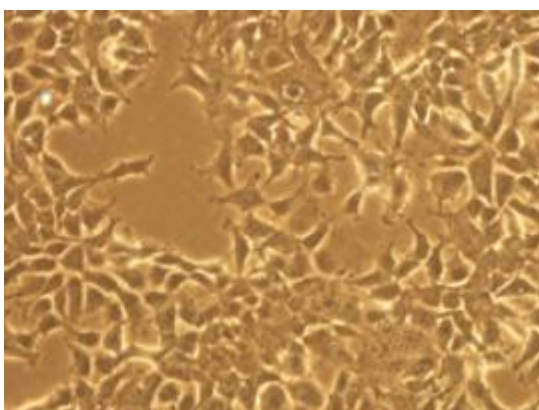
K určení toxicity nanočastíc bola použitá bunková línia HEK 293 (Human Embryonic Kidney). Bunky boli nasadené v 96 jamkovej doštičke (hustota buniek:  $4 \cdot 10^4$  buniek/jamka) spolu s médiom (200  $\mu\text{l}$ ). Takto pripravené bunky boli uložené v inkubátore s obsahom  $\text{CO}_2$  5 % pri 37  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hodín. Potom bolo toto médium opatrne odstránené a bunky znovu premyté pridaním 200  $\mu\text{l}$  nového média. K bunkám sa pridali nanočastice v takých množstvách, aby vznikli koncentrácie 5, 10, 30, 50, 80  $\mu\text{l/ml}$ . Po pridaní nanočastíc boli bunky znovu uložené v 5%  $\text{CO}_2$  inkubátore pri 37  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hodín. Po 24 hodinách bolo médium z buniek odstránené, pridalo sa

150  $\mu$ l MTT v koncentrácii 0,5 mg/ml a bunky boli znovu inkubované po dobu 3 h. Potom sa MTT opatrne odstránil a pridalo sa 150  $\mu$ l 10 % SDS, ktorý napomáha k rozpusteniu kryštálov formazánu. Následne boli bunky inkubované v tme pri pokojovej teplote po dobu 24 hodín a výsledná viabilita buniek bola získaná na základe spektrofotometrického merania pri vlnovej dĺžke 570 nm a stanovená podľa výpočtov z nasledujúcich rovníc:

$$viabilita = \left( \frac{A_{vzorky}}{A_{kontroly}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

$$A_{vzorky} = \frac{A_1 + A_2 + A_3}{3} \quad (6)$$

Pre zvýšenie presnosti merania boli jednotlivé koncentrácie nanočastíc nanášané v triplikátoch pre každú vzorku. Z rovnice (6) je potom vypočítaná priemerná hodnota absorbancie  $A_{vzorky}$ . Výsledná hodnota viability bola stanovená na základe rovnice (5), kde  $A_{kontroly}$  predstavuje absorbanciu buniek bez nanočastíc [94].



*Obr. 22 Bunková línia HEK 293 zachytená pomocou optického mikroskopu použitá pri meraní cytotoxicity [95].*

## 4 Výsledky a diskusia

Pripravené zlaté nanočastice boli podrobené analýzam SEM, UV-VIS, DLS, meraniu Zeta potenciálu a v neposlednej rade boli spektrofotometricky hodnotené účinky ich toxicity na bunkovú líniu HEK 293.

### 4.1 Stabilita AuNPs

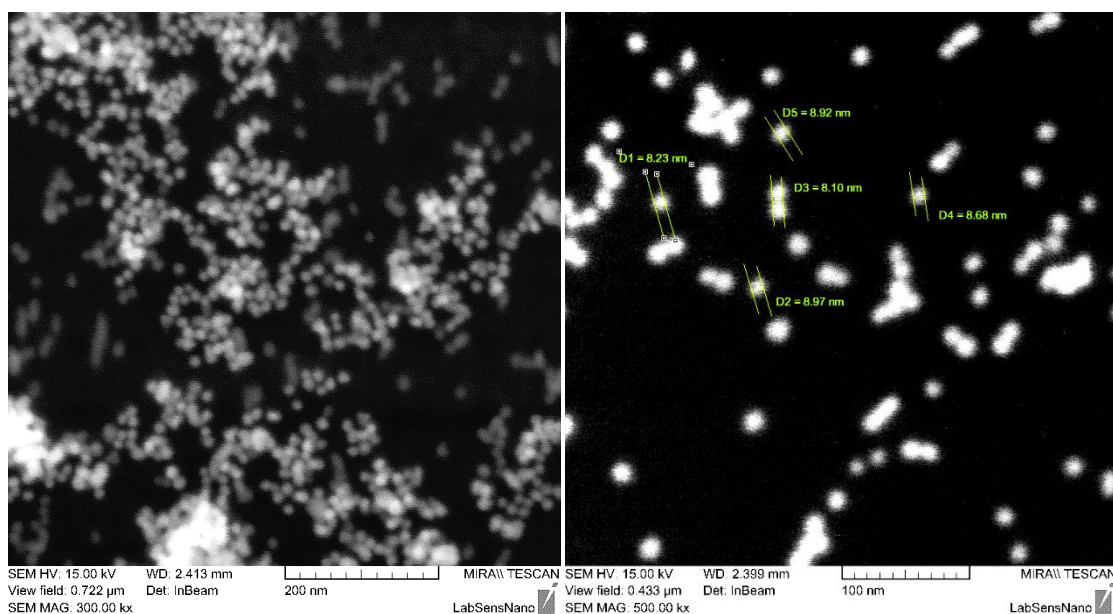
Predbežná stabilita nanočastíc sa dá vyvodíť už na základe pH merania, ktoré by sa pri syntéze Turkevichovou metódou malo pohybovať v rozmedzí od 4,5–10 pre stabilné štruktúry [18]. Nižšie v tabuľke sú uvedené hodnoty pH, ktoré dosahujú jednotlivé vzorky po syntéze, po prečisťovaní a po funkcionalizácii glutatiónom. Prečisťovaním sa odstráni supernatant, ktorý obsahuje zvyšky nezreagovaných činidiel zo syntézy a z modifikácie. Z Tab. 5 je patrné, že prečisťovaním sa pH roztokov zvyšuje z kyslého na neutrálne, čo je zrejme spôsobené odstránením nenaviazaného citrátu sodného [36]. Následne si môžeme všimnúť zmenu pH roztoku vzorky A1 a A2 po modifikácii GSH, ktorého hodnoty sa pohybujú na hrane stability, došlo teda k výraznému zvýšeniu kyslosti.

*Tab. 5 Hodnoty pH zlatých nanočastíc po syntéze, prečisťovaní a modifikácii.*

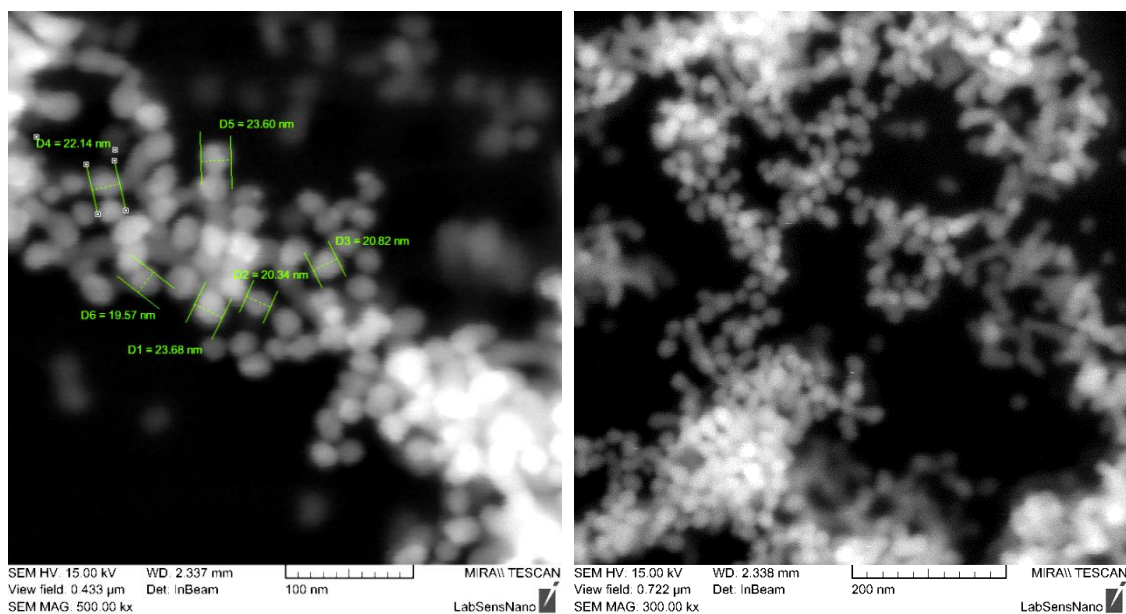
	<b>pH neprečistených nanočastíc po syntéze</b>	<b>pH po prečistení ihneď po syntéze</b>	<b>pH neprečistených nanočastíc po 7 dňoch</b>	<b>pH po modifikácii GSH</b>
<b>A1</b>	6,72	7,73	6,54	4,24
<b>A2</b>	4,48	7,35	4,01	4,31
<b>B</b>	7,19	7,96	7,17	
<b>C</b>	6,87	7,75	6,64	

## 4.2 Analýza AuNPs pomocou rastrovacej elektrónovej mikroskopie

Ako je viditeľné z *Obr. 23*, vzniknuté nanočastice vzorky A1 majú prevažne sférický tvar a dosahujú veľkosť približne 8–9 nm. Rovnako *Obr. 24* ukazuje sférický tvar nanočastíc vzorky A2 s veľkosťou okolo 20–23 nm. Obe vzorky boli pripravované z reagentov v rovnakých koncentráciách a pri tých istých podmienkach vid' Tab. 4. Nanočastice sa teda odlišujú len v rozdielnom množstve pridaného citrátu sodného. Tým sa potvrdzuje fakt, že pridaním väčšieho množstva citrátu (5,7 ml) vznikajú menšie nanočastice (A1 dosahuje v priemere 8 nm) a pridaním menšieho množstva citrátu (1,34 ml) majú nanočastice tendenciu vytvárať väčšie štruktúry (A2 dosahuje v priemere 20 nm). Nastavenie menšieho zväčšenia (300 kx, kde kx značí tisíckrát) dovoľuje záber na pole s väčšou veľkosťou, čo umožňuje lepšie pozorovanie rozloženia a disperzity nanočastíc. Nanočastice sa v oboch prípadoch javia jednotné v tvare, avšak na niektorých miestach sa objavujú väčšie či menšie zhluky, ktoré môžu byť vytvorené vplyvom sušenia, pri ktorom sa nanočastice nahromadia na seba. Prítomnosť väčších častíc, než je definovaná veľkosť syntetizovaných zlatých nanočastíc, je pripisovaná zbytkovej organike (citrát sodný), ktorá sa dostatočne neodstránila pri premývaní.

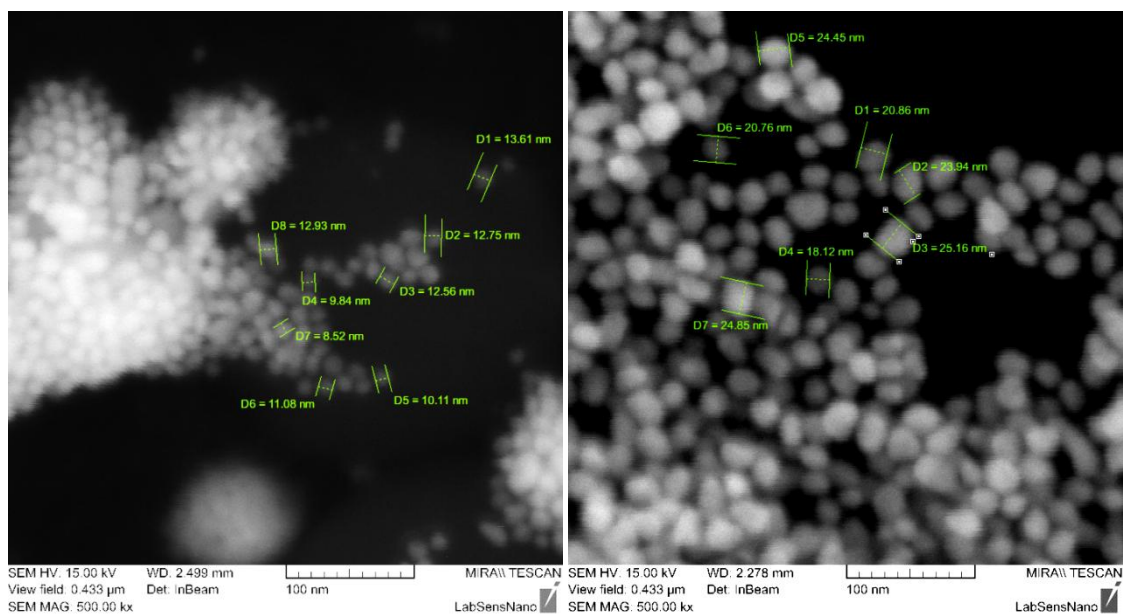


*Obr. 23 SEM snímky zlatých nanočastíc vzorky A1 bez modifikácie GSH pri zväčšení 300 kx (vľavo) a 500 kx (vpravo).*



*Obr. 24 SEM snímky zlatých nanočastíc vzorky A2 bez modifikácie GSH pri zväčšení 500 kx (vľavo) a 300 kx (vpravo).*

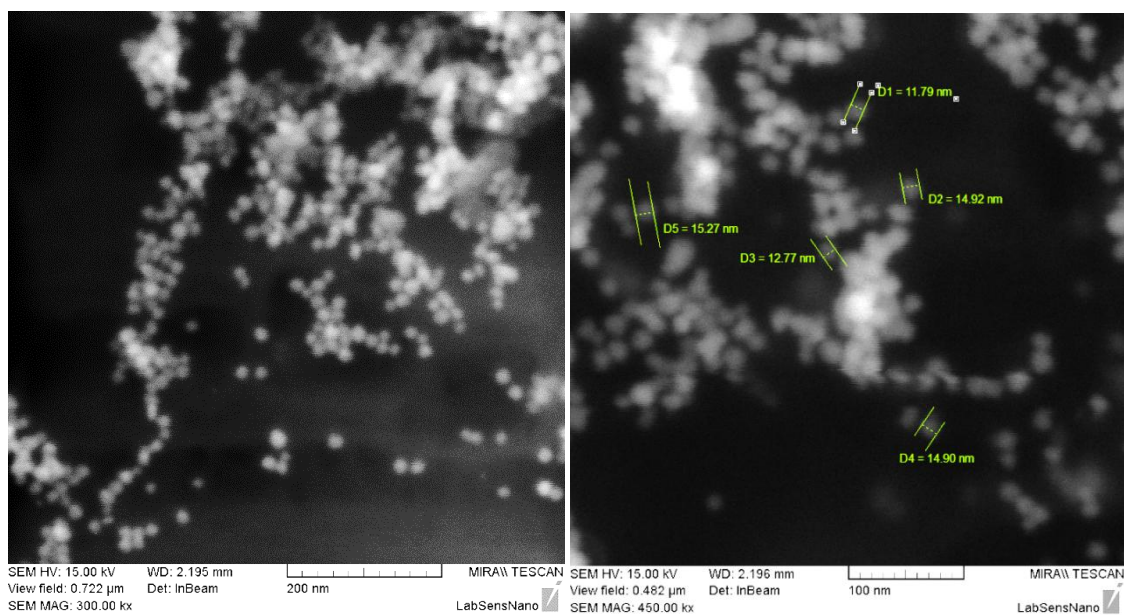
Na priloženom *Obr. 25* sa nachádzajú vzorky A1 a A2 po modifikácii glutatiómom zachytené pri zväčšení 500 kx, z ktorých je vidieť, že aj po modifikácii biomolekulou si zachovávajú svoj sférický tvar.



*Obr. 25 SEM snímky zlatých nanočastíc modifikovaných pomocou GSH: vzorka A1 vľavo a A2 vpravo pri zväčšení 500 kx.*

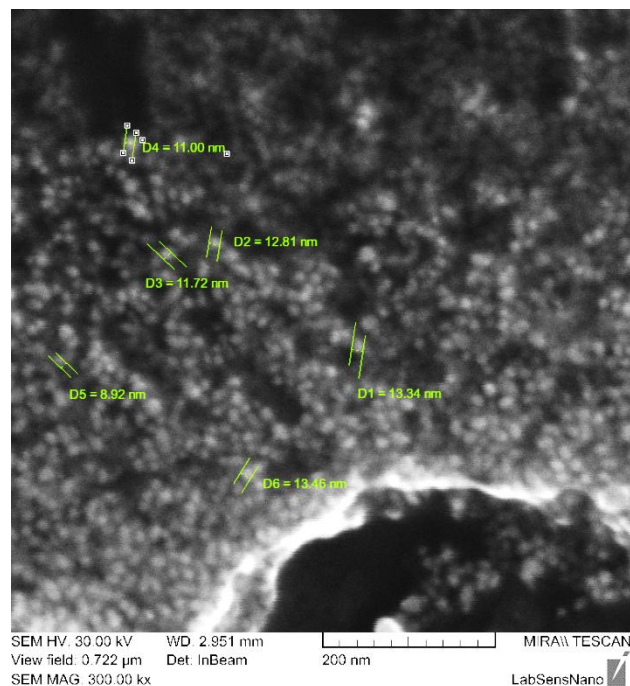
Taktiež je možné pozorovať, že nanočastice po modifikácií zväčšili svoju veľkosť, avšak pre detekciu naviazania glutatiónu na zlatú nanočasticu by bola vhodnejšia metóda UV-VIS alebo Zeta potenciál. Oba typy nanočastíc majú tendenciu vo väčšej miere vytvárať zhluky s porovnaním s nanočasticami bez modifikácie. Vznik týchto agregátov by mohol byť spôsobený vodíkovými väzbami medzi molekulami glutatiónu [18].

Na *Obr. 26* sa nachádzajú zlaté nanočastice vzorky B, ktoré majú svoj povrch modifikovaný polyetylén glykolom. Nanočastice majú požadovaný sférický tvar a veľkosť 11–15 nm. Z obrázkov možno pozorovať tvorbu zhlukov, ktoré by u týchto častíc nemali byť prítomné kvôli typickým vlastnostiam polyetylén glykolu. Ako polymér obsahuje dlhé reťazce na povrchu nanočastíc, a tak zabezpečuje nanočastice proti zhlukovaniu. Tvorba agregátov by mohla prislúchať sušeniu nanočastíc, pri príprave vzoriek na analýzu SEM.



*Obr. 26 SEM snímky PEG modifikovaných zlatých nanočastíc vzorky B pri zväčšení 300 kx (vľavo) a 450 kx (vpravo).*

Na *Obr. 27* je sa nachádzajú zlaté nanočastice vzorky C, ktorá nepodliehala žiadnej modifikácií. Pokrytie nanočastíc sa javí monodisperzne, s približným sférickým tvarom a s orientačnými veľkosťami častíc 9–13 nm.

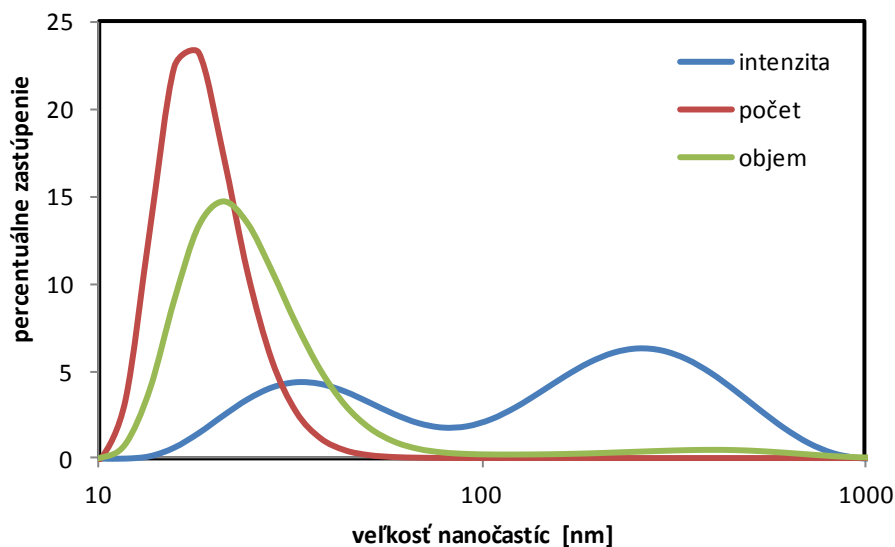


Obr. 27 SEM snímka zlatých nanočastíc vzorky C pri zväčšení 300 kx.

### 4.3 Analýza AuNPs pomocou dynamického rozptylu svetla

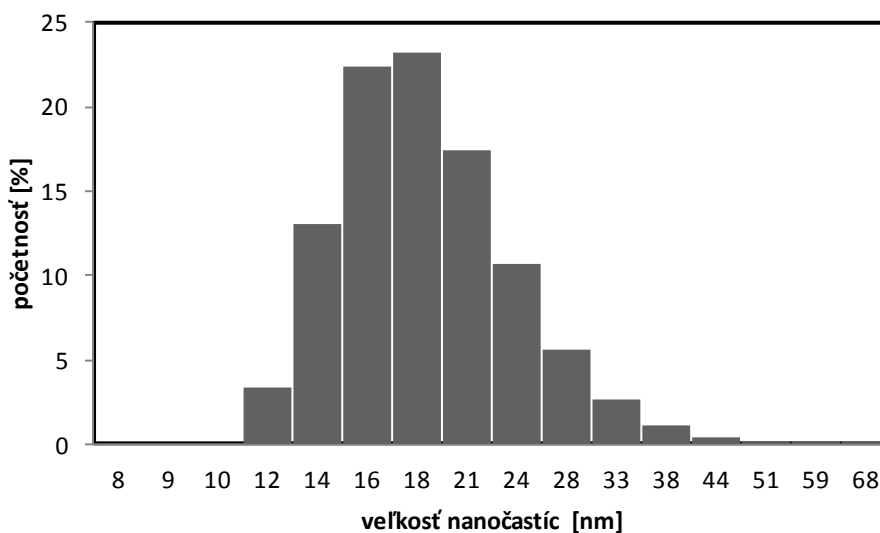
Analýza DLS umožňuje presnejšie stanovenie veľkosti a monodisperzity nanočastíc než SEM. V kapitole sú uvádzané grafy určujúce veľkosť nanočastíc z hľadiska merania ich percentuálneho zastúpenia veľkosti, počtu a objemu. Nakoľko tieto grafy obsahujú logaritmickú mierku, k ľahšiemu určeniu veľkosti a disperzity nanočastíc bol vytvorený stĺpcový diagram.

Na Obr. 28 je vyobrazený graf, ktorý prislúcha nanočasticiam zo vzorky A1 bez modifikácie povrchu. Široké píky určujúce veľkosť nanočastíc na základe intenzity, počtu a objemu naznačujú prítomnosť polydisperzných častíc. Spektrum prislúchajúce intenzite vykazuje dva píky. Krivku prislúchajúcu intenzite dopĺňujú krivky hodnotiace percentuálne zastúpenie nanočastíc na základe objemu a početnosti. V tomto prípade sú tieto údaje smerodajné, pretože druhý pík intenzity je síce väčší ale neobsahuje žiadne prekrývajúce sa píky hodnotiace veľkosť nanočastíc z objemového a počtového hľadiska.



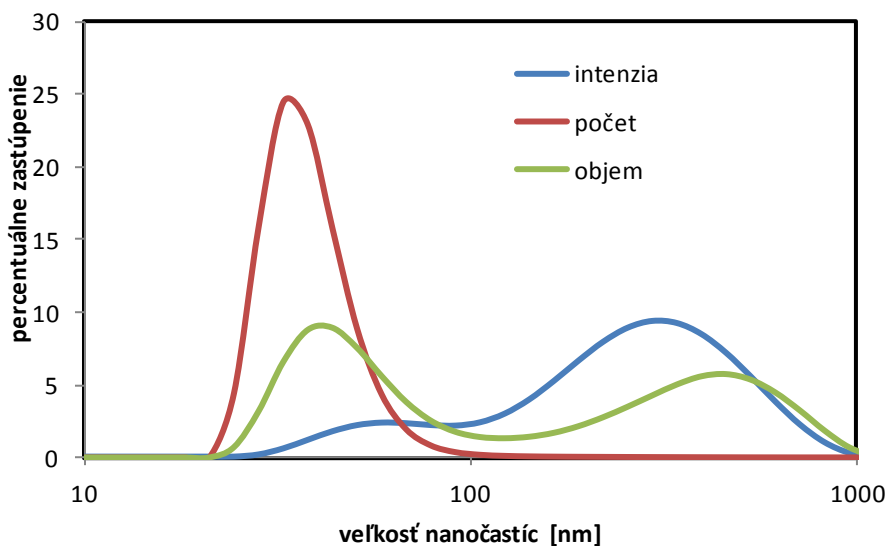
Obr. 28 DLS analýza veľkosti nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky A1 bez povrchovej modifikácie.

Na základe poznatkov z grafu na Obr. 28 bol vytvorený histogram (Obr. 29), ktorý reprezentuje percentuálnu distribúciu jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc. Z grafu je teda patrné, že koloidný roztok A1 bude obsahovať nanočastice o veľkosti 16, 18 a 21 nm a to v miere väčšej než 55 %. V porovnaní so SEM analýzou je táto veľkosť nanočastíc dvojnásobne väčšia v dôsledku agregácie, vplyvom ich starnutia.

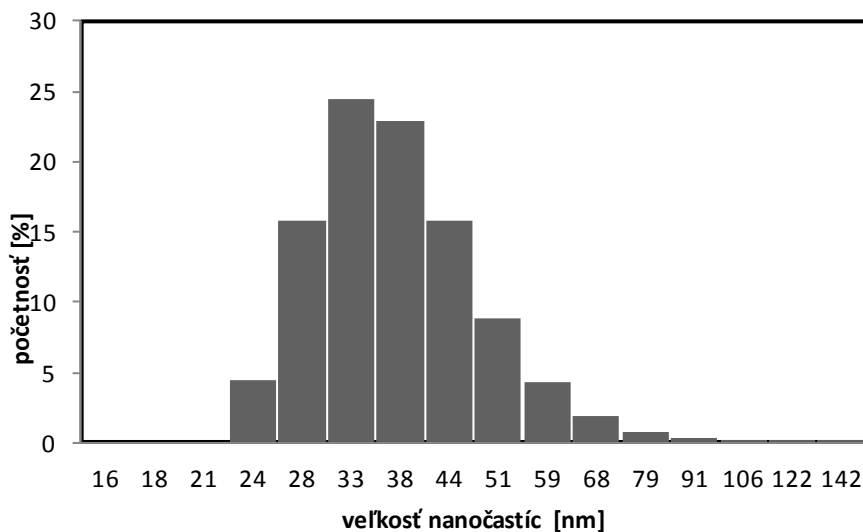


Obr. 29 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke A1 bez povrchovej modifikácie.

Na *Obr. 30* sa nachádzajú DLS krivky pre zlaté nanočastice vzorky A2 bez povrchovej modifikácie. Rovnako ako na *Obr. 28*, aj tu sa objavuje v spektre predstavujúcom veľkosť nanočastíc vyjadrenej pomocou intenzity druhý pík, ku ktorému sa pridáva „objemový“ pík. Smerodajný je teda prvý, červený pík, ktorého hodnoty sú prenesené do grafu na *Obr. 31*. Z grafu vyplýva, že najviac zastúpenými časticami vo vzorke A2 budú častice s veľkosťou 33 a 38 nm.

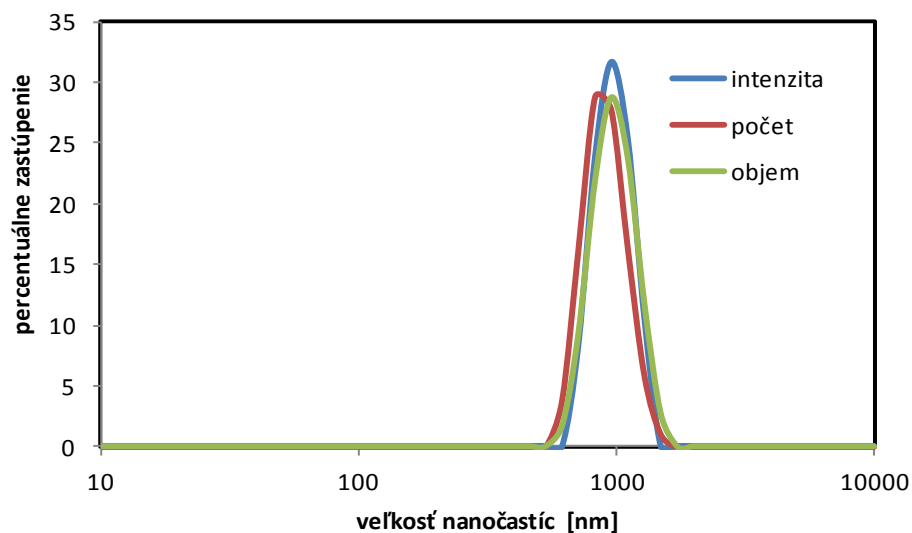


*Obr. 30* DLS analýza veľkosti nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky A2 bez povrchovej modifikácie.

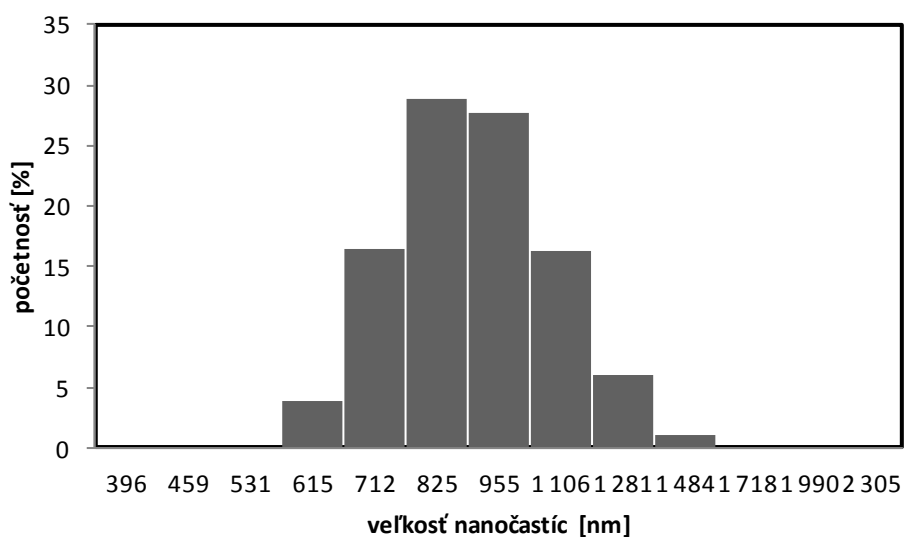


*Obr. 31* Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke A2 bez povrchovej modifikácie..

Grafy na *Obr. 32* a na *Obr. 33* znázorňujú veľkosť nanočastíc vzorky A1 po modifikácií glutatiómom. V Tab. 5 je možné vidieť, že po modifikácií sa pH nanočastíc výrazne zníži – na hranu stability. Nakoľko DLS analýza bola meraná vždy až po niekoľkých dňoch, výsledky ukazujú agregované nanočastice s veľkosťou okolo 1  $\mu\text{m}$ . Agregácia vzniká v dôsledku vodíkových väzieb medzi molekulami glutatiónu. Úprava pH týchto nanočastíc by mohla byť prevedená ďalšou funkcionalizáciou, ktorá by závisela od konkrétnej bioaplikácie.

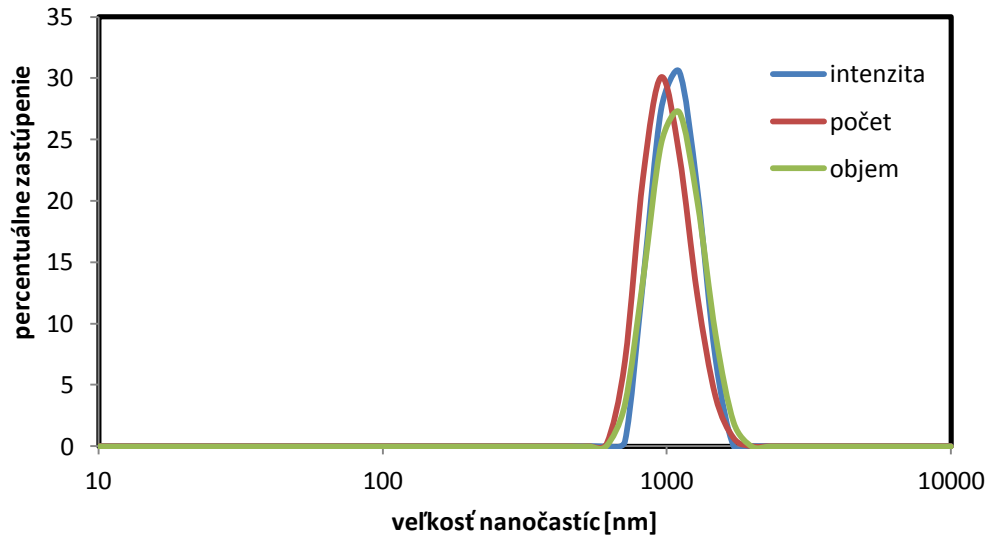


*Obr. 32 DLS analýza veľkosti nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky A1 s GSH.*

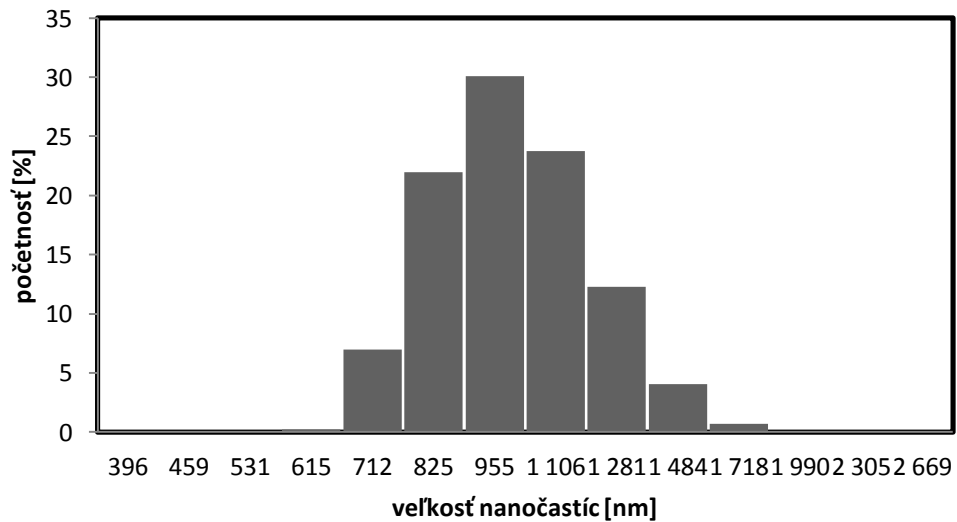


*Obr. 33 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke A1 s modifikáciou GSH.*

Podobná situácia nastala u vzorky A2 funkcionalizovanej glutatiónom, pre ktorú sú charakteristické rovnako jednotné, prekrývajúce sa píky v intenzite, počte a objeme (Obr. 34 a Obr. 35). Priemerná veľkosť agregovaných nanočastíc sa pohybuje okolo 955 nm.

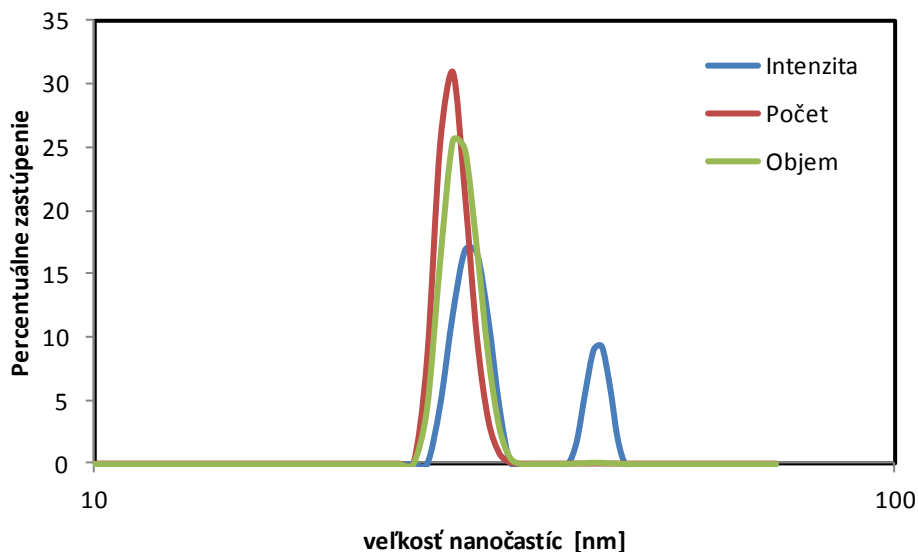


Obr. 34 DLS analýza veľkostí nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky A2 s GSH

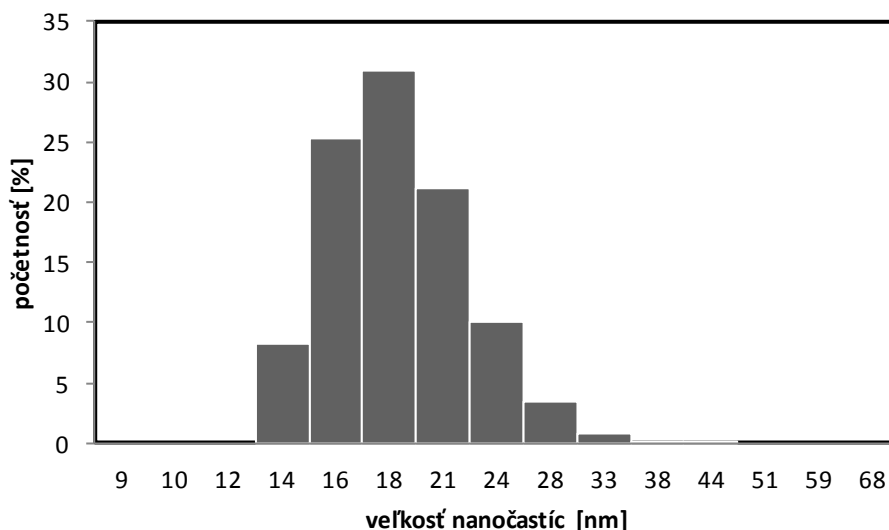


Obr. 35 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke A2 s modifikáciou GSH.

Z grafu na *Obr. 36* je vidieť, že zlaté nanočastice modifikované PEG majú takmer rovnomerne prekrývajúce sa spektrá percentuálneho zastúpenia intenzity, objemu a počtu. Druhý, menší pík reprezentujúci percentuálne zastúpenie intenzity zlatých nanočastíc môže naznačovať prítomnosť jednej - dvoch nanočastíc, alebo prítomnosť prachovej častice. Stĺpcový graf na obrázku *Obr. 37* ukazuje, že nanočastice sú polydisperzné s hodnotami 14, 16, 18, 21, 24 a 28 nm, avšak najväčšie zastúpenie v roztoku majú nanočastice s veľkosťou 18 nm.



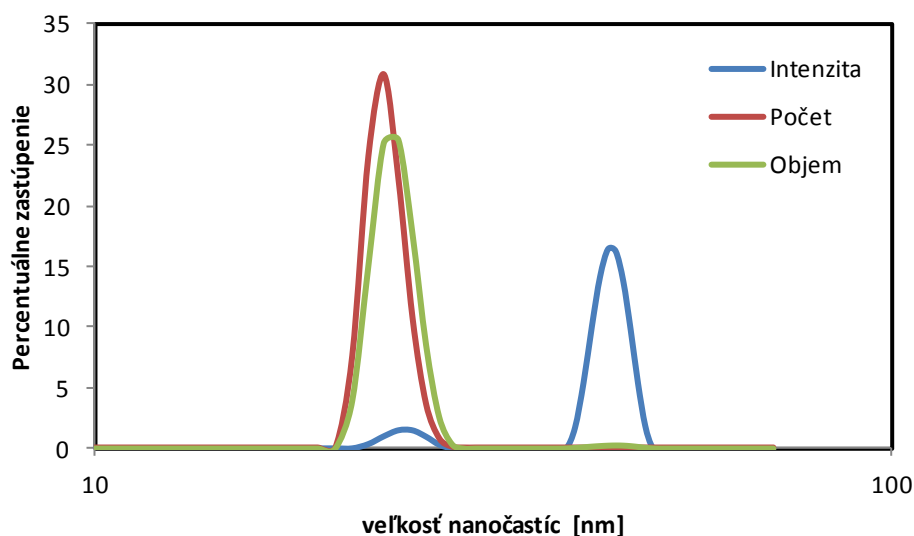
*Obr. 36 DLS analýza znázorňujúca veľkosť nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky B.*



*Obr. 37 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke B.*

DLS teda predkladá len o málo vyššie rozmery nanočastíc v porovnaní so SEM analýzou vzorky B a môžem tvrdiť, že výsledky takmer korelujú a odpovedajú vplyvom starnutia vzorky, nakoľko DLS analýza bola prevádzaná o 7 dní neskôr.

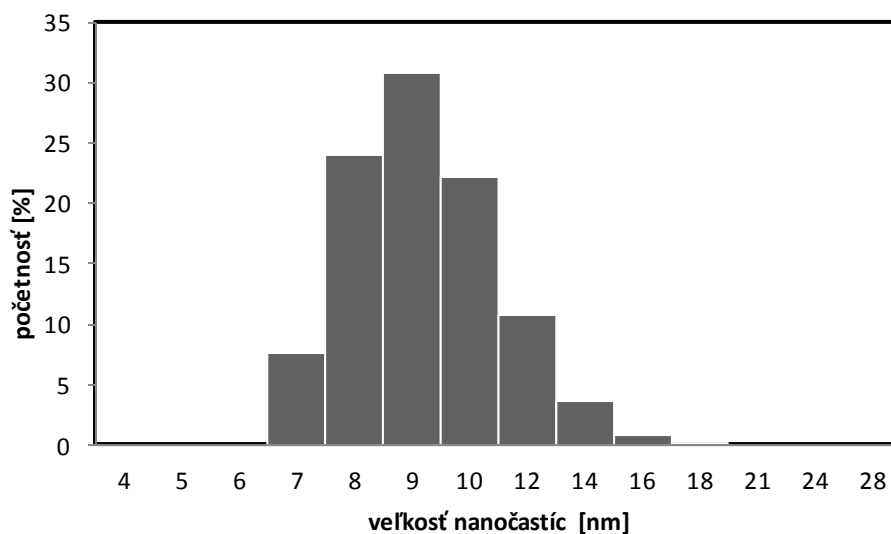
Graf na *Obr. 38* znázorňuje podobne ako u predchádzajúcich vzoriek distribúciu veľkosti, intenzity a objemu nanočastíc.



*Obr. 38 DLS analýza znázorňujúca veľkosť nanočastíc z hľadiska distribúcie intenzity, počtu a objemového zastúpenia AuNPs vzorky C.*

Je vidieť, že veľké percentuálne zastúpenie veľkosti nanočastíc z hľadiska počtu a objemu sa objavuje len s malou intenzitou (<5%), kdežto veľká intenzita (okolo 15 %) prislúcha takmer nulovému zastúpeniu veľkosti nanočastíc v podobe počtu a objemu. Podobne ako u častíc B platí, že percentuálne zastúpenie intenzity zlatých nanočastíc môže naznačovať prítomnosť jednej - dvoch nanočastíc, alebo prítomnosť prachovej častice. V prípade vzorky C sa veľkosť nanočastíc z DLS analýzy najviac približuje SEM analýze.

Z grafu na *Obr. 39* je vidieť, že vzorka C obsahuje polydisperzné nanočastice s najväčším zastúpením veľkosti 9 nm. SEM analýza ukazuje rozmer nanočastíc od 9 do 13 nm (*Obr. 27*).



Obr. 39 Histogram percentuálneho zastúpenia jednotlivých veľkostí zlatých nanočastíc vo vzorke C.

#### 4.3.1 Zhodnotenie výsledkov DLS a SEM analýzy

Ako ukazuje Tab. 6 DLS analýza vykazuje väčšie rozmery nanočastíc než SEM analýza. Nakoľko DLS analýza bola prevedená neskôr než SEM analýza, môžeme tieto rozdiely pripisovať dobe starnutia vzoriek a ich agregácií. U nanočastíc modifikovaných s GSH je tento rozdiel markantný, avšak už nízke pH vzoriek naznačuje, že nanočastice sa budú zhlukovať vplyvom tvorby vodíkových väzieb. Z tohto uhlu pohľadu si najvyššiu stabilitu zachovali vzorky B a C, čo by ich mohlo predurčovať k ďalšej funkcionalizácii.

Tab. 6 Hodnoty určujúce veľkosť nanočastíc (nm) na základe SEM a DLS analýzy

Analýza	A1-GSH	A2-GSH	A1+GSH	A2+GSH	B	C
SEM	8–9	20–23	10–14	19–25	11–15	9–13
DLS	18	33	825	955	18	9

#### 4.4 Zeta potenciál

Výsledky merania Zeta potenciálu pripravených nanočastíc sú zaznamenané v *Tab. 7*. Vzorky boli analyzované bez povrchovej modifikácie s výnimkou vzorky B, ktorá obsahovala PEG na svojom povrchu. Vzhľadom k relevantným hodnotám Zeta potenciálu uvádzaného v literatúre (rozmedzie nad +30 alebo pod -30 mV; niektorá literatúra uvádza rozmedzie nad +25 alebo pod -25 mV) [5], môžeme vzorky so zlatými nanočasticami považovať za stabilné.

*Tab. 7 Hodnoty Zeta potenciálu syntetizovaných nanočastíc. Vzorky A1 a A2 podliehali analýze bez modifikácie GSH.*

Vzorky	A1	A2	B	C
Zeta potenciál	-39,8	-32,2	-26,1	-38,4

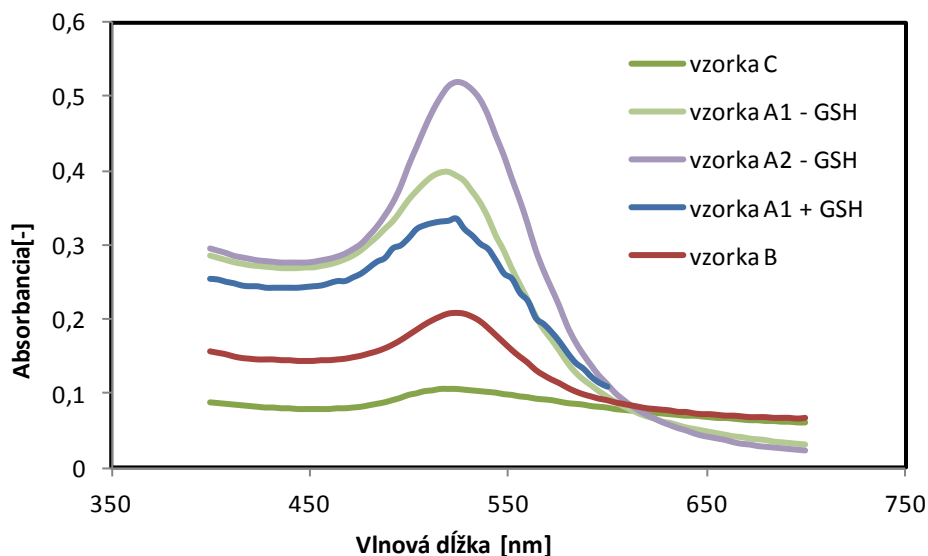
Všetky vzorky vykazovali záporný Zeta potenciál, čo odpovedá ich negatívnemu povrchovému náboju. Najvyššiu hodnotu Zeta potenciálu obsahuje vzorka B. Je to spôsobené dlhými hydrofilnými reťazcami PEG na povrchu nanočastíc, ktoré zatieňujú jej náboj. Podobné výsledky boli dokázané v štúdií, kde PEG modifikované sférické zlaté nanočastice vykazovali nižší negatívny náboj ako nemodifikované sférické AuNPs [96].

#### 4.5 Absorpčná spektroskopia vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti

Medzi nanočastice, ktoré boli charakterizované pomocou UV-VIS patrili vzorky A1 a A2 bez modifikácie povrchu, vzorka A1 s modifikáciou GSH, vzorka B a vzorka C.

UV-VIS dokazuje prítomnosť a vlastnosti (veľkosť) nanočastíc na základe tvaru a polohy píku (*Obr. 40*), pričom šírka píku sa zo zvyšujúcou veľkosťou nanočastíc znižuje (v prípade nanočastíc do 25 nm). Pri časticách s rozmermi väčšími než 25 nm sa šírka píku zvyšuje [97]. Výška píku udáva informácie o absorpcii svetla vzorkou. Vyšší pík je charakteristický pre koncentrovanejšie roztoky zlatých nanočastíc a nižší zas pre zriedené.

Absorpčné pásma v grafe dokazujú prítomnosť zlatých nanočastíc svojou polohou absorpčného maxima, ktoré sa nachádza na 520 nm u vzoriek A1, B a C. Vzorka A2 vykazuje posun absorpčného maxima o 4 nm smerom k vyšším hodnotám vlnových dĺžok v dôsledku prítomnosti väčších častíc [86]. K posunu spektrálneho maxima taktiež dochádza aj vplyvom modifikácie povrchu nanočastíc. Vzorka A1+GSH má svoje absorpčné maximum pri 522 nm. Dochádza k posunu o 2 nm, ktoré môže byť pripísané k naviazaniu glutatiónu na ich povrch [87].



Obr. 40 Absorpčné pásma syntetizovaných zlatých nanočastíc.

## 4.6 Cytotoxicita

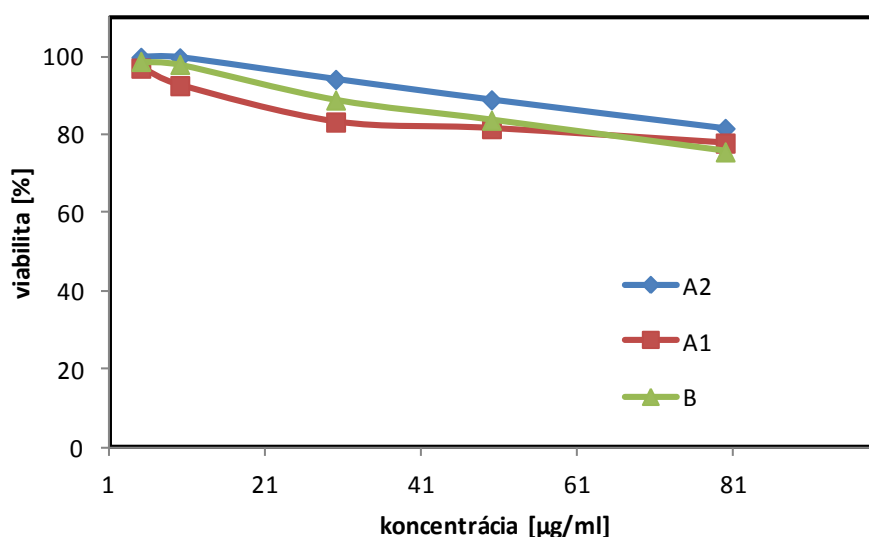
Cytotoxicita AuNPs bola hodnotená pomocou MTT testu na vzorkách A1, A2 a B, pričom všetky tieto vzorky podliehali povrchovej modifikácii (A1,A2-glutatión, B-polyetylén glykol). Vzorky A1 a A2 boli pripravované pri rovnakých koncentráciách reagujúcich látok, líšia sa len svojou veľkosťou. Hodnoty koncentrácií nanočastíc pridávaných k bunkám a hodnoty viability sú uvedené v tabuľke Tab. 8. Z hodnôt bol vykreslený graf závislosti životaschopnosti buniek od koncentrácie daných nanočastíc.

Z grafu na Obr. 41 je možné vidieť, že u všetkých vzoriek sa so zvyšujúcou koncentráciou zlatých nanočastíc znižuje viabilita buniek. Väčšie nanočastice v prípade vzorky A2 spôsobujú nižšiu cytotoxicitu vo všetkých koncentráciách s porovnaním s menšími nanočasticami vzorky A1. Podobná skutočnosť bola preukázaná rovnako na základe MTT testu po 48 hodinách podľa referencie [36], kde menšie nanočastice

s modifikáciou povrchu glutatiónom (8 nm) vykazujú vyššiu toxicitu než väčšie (37 nm). Zhang et. al pripravovali zlaté nanočastice obalené PEG–SH a taktiež zistili, že menšie nanočastice (4,7 nm) vykazujú vyššiu toxicitu po 24 a 48 hodinách než tie väčšie (s priemerom 12,1 nm a 27,3 nm) [98]. Menšie zlaté nanočastice môžu v tomto prípade vyvolávať vyššiu tvorbu reaktívnych foriem kyslíka, ktoré sú všeobecne hlavnou príčinou toxického účinku na bunky [99].

Tab. 8 Hodnoty viability bunkovej línie HEK 293 po vystavení 24 hodinovému účinku AuNPs.

c AuNPs [µg/ml]	Viabilita buniek [%]		
	Vzorka A2	Vzorka A1	Vzorka B
5	99	97	98
10	99	92	98
30	94	83	88
50	88	81	83
80	81	77	75



Obr. 41 Porovnanie cytotoxicity AuNPs pri koncentráciách 5, 10, 30, 50, 80 µl/ml

## 5 Záver

V práci boli prevedené syntézy zlatých nanočastíc na základe Turkevichovej metódy za použitia rôznej koncentrácie kyseliny tetrachlorozlatitej a citrátu sodného. Ich povrch bol modifikovaný glutatiómom, za účelom zníženia cytotoxicity nanočastíc nakoľko v organizme udržiava redoxný potenciál a správnu funkciu bunkových proteínov. Ďalšou modifikačnou látkou bol PEG, ktorý sa považuje za biokompatibilnú látku k bunkám a tkanivám a z hľadiska obsahu dlhých reťazcov poskytuje excelentnú stabilitu zlatých nanočastíc.

Jednou z najzákladnejších metód detekcie prítomnosti zlatých nanočastíc je optická charakterizácia, teda pozorovanie farby roztoku. Vďaka sfarbeniu sme schopní pomocou UV-VIS analýzy zaznamenať absorpčné maximum, ktoré sa pre zlaté sférické nanočastice pohybuje pri 520 nm. V prípade prítomnosti väčších častíc sa toto absorpčné maximum posúva smerom k vyšším vlnovým dĺžkam, tak ako to je u vzorky A2 bez modifikácie, ktorá dosahovala najväčšie rozmery častíc.

K základnému určeniu tvaru, veľkosti a disperzity nanočastíc bola použitá rastrovacia elektrónová mikroskopia. Táto metóda však naráža na dve hlavné obmedzenia, ktoré môžu skresľovať výsledné dáta a to je úprava vzorku vplyvom sušenia a nemožnosť presne určiť veľkosť nanočastíc menších než 20 nm vzhľadom k rozlíšeniu mikroskopu. Z týchto dôvodov boli pripravené vzorky charakterizované pomocou DLS analýzy. Táto metóda je presnejšia, pretože meria nanočastice v prostredí, v ktorom boli syntetizované a nevyžaduje sa žiadna špeciálna príprava ako pri SEM analýze. Navyše poskytuje informácie o veľkosti nanočastíc na základe troch údajov a to z hľadiska percentuálneho zastúpenia počtu, intenzity a objemu, čo zvyšuje presnosť merania. Po prevedení týchto analýz boli zaznamenané výrazné rozdiely v rozmere pri povrchovej úprave nanočastíc glutatiómom. Ako bolo spomínané v teoretickej časti, glutatión obsahuje početné funkčné skupiny vrátane karboxylovej. Práve orientácia jednotlivých prvkov karboxylovej skupiny v priestore je zodpovedná za vznik vodíkových mostíkov a tým zhlukovaniu nanočastíc. Keď sa k tomuto faktoru vezme vplyv starnutia (DLS analýza bola prevádzaná neskôr než SEM analýza), vzniknú z nanočastíc takmer mikrónové agregáty. Celkom opačný prípad predstavujú nanočastice s PEG, kde aj po určitom čase dlhé reťazce polyméru zabezpečujú stabilitu nanočastíc.

Ďalšia vlastnosť nanočastíc, ktorá sa hodnotí z DLS analýzy je disperzita. Výskyt vysoko polydisperzných nanočastíc by mohol skreslovať výsledky účinkov toxicity *in vivo* či *in vitro*. Nanočastice z prevedených syntéz sú polydisperzné, ale nie v takej miere aby spôsobovali toxicitu voči bunkám, ktorá bola prevedená na vzorkách A1, A2 a B na základe MTT testu po 24 hodinách. Nanočastice nevykazovali výraznú toxicitu, dokonca v najvyššej koncentrácii 80 µg/ml nebola viabilita buniek nižšia ako 75%.

Stabilita nanočastíc bola potvrdená na základe merania pH a Zeta potenciálu, kde sa všetky nanočastice (bez modifikácie glutatiómom) prejavujú ako stabilné. pH nanočastíc sa pohybuje v rozmedzí medzi 4,5–6 a hodnoty Zeta potenciálu sú zas nižšie ako -25 mV, čo odpovedá teoretickým predpokladom stability nanočastíc.

Na základe získaných výsledkov a poznatkov z teoretickej časti by boli najvhodnejšie pre ďalšiu funkcionizáciu a zobrazovanie nanočastice modifikované PEG. Vykazujú vysokú stabilitu, nízku polydisperzitu a nízku cytotoxicitu.

# Zoznam skratiek

AFM	mikroskopia atomárnych síl
AgNO <sub>3</sub>	dusičnan strieborný
Arg	arginín
Asp	kyselina asparágová
ATP	adonizíntrifosfát
AuNPs	zlaté nanočastice
CTAB	bromid cetyltrimetylamónny
DABCYL	4-((4-(dimetylamino)fenyl)azo)benzoová kyselina
DFs	„Disease-Free Survival“
DLS	„Dynamic Light Scattering“, dynamický rozptyl svetla
DLVO	teória Derjarguin-Laudau-Verwey-Overbeck
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	„Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“
EMEM	„Eagle's Minimum Essential Medium“
Gly	glycín
HAuCl <sub>4</sub>	kyselina tetrachlorozlatitá
HDL	„High Density Lipoprotein“, vyskodenzitný proteín
IgE	imunoglobulín E
IgG	imunoglobulín G
LDH	laktát dehydrogenáza
MDCK II	bunková línia „Madin-Darby Canine Kidney“
MTS	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromid
NADH	redukovaný nikotínamid adenín dinukleotid

NaHBr <sub>4</sub>	borohydrid sodný
NBT	nitro-modrý tetrazolium chlorid
PAMAM	poly(amido amine) dendrimér
PEG	polyetylénglykol
PMA	poly(metyl akrylát)
PMS	fenazín metosulfát
ROS	„Reactive Oxygen Species“, reaktívne kyslíkové radikály
SAED	„Selected Area (Electron) Diffraction“, elektrónová difrakcia vybranej oblasti
SDS	Dodecylsulfátsodný
SEM	skenovacia elektrónová mikroskopia
siRNA	„short interfering“ ribonukleová kyselina
SPR	povrchová plazmónová rezonancia
TEM	transmisná elektrónová mikroskopia
TNT	trinitrotoluén
TOAB	bromid tetraoktylamónny
WST	2-(2-metoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
XRD	röntgenová difrakčná kryštalografia
XTT	2,3-bis-(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

# Zoznam literatúry

- [1] ZHOU, J. et al. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, sv. 331, č. 2, s. 251-262. ISSN 1095-7103 (Electronic) 0021-9797 (Linking).
- [2] KHALIDA S. MERZA et al. Comparative Study on Methods for Preparation of Gold Nanoparticles. *Green and Sustainable Chemistry*, 2012, sv. 2, s. 26-28. ISSN 2160-6951.
- [3] TED PELLA, I. Microscopy Products for Science and Industry. [online]. Redding: [cit. 14.11.2014. Dostupné z: <[http://www.tedpella.com/gold\\_html/goldsols.htm](http://www.tedpella.com/gold_html/goldsols.htm)>.
- [4] TOMA, H. E. et al. The coordination chemistry at gold nanoparticles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2010, sv. 21, s. 1158-1176. ISSN 0103-5053.
- [5] Thesis IVANOV, M. R. *Covalently functionalized gold nanoparticles: synthesis, characterization, and integration into capillary electrophoresis*.: University of Iowa,
- [6] HUANG, X. a EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 2010, sv. 1, č. 1, s. 13-28. ISSN 2090-1232.
- [7] YASUN, E. et al. Cancer cell sensing and therapy using affinity tag-conjugated gold nanorods. *Interface Focus*, 2013, sv. 3, č. 3. ISSN 2042-8901.
- [8] LU, F. et al. Gold nanoparticles for diagnostic sensing and therapy. *Inorganica Chimica Acta*, 2012, sv. 393, č. 0, s. 142-153. ISSN 0020-1693.
- [9] HOMOLA, J. et al. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999, sv. 54, č. 1-2, s. 3-15. ISSN 0925-4005.
- [10] GAFFET, E. et al. Nanostructural materials formation by mechanical alloying: Morphologic analysis based on transmission and scanning electron microscopic observations. *Materials Characterization*, 1996, sv. 36, č. 4-5, s. 185-190. ISSN 1044-5803.
- [11] ZHOU, J. et al. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, s. 251-262.
- [12] YAN, J.-K. et al. Green synthesis of biocompatible carboxylic curdlan-capped gold nanoparticles and its interaction with protein. *Carbohydrate Polymers*, 2015, sv. 117, č. 0, s. 771-777. ISSN 0144-8617.

- [13] JIA, L. et al. Stability and cytocompatibility of silk fibroin-capped gold nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, sv. 43, č. 0, s. 231-236. ISSN 0928-4931.
- [14] FENT, G. M. et al. Biodistribution of maltose and gum arabic hybrid gold nanoparticles after intravenous injection in juvenile swine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2009, sv. 5, č. 2, s. 128-135. ISSN 1549-9634.
- [15] YU, L. et al. Facile preparation of gold nanoparticles using the self-assembled ABC non-amphiphilic fluorosilicone triblock copolymer template. *Materials Chemistry and Physics*, 2013, sv. 138, č. 2–3, s. 780-786. ISSN 0254-0584.
- [16] M.MURAWSKA et al. Structure and Morphology of Gold Nanoparticles in Solution Studied by TEM, SAXS and UV-Vis. *ACTA PHYSICA POLONICA A*, 2012, sv. 121, s. 888-892. ISSN 1898-794X.
- [17] SUKU, E. et al. Gold Nanoparticles in Insulin Delivery. [online]. [cit. Dostupné z: <<http://chem553project.wikispaces.com/Synthesis+of+aqueous+Gold+Nanoparticles>>.
- [18] HORMOZI-NEZHAD, M. R. et al. Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles. *Scientia Iranica*, 2012, sv. 19, č. 3, s. 958-963. ISSN 1026-3098.
- [19] ZHANG, Y. X. a ZENG, H. C. MESOSCALE SPHERICAL AND PLANAR ORGANIZATIONS OF GOLD NANOPARTICLES. *Functional Materials Letters*, 2008, sv. 1, č. 1, s. 43-53. ISSN 1793-6047.
- [20] LU, X. et al. Facile synthesis of gold nanoparticles with narrow size distribution by using AuCl or AuBr as the precursor. *Chemistry*, 2008, sv. 14, č. 5, s. 1584-1591. ISSN 0947-6539 (Print) 0947-6539 (Linking).
- [21] SAHA, K. et al. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*, 2012, sv. 112, č. 5, s. 2739-2779. ISSN 0009-2665.
- [22] SIGMA-ALDRICH. Tetraoctylammonium bromide. [online]. [cit. 29.11. 2014]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/294136?lang=en&region=GB>>.
- [23] SIGMA-ALDRICH. Hexadecyltrimethylammonium bromide. [online]. [cit. 29.11. 2014]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h9151?lang=en&region=GB>>.

- [24] MARTIN, M. N. et al. Charged Gold Nanoparticles in Non-Polar Solvents: 10-min Synthesis and 2D Self-Assembly. *Langmuir*, 2010, sv. 26, č. 10, s. 7410-7417. ISSN 0743-7463.
- [25] ELIA, P. et al. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, s. 4007-4021. ISSN 1176-9114.
- [26] PARIDA, U. K. et al. Green Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles Using Onion (*Allium cepa*) Extract. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2011, s. 93-98. ISSN 2161-4962.
- [27] SHARMA, N. et al. Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles. *Microbial Cell Factories*, 2012, sv. 11, s. 86. ISSN 1475-2859 (Electronic) 1475-2859 (Linking).
- [28] CORREA-LLANTEN, D. N. et al. Gold nanoparticles synthesized by *Geobacillus* sp. strain ID17 a thermophilic bacterium isolated from Deception Island, Antarctica. *Microbial Cell Factories*, 2013, sv. 12, s. 75. ISSN 1475-2859 (Electronic) 1475-2859 (Linking).
- [29] ANNAMALAI, J. a NALLAMUTHU, T. Characterization of biosynthesized gold nanoparticles from aqueous extract of *Chlorella vulgaris* and their anti-pathogenic properties. *Applied Nanoscience*, 2014, s. 1-5. ISSN 2190-5509.
- [30] M.E.KHOSROSHAHI a M.S.NOURBAKHS Preparation and Characterization of Self Assembled Gold Nanoparticles on Amino Functionalized SiO<sub>2</sub> Dielectric Core. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2010, sv. 4, č. 4, s. 272-275. ISSN 2010376X.
- [31] TIWARI, P. et al. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 2011, sv. 1, č. 1, s. 31-63. ISSN 2079-4991.
- [32] SHARMA, P. et al. Nanoparticles for bioimaging. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006, sv. 123–126, č. 0, s. 471-485. ISSN 0001-8686.
- [33] MA, Z. a HAN, H. One-step synthesis of cystine-coated gold nanoparticles in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, sv. 317, č. 1–3, s. 229-233. ISSN 0927-7757.
- [34] DELONG, R. K. et al. Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and other biological macromolecules. *Nanotechnology Science and Applications*, 2010, s. 53-63. ISSN 1177-8903.
- [35] NUNE, S. K. et al. Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, sv. 6, č. 11, s. 1175-1194. ISSN 1742-5247.

- [36] GAO, W. et al. Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicology Letters*, 2011, sv. 205, č. 1, s. 86-95. ISSN 0378-4274.
- [37] CHOMOUCKA, J. et al. Synthesis of Glutathione Coated Quantum Dots. In AL-AHMADI, A. *State-of-the-Art of Quantum Dot System Fabrications* Croatia: InTech, 2012, s. 182.
- [38] HARPER, B. et al. The Impact of Surface Ligands and Synthesis Method on the Toxicity of Glutathione-Coated Gold Nanoparticles. *Nanomaterials*, 2014, sv. 4, č. 2, s. 355-371. ISSN 2079-4991.
- [39] FENG, G. et al. Enhancing multimodality functional and molecular imaging using glucose-coated gold nanoparticles. *Clinical Radiology*, 2014, sv. 69, č. 11, s. 1105-1111. ISSN 0009-9260.
- [40] FU, W. et al. Biomedical Applications of Gold Nanoparticles Functionalized Using Hetero Bifunctional Poly(ethylene glycol) Spacer *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 2005, sv. 845, s. 6. ISSN 0272-9172.
- [41] MUDDINETI, O. S. et al. Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, sv. 484, č. 1-2, s. 252-267. ISSN 0378-5173.
- [42] PISSUWAN, D. et al. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 2011, sv. 149, č. 1, s. 65-71. ISSN 0168-3659.
- [43] ZHANG, G. et al. Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Biomaterials*, 2009, sv. 30, č. 10, s. 1928-1936. ISSN 0142-9612.
- [44] BOISSELIER, E. a ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews*, 2009, sv. 38, č. 6, s. 1759-1782. ISSN 0306-0012.
- [45] WANG, H. et al. Computed tomography imaging of cancer cells using acetylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Biomaterials*, 2011, sv. 32, č. 11, s. 2979-2988. ISSN 0142-9612.
- [46] GILJOHANN, D. A. et al. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, sv. 49, č. 19, s. 3280-3294. ISSN 1433-7851.
- [47] DUMÉ, B. Golden opportunity for early detection of Alzheimer's. [online]. [cit. 10.5. 2015]. Dostupné z: <<http://nanotechweb.org/cws/article/tech/40256>>.

- [48] KIM, D. et al. Antibiofouling Polymer-Coated Gold Nanoparticles as a Contrast Agent for in Vivo X-ray Computed Tomography Imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, sv. 129, č. 24, s. 7661-7665. ISSN 0002-7863.
- [49] AHN, S. et al. Gold Nanoparticle Contrast Agents in Advanced X-ray Imaging Technologies. *Molecules*, 2013, sv. 18, č. 5, s. 5858-5890. ISSN 1420-3049.
- [50] REUVENI, T. et al. Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an in vivo study. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, sv. 6, s. 2859-2864. ISSN 1176-9114.
- [51] AGARWAL, A. et al. Targeted gold nanorod contrast agent for prostate cancer detection by photoacoustic imaging. *Journal of Applied Physics*, 2007, sv. 102, č. 6. ISSN 0021-8979.
- [52] MALLIDI, S. et al. Molecular specific optoacoustic imaging with plasmonic nanoparticles. *Optics Express*, 2007, sv. 15, č. 11, s. 6583-6588. ISSN 1094-4087.
- [53] ZHANG, Q. et al. Gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo tumor imaging with photoacoustic tomography. *Nanotechnology*, 2009, sv. 20, č. 39, s. 395102. ISSN 0957-4484.
- [54] LIVIERATOS, L. Basic Principles of SPECT and PET Imaging. In FOGELMAN, I., et al. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer Berlin Heidelberg, 2012, s. 345-359.
- [55] BERRY, C. C. et al. Nuclear localization of HIV-1 tat functionalized gold nanoparticles. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2007, sv. 6, č. 4, s. 262-269. ISSN 1536-1241 (Print) 1536-1241.
- [56] OCAMPO-GARCIA, B. et al. Kit for preparation of multimeric receptor-specific (9)(9mTc-radiopharmaceuticals based on gold nanoparticles. *Nucl Med Commun*, 2011, sv. 32, č. 11, s. 1095-1104. ISSN 0143-3636.
- [57] ZHOU, C. et al. Near-Infrared Emitting Radioactive Gold Nanoparticles with Molecular Pharmacokinetics. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, sv. 51, č. 40, s. 10118-10122. ISSN 1521-3773.
- [58] SHANG, L. et al. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, 2014, sv. 12, č. 5.
- [59] ZHANG, X. et al. Intratumoral Gold-Doxorubicin Is Effective in Treating Melanoma in Mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2015.
- [60] KUMAR, A. et al. Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and

- targeted peptides for cancer treatment. *Biomaterials*, 2012, sv. 33, č. 4, s. 1180-1189. ISSN 0142-9612.
- [61] HUEFNER, A. et al. Gold nanoparticles explore cells: Cellular uptake and their use as intracellular probes. *Methods*, 2014, sv. 68, č. 2, s. 354-363. ISSN 1046-2023.
- [62] LI, K. a SCHNEIDER, M. Quantitative evaluation and visualization of size effect on cellular uptake of gold nanoparticles by multiphoton imaging-UV/Vis spectroscopic analysis. *J Biomed Opt*, 2014, sv. 19, č. 10, s. 101505. ISSN 1560-2281 (Electronic) 1083-3668 (Linking).
- [63] DRESCHER, D. a KNEIPP, J. Nanomaterials in complex biological systems: insights from Raman spectroscopy. *Chem Soc Rev*, 2012, sv. 41, č. 17, s. 5780-5799. ISSN 1460-4744 (Electronic) 0306-0012 (Linking).
- [64] ALKILANY, A. M. a MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res*, 2010, s. 2313–2333.
- [65] Cytotoxicity. Solution for cytotoxicity studies. [online]. [cit. 16.11 2014]. Dostupné z: <<http://www.moleculardevices.com/applications/areas-research/cytotoxicity>>.
- [66] SADIK, O. A. et al. Sensors as tools for quantitation, nanotoxicity and nanomonitoring assessment of engineered nanomaterials. *J Environ Monit*, 2009, sv. 11, č. 10, s. 1782-1800. ISSN 1464-0333 (Electronic) 1464-0325 (Linking).
- [67] Measuring Cell Viability / Cytotoxicity. [online]. [cit. 24.4. 2015]. Dostupné z: <<http://www.dojindo.eu.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx>>.
- [68] MTT assay. [online]. [cit. 15.4. 2015]. Dostupné z: <[http://en.wikipedia.org/wiki/MTT\\_assay](http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay)>.
- [69] VAN MEERLOO, J. et al. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*, 2011, sv. 731, s. 237-245. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking).
- [70] BERRIDGE, M. V. et al. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 2005, sv. 11, s. 127-152. ISSN 1387-2656 (Print) 1387-2656 (Linking).
- [71] HAN, X. et al. Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*, 2011, sv. 287, č. 1–3, s. 99-104. ISSN 0300-483X.

- [72] CABALLERO-DÍAZ, E. a VALCÁRCEL, M. Chapter 5 - Toxicity of Gold Nanoparticles. In MIGUEL, V. a ÁNGELA, I.L.-L. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, 2014, sv. Volume 66, s. 207-254.
- [73] KADA, G. et al. Atomic force microscopy in bionanotechnology. *Nano Today*, 2008, sv. 3, č. 1–2, s. 12-19. ISSN 1748-0132.
- [74] VAN HOECKE, K. et al. Ecotoxicity and uptake of polymer coated gold nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2013, sv. 7, č. 1, s. 37-47. ISSN 1743-5390.
- [75] TARANTOLA, M. et al. Toxicity of gold-nanoparticles: synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells. *Nanotoxicology*, 2011, sv. 5, č. 2, s. 254-268. ISSN 1743-5404 (Electronic) 1743-5390 (Linking).
- [76] MIRONAVA, T. et al. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, 2010, sv. 4, č. 1, s. 120-137. ISSN 1743-5404 (Electronic) 1743-5390 (Linking).
- [77] GLAZER, E. S. et al. Biodistribution and acute toxicity of naked gold nanoparticles in a rabbit hepatic tumor model. *Nanotoxicology*, 2011, sv. 5, č. 4, s. 459-468. ISSN 1743-5404 (Electronic) 1743-5390 (Linking).
- [78] ZHANG, Q. et al. Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators. *Nanotoxicology*, 2011, sv. 5, č. 3, s. 284-295. ISSN 1743-5404 (Electronic) 1743-5390 (Linking).
- [79] NEBESÁŘOVÁ, J. Elektronová mikroskopie pro biology. [online]. [cit. 14.12. 2014]. Dostupné z: <<http://www.paru.cas.cz/lem/book/index.html>>.
- [80] RAMAPRABHU, S. et al. Relative Study between Isoniazid Loaded Chitosan with the Gold Encapsulated with Isoniazid Loaded Chitosan Nanoparticles. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, sv. 3, č. 6. ISSN 2231-6876.
- [81] Transmission Electron Microscopy Analysis of Nanoparticles. [online]. San Diego, CA: [cit. 15.4. 2015]. Dostupné z: <<http://nanocomposix.eu/kb/general/characterization-techniques#tem>>.
- [82] GU, Y.-J. et al. Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, sv. 237, č. 2, s. 196-204. ISSN 0041-008X.

- [83] CHENG, X. et al. A combination of ESEM, EDX and XRD studies on the fabric of Dutch organic clay from Oostvaardersplassen (Netherlands) and its geotechnical implications. *Applied Clay Science*, 2004, sv. 25, č. 3–4, s. 179-185. ISSN 0169-1317.
- [84] Sample Analysis Using Energy Dispersive X-ray Fluorescence (EDXRF). [online]. [cit. 14.4. 2015]. Dostupné z: <<http://www.niton.com/en/portable-xrf-technology/how-xrf-works/x-ray-fluorescence-%28edxrf%29-overview>>.
- [85] Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy. [online]. [cit. 10.3. 2015]. Dostupné z: <<http://www.mee-inc.com/hamm/energy-dispersive-x-ray-spectroscopyeds/>>.
- [86] ABDELHALIM, M. A. K. et al. Physical Properties of Different Gold Nanoparticles: Ultraviolet-Visible and Fluorescence Measurements. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 2012, sv. 3, č. 133, s. 5. ISSN 2157-7439.
- [87] WANG, Y. a NI, Y. Combination of UV-vis spectroscopy and chemometrics to understand protein-nanomaterial conjugate: a case study on human serum albumin and gold nanoparticles. *Talanta*, 2014, sv. 119, s. 320-330. ISSN 0039-9140.
- [88] VIJAYAKUMAR, S. In vitro stability studies on gold nanoparticles with different stabilizing agents. *International Journal of Current Science*, 2014, sv. 11, s. 84-93. ISSN 2250-1770.
- [89] JANS, H. et al. Dynamic Light Scattering as a Powerful Tool for Gold Nanoparticle Bioconjugation and Biomolecular Binding Studies. *Analytical Chemistry*, 2009, sv. 81, č. 22, s. 9425-9432. ISSN 0003-2700.
- [90] PHARMA, C. Zeta potential. [online]. [cit. 21.12. 2014]. Dostupné z: <<http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/zeta-potential/>>.
- [91] YANG, C. et al. No overt structural or functional changes associated with PEG-coated gold nanoparticles accumulation with acute exposure in the mouse heart. *Toxicology Letters*, 2013, sv. 222, č. 2, s. 197-203. ISSN 0378-4274.
- [92] CORADEGHINI, R. et al. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicology Letters*, 2013, sv. 217, č. 3, s. 205-216. ISSN 0378-4274.
- [93] IVO KUSÁK, M., PH.D. AFM mikroskop. [online]. [cit. 21.12. 2014]. Dostupné z: <[http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM\\_mikroskopie.pdf](http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM_mikroskopie.pdf)>.
- [94] CONVERSANO, F. et al. Echographic detectability of optoacoustic signals from low-concentration PEG-coated gold nanorods. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, sv. 7, s. 4373-4389. ISSN 1176-9114.

- [95] TGR BioScience. [online]. [cit. 8.4. 2015]. Dostupné z: <<http://tgrbio.com/cellular-models/hek-293-cells/>>.
- [96] ARNIDA et al. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *Journal of Applied Toxicology*, 2010, sv. 30, č. 3, s. 212-217. ISSN 1099-1263.
- [97] PHILIP, D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2008, sv. 71, č. 1, s. 80-85. ISSN 1386-1425.
- [98] ZHANG, X. D. et al. Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy. *Biomaterials*, 2012, sv. 33, č. 27, s. 6408-6419. ISSN 0142-9612.
- [99] NAPIERSKA, D. et al. Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. *Small*, 2009, sv. 5, č. 7, s. 846-853. ISSN 1613-6829.