



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra přírodovědných oborů**

**Studium interakce funkcionalizovaných nanočástic diamantu s  
buňkami metodami fluorescenční mikroskopie**

**Interaction of functionalized diamond nanoparticles with cells  
studied by methods of fluorescence microscopy**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika  
Studijní obor: Přístroje a metody pro

Vedoucí práce: Ing. Vladimíra Petráková, Ph.D.  
Konzultant: RNDr. Veronika Benson, Ph.D.

**Jana Opluštilová**

---

**Kladno, květen 2016**

Katedra přírodovědných oborů

Akademický rok: 2015/2016

## Z a d á n í   d i p l o m o v é   p r á c e

Student: **Bc. Jana Opluštilová**  
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu  
Téma: **Studium interakce funkcionalizovaných nanočástic diamantu s buňkami metodami fluorescenční mikroskopie**  
Téma anglicky: Interaction of functionalized diamond nanoparticles with cells studied by methods of fluorescence microscopy

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

Jednou z možností transfekce terapeutických nukleových kyselin do buněk jsou nanočástice, které oproti klasickým metodám transfekce (elektroporace, kationických transfekčních činidel, virové partikule,..) mohou vést ke zvýšení efektivity transfekce a snížení cytotoxicity transfekčního činidla. Úspěch transfekce závisí na interakci nosiče nukleové kyseliny a buňky. Pro studium této interakce budou v diplomové práci využity fluorescenční diamantové nanočástice, které slouží jako nosič nukleové kyseliny a zároveň umožňují díky své fotostabilitě dlouhodobé monitorování fluorescence.

- 1) Připravte nanočástice diamantu funkcionalizované transfekčním činidlem (polyethyleneimin) a DNA
- 2) Najděte vhodnou metodiku pro vizualizaci nanočástic diamantu v buňkách (fluorescenční mikroskopie, FLIM) a pro přípravu buněčných vzorků pro měření.
- 3) Charakterizujte interakci diamantových nanočástic o různé chemické modifikaci (oxidované, s navázaným polyethyleneiminem, s navázanou DNA) s buňkami (makrofágy IC21, buněčnou linií kolorektálního karcinomu CT26 a fibroblasty).
- 4) Diskutujte vliv povrchové úpravy na schopnost pronikání nanočástic do buněk

### Seznam odborné literatury:

- [1] Petráková, V., Nesladek, M. et al., Luminescence of Nanodiamond Driven by Atomic Functionalization: Towards Novel Detection Principles, *Advanced Functional Materials*, Vol. 22, No. 4, 2012
- [2] Xue-Qing Zhang, Polymer-Functionalized Nanodiamond Platforms as Vehicles for Gene Delivery, *ACS Nano*, Vol. 3, No. 9, 2009, 2609-2616 s.
- [3] Chu, Z., Zhang, S., Zhang et al., Unambiguous observation of shape effects on cellular fate of nanoparticles., *Sci. Rep.*, Vol. 4, No. 4495, 2014
- [4] Havlík J., Petráková V. et al., Boosting nanodiamond fluorescence: towards development of brighter probes, *Nanoscale*, Vol. 5, No. 8, 2013

Vedoucí: Ing. Vladimíra Petráková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Veronika Benson, Ph.D.

Zadání platné do: 20.08.2017

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

V Kladně dne 12.12.2015

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem  
**Studium interakce funkcionalizovaných nanočástic diamantu s buňkami metodami fluorescenční mikroskopie**  
vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V ..... dne .....

.....

podpis

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí mé práce Ing. Vladimíře Petrákové Ph.D., nejenom za cenné rady a odborné konzultace, ale také za optimistický a přátelský přístup. Dále děkuji RNDr. Veronice Benson Ph.D. za poskytnutí odborných informací a umožnění realizace experimentů na Mikrobiologickém ústavu AV ČR. Mé velké díky patří také Mgr. Janě Turňové, Bc. Marku Kindermannovi a Ing. Evě Neuhöferové za pomoc při přípravě a realizaci experimentů a v neposlední řadě mým nejbližším, zejména rodičům, za jejich velkou trpělivost a psychickou podporu v průběhu celého studia.

## **Abstrakt**

Diamantové nanočástice jsou slibným materiálem pro potenciální využití v biomedicíně. Pro většinu aplikací, jako jsou vizualizace buněčných procesů, cílený přenos léčiv nebo genová terapie, je klíčové chování nanočástic v interakci s buňkou. Tato práce využívá stabilní fluorescence N-V center a její charakteristické doby dohasínání pro vizualizaci diamantových nanočástic pomocí metod fluorescenční konfokální mikroskopie (FLIM- fluorescence lifetime imaging, standardní měření) a následné posouzení účinnosti jejich průniku do buněk. V experimentu byly použity nanočástice s různou povrchovou funkcionalizací (s oxidovaným povrchem, s navázaným PEI2000/750000 a PEI2000/750000-DNA) a tři typy buněk: CT26, 3T3 a IC-21. Pro co nejpřesnější posouzení lokalizace nanočástic metodou FLIM byl každý vzorek skenován ve třech fokálních rovinách. Za účelem hrubého přehledu o chování nanočástic v buněčném vzorku byly následně pořízeny snímky o větším rozsahu pomocí klasického fluorescenčního konfokálního mikroskopu. Pro porovnání byla u buněk CT26 provedena analýza transfekční účinnosti pomocí průtokové cytometrie. Každá z použitých metod má své výhody a nevýhody, avšak žádná z nich neposkytuje zcela přesnou informaci o procentuálním zastoupení buněk s internalizovanými nanočásticemi. Z experimentů vyplývá, že navázání polymeru ovlivňuje internalizaci částic jen ve velmi malé míře (pro buněčné linie CT26 a 3T3 byly pozorovány nejlepší výsledky u komplexů ND-PEI750000). Všeobecně lze říci, že u komplexů s PEI a především s PEI-DNA dochází k nežádoucí agregaci, která má na účinnost průniku do značné míry vliv. Z toho důvodu nelze vliv navázaného polymeru jednoznačně prokázat. Dle očekávání byly nanočástice nejefektivněji pohlcovány fagocytujícím buňkami IC-21.

## **Klíčová slova**

Nanodiamantové částice, buněčné pohlcování, fluorescenční konfokální mikroskopie, FLIM (zobrazování doby dohasínání fluorescence), polyethylenimin

## **Abstract**

Diamond nanoparticles are one of the promising materials to be used in biomedicine. The key aspect of nanoparticles that is important in most applications such as visualization of cellular processes, targeted drug delivery or gene therapy, is their behaviour when interacting with the cells. This thesis uses the nanoparticles' N-V centres fluorescence stability and the fluorescence decay time of these centres for nanodiamond visualization in the sense of fluorescence confocal microscopy (FLIM - fluorescence lifetime imaging, standart measurement) for evaluating the goodness of diamond nanoparticles penetration into the cells. Nanoparticles with different surface modification (surface oxidation, modification with PEI2000/750000 or PEI2000/750000-DNA) and three cell types (CT26, 3T3 and IC-21) were used for experimental measurement. Transfection efficiency analysis by flow cytometry measurement was performed for CT26 cells. Three different focal planes were scanned by FLIM method for each sample to precise determination of the nanoparticles' localization. Conventional fluorescence confocal microscopy was used to determine nanoparticles general behaviour in the cell samples by images in wide range. Transfection efficiency analysis by flow cytometry measurement was performed for CT26 cells. Each method used for nanoparticles visualization has its benefits and disadvantages and none of these provides precise quantitative information of the efficiency of nanoparticles uptake to the cells. From experimental measurements can be seen that surface modification by polymer PEI influences the intemalization minimally (CT26 and 3T3 cell lines revealed the best results with the complexes of ND-PEI750000). PEI complexes in general and PEI-DNA complexes in particular occurs undesirable aggregation that has an impact to the efficiency uptake in great extent. For this reason the impact of PEI surface modification on the nanodiamonds uptake efficiency cannot be positively concluded. Highest efficiency uptake of nanodiamond particles was performed by phagocytic IC-21 cells as it was expected.

## **Key words**

Nanodiamond particles, cellular uptake, fluorescence confocal microscopy, FLIM (fluorescence lifetime imaging), polyethylenimine

# Obsah

Seznam zkratk	ix
1 Úvod	1
2 Diamantové nanočástice	3
2.1 Syntéza diamantových nanočástic	3
2.1.1 HPHT diamantové nanočástice	4
2.1.2 Depozice z plynné fáze (CVD)	5
2.1.3 Detonační diamantové nanočástice	6
2.2 Vlastnosti	7
2.2.1 Chemie povrchu	7
2.2.2 Biokompatibilita	7
2.2.3 Optické vlastnosti	8
2.3 Aplikace	10
2.3.1 Fluorescenční sondy	10
2.3.2 Nosiče léčiv	11
2.3.3 Tkáňové inženýrství	11
2.3.4 Genová terapie	11
3 Fotoluminiscence	13
3.1 Doba života fluorescence a kvantový výtěžek	14
3.2 Zobrazování doby života fluorescence (FLIM)	15
4 Interakce diamantových nanočástic s buňkou	20
4.1 Endocytóza	20
4.1.1 Fagocytóza	20
4.1.2 Pinocytóza	21
4.2 Mechanismus internalizace ND do buněk	21
4.3 Buněčná dynamika nanočásti	23
5 Metody	25
5.1 Charakterizační metody	25
5.1.1 Měření zeta potenciálu a hydrodynamického průměru nanočástic	25
5.1.2 Fluorescenční konfokální mikroskopie	28
5.1.3 Průtoková cytometrie	30
5.2 Příprava vzorků	31
5.2.1 Příprava komplexů ND-PEI-DNA	31

5.2.2	Příprava buněčných vzorků .....	32
5.2.3	Příprava vzorků pro fluorescenční konfokální mikroskopii.....	34
5.2.4	Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii .....	35
6	Výsledky .....	36
6.1	Příprava a charakterizace diamantových nanočástic .....	36
6.2	Zobrazování diamantových nanočástic .....	39
6.2.1	Zobrazování samotných diamantových nanočástic .....	40
6.2.2	Zobrazování diamantových částic v buňkách .....	41
6.3	Účinnost průniku NDP do buněk.....	42
6.3.1	Konfokální mikroskopie - FLIM.....	43
6.3.2	Konfokální mikroskopie – standartní měření.....	52
6.3.3	Průtoková cytometrie (FACS).....	55
7	Diskuze .....	57
8	Závěr .....	62
	Reference.....	64



# Seznam zkratek

<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>CVD</b>	chemická depozice z plynné fáze
<b>DLS</b>	dynamický rozptyl světla
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>FBS</b>	fetální bovinní sérum
<b>FACS</b>	fluorescenčně-aktivované třídění buňek
<b>FLIM</b>	zobrazování doby dohasínání fluorescence
<b>FND</b>	fluorescenční nanodiamant
<b>HPHT</b>	vysoká teplota-vysoký tlak
<b>LP</b>	long-pass (delší než definovaná vlnová délka)
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA
<b>ND</b>	nanodiamant
<b>NDP</b>	diamantová nanočástice
<b>N-V</b>	dusík-vacance
<b>PBS</b>	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
<b>PEI</b>	polyethylenimin
<b>siRNA</b>	malá interferující RNA
<b>TCSPC</b>	časově-korelované čítání fotonů
<b>TTTR</b>	časově značený časově-rozlišený

# 1 Úvod

Nanotechnologie se v současné vědě řadí k jednomu z nejvíce diskutovaných témat vůbec. Doposud bylo zkoumáno velké množství nanomateriálů, ovšem ne všechny jsou vhodné pro použití v biologii a medicíně. Nanodiamantové částice jsou jedním z uhlíkových materiálů, které splňují požadavky pro tuto aplikaci. Poprvé byly vyrobeny začátkem 60. let 20. století v SSSR, ale pro zbytek světa zůstaly v podstatě neznámé až do konce 80. let. Až po roce 1990 přinesl základní výzkum řadu důležitých objevů vedoucích k širšímu zájmu o tento materiál. Díky velmi malému rozměru a krystalické struktuře tvořené sp<sup>3</sup> uhlíkovými atomy disponují výjimečnými vlastnostmi, mezi které patří nízká cytotoxicita, snadná modifikace povrchu a následná konjugace s biologickými molekulami. Další výhodou jsou jejich unikátní optické vlastnosti, spočívající především ve stabilní fluorescenci bez fotovybělování. Fluorescenční vlastnosti částic jsou způsobeny přítomností bodových poruch, tzv. N-V center, které vznikají ozářením vysokoenergetickými částicemi a následným žiháním při teplotě 600-700°C. Takto ošetřené částice se nazývají fluorescenční nanodiamanty (FND).[1]

Díky svým vlastnostem se fluorescenční diamantové nanočástice stávají vhodnými kandidáty pro aplikaci v biomedicíně. Lze je použít například jako nosiče léčiv, biosenzory, buněčné sondy nebo vektory v genové terapii. Genová terapie se zdá být velmi slibnou metodou pro léčbu celé řady onemocnění včetně rakoviny. Použití diamantových nanočástic v této oblasti může přinést řadu výhod oproti klasickým technikám založených na virových nebo polymerových nosičích. Povrch částice lze snadno modifikovat prostřednictvím kovalentních i nekovalentních vazeb. Jednou z možností modifikace je navázání kationtového polymeru PEI (polyethylenimin), který mění polaritu částice a umožňuje tak elektrostatické navázání záporně nabitě DNA a zároveň zvyšuje adhezi částic k buněčné membráně. [2,3]

Pro úspěšné dodání požadované látky (léčiva, DNA) nebo pro sledování buněčných procesů je klíčovým faktorem průnik diamantových nanočástic do buňky. Účinnost internalizace může být ovlivněna vlastnostmi použitých nanočástic (velikost, tvar, chemická modifikace) a typem buňky. Právě zobrazování a studiu interakce nanočástic v kontaktu s buňkou je věnována tato práce.

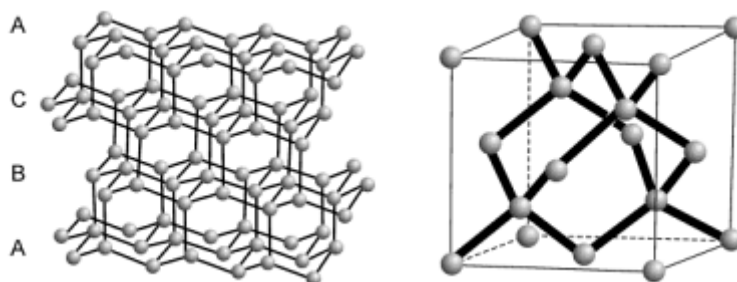
Práce je dělena do dvou částí: teoretické a experimentální. Cílem experimentální části je nalézt vhodnou metodu vizualizace diamantových nanočástic v buňkách pomocí fluorescenční konfokální mikroskopie (konkrétně použitím techniky FLIM) a následné studium účinnosti internalizace těchto částic s různou povrchovou funkcionalizací (s oxidovaným povrchem, s navázaným PEI2000/750000 a s navázaným PEI2000/750000 a DNA). V experimentu jsou použity tři typy buněčných linií: 3T3, CT26 (které byly vybrány v návaznosti na projekty aktuálně řešené na Fakultě biomedicínského inženýrství, ČVUT) a IC-21 jako zástupce buněk s přirozenou schopností fagocytovat. Kromě uvedené metody

FLIM je účinnost průniku studována také pomocí klasické fluorescenční konfokální mikroskopie a průtokové cytometrie.

Diplomová práce je členěna do sedmi kapitol. V kapitole následující po úvodu jsou charakterizovány nanodiamantové částice jako takové (jejich výroba, vlastnosti a možnosti aplikace). Ve třetí kapitole je vymezen pojem fotoluminiscence, doba života fluorescece a možnosti jeho měření a na závěr teoretické části jsou shrnuty dosavadní poznatky o mechanismu internalizace a buněčné dynamice nanočástic (kapitola 4). Popis použitých charakterizačních metod a přípravy vzorků pro měření je zahrnut v kapitole 4. V hlavní části práce (kapitoly 6 a 7) jsou prezentovány a diskutovány získané výsledky.

## 2 Diamantové nanočástice

Diamantové nanočástice můžeme definovat jako diamanty o rozměrech v řádu nanometrů. Diamanty jsou známé především pro své výjimečné optické, chemické a fyzikální vlastnosti, jako je například vysoká tvrdost, tepelná vodivost nebo nízká hodnota disperze. Jedná se o jednu z alotropických modifikací uhlíku odpovídající hybridizaci  $sp^3$  se čtyřmi rovnoměrně rozloženými valenčními elektrony. Každý z těchto čtyř valenčních elektronů tvoří kovalentní vazbu s dalšími uhlíkovými atomy v okolí. Výsledkem je kubická krystalická struktura, ve které každý atom vytváří silné kovalentní vazby se čtyřmi nejbližšími sousedy, nazývaná jako diamantová mřížka. Silné vazby jsou hlavní příčinou unikátní tvrdosti, vysoké tepelné vodivosti a odolnosti tohoto nerostu, čehož je využíváno především v průmyslu k broušení, v chirurgii, astronomii, experimentální fyzice a elektronice. Mimo diamant se uhlík v přírodě vyskytuje ještě ve formě grafitu, který krystalizuje v hexagonální krystalové mřížce ve formě desek. [4,5]



Obr.1: Mřížková struktura a trojrozměrný model buňky kubického diamantu [4]

### 2.1 Syntéza diamantových nanočástic

Přírodní diamanty vznikly před miliony lety krystalizací uhlíku za velmi vysokého tlaku a teploty v hloubkách okolo 160 km pod povrchem země. Takto vzniklé nerosty se přibližují k zemskému povrchu během hluboké sopečné erupce spolu s magmatem, které je ochlazováno do vyvěřelých hornin známých jako kimberlity a lamproity. V současné době je největším producentem přírodních diamantů oblast Jižní Afriky. Ovšem téměř 90 % průmyslově využívaných diamantů je syntetického původu. [6]

Již od roku 1772, kdy francouzský chemik Lavoisier objevil, že diamant se skládá z čistého uhlíku, se mnoho vědců pokoušelo simulovat vznik přírodních diamantů v laboratorních podmínkách, ovšem bez úspěchu. Až do roku 1954, kdy byl vyroben první syntetický diamant laboratoří GER (General Electrical Research) v USA pomocí metody dnes známé jako HPHT (high-pressure, high-temperature).

V současné době existují tři hlavní metody výroby syntetických nanodiamantů. Konkrétně se jedná o již zmíněný proces výroby za vysokého tlaku a teploty (HPHT - high-

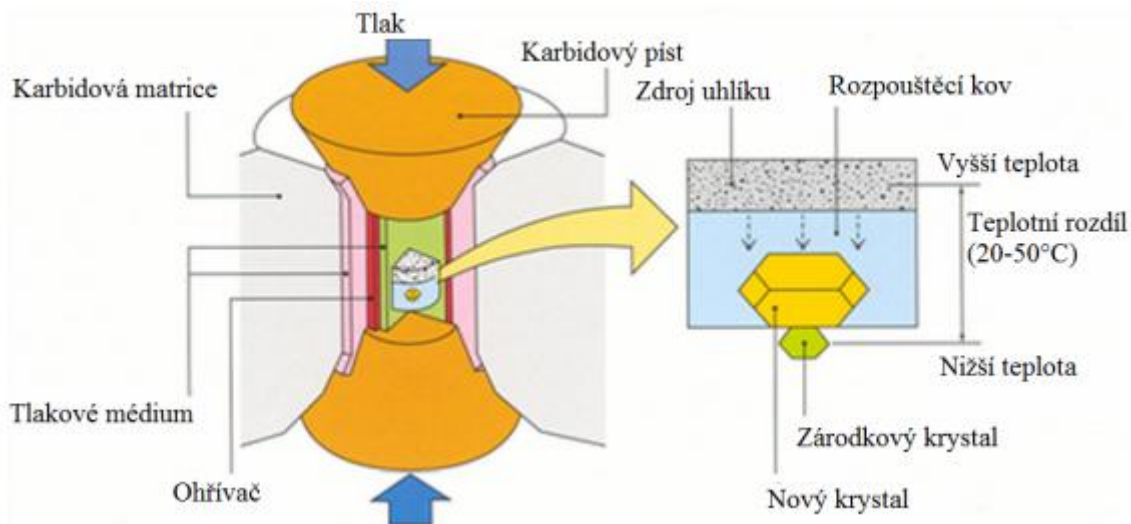
pressure,high temperature)), depozicí z plynné fáze (CVD – Chemical vapour deposition) a detonační syntézou. [7]

### **2.1.1 HPHT diamantové nanočástice**

Syntéza umělého diamantu prostřednictvím velmi vysokého tlaku a teploty byla historicky první technikou, která byla vyvinuta a prakticky realizována. Učinil tak H. Tracy Hall z General Electric (USA) v roce 1954. Metoda spočívá ve vystavení materiálu obsahujícího uhlík vysoké teplotě (nad 1500°C) a vysokému tlaku (nad 5 GPa), což indukuje fázový přechod grafitu k diamantu. Metoda je inspirována geologickými procesy, které vedou k tvorbě přírodního diamantu. Do dnes bylo vyvinuto několik HPHT metod, ovšem nejběžnějšími zůstávají tři základní systémy: BELT, CUBIC a BARs. Nejstarším zařízením je tzv. BELT lis, tedy pásový lis, který je tvořen horní a dolní kovadlinou. Po stranách jsou umístěny ocelové pásy, které slouží k omezení vnitřního tlaku. Tento typ lisu je využíván i v současnosti. Druhým typem je kubický lis, který je vybaven šesti kovadlinami, díky kterým je zvětšen objem, na který je tlak aplikován. Poslední systém (BARs) obsahuje osm vnějších kovadlin sférického tvaru, na které je vyvíjen tlak a šest vnitřních kovadlin sloužících ke znásobení tlaku na samotný vzorek. Tento lis je nejvíce efektivní a zároveň velmi hospodárný.

U všech systému je do grafitového ohříváče umístěna reakční buňka, která obsahuje zdroj uhlíku a zárodečné krystaly. Celý systém je obklopen kovadlinovým lisem (počet kovadlin se u jednotlivých systémů liší), který vyvíjí tlak potřebný k tvorbě diamantů. Zdroj uhlíku je rozpuštěný v roztaveném kovovém (Cr, Ta, Mn, Fe, Co, Ni, nebo jejich slitiny a sloučeniny) nebo nekovovém katalyzátoru (uhličitany, hydroxidy a sulfáty). Přítomnost katalyzátoru umožňuje použití nižší teploty a tlaku a celý proces přeměny značně urychluje.

Pomocí metody HPHT je možné vyrábět pouze jednotlivé krystaly o velikosti v rozmezí od desítek nanometrů až po jeden centimetr. Výhodou takto syntetizovaných krystalů je jejich vysoká kvalita a čistý povrch bez nediamantových struktur, jako je například grafit nebo amorfni uhlík. Tato metoda zůstala úspěšnou a velmi rozšířenou až do roku 2005, kdy firma Apollo Diamonds se sídlem v USA přišla s novou technologií výroby monokrystalických diamantů pomocí chemické depozice z plynné fáze (CVD – chemical vapour deposition).[5,7,8,9]



Obr.2: Schéma pásového lisu používaného při výrobě NDP metodou HPHT [10]

## 2.1.2 Depozice z plynné fáze (CVD)

Další metodou výroby umělých diamantových nanočástic je depozice z plynné fáze (CVD – chemical vapor deposition). Výzkum zabývající se touto technikou započal již v roce 1950, ovšem první experimenty vedly k velmi pomalému růstu a přednost tedy dostala metoda HPHT. Přelom nastal mezi léty 1974-1981, kdy se japonské skupině vědců pod vedením N. Sytaka podařilo změnou chemického složení plynů použitých k CVD depozici zvýšit rychlost růstu až na 1 $\mu$ m/hod.

Základním principem této metody je růst diamantu ze směsi uhlovodíkových plynů na substrátu uloženém v komoře, ve které je přesně kontrolována teplota a tlak. Jako substrát je nejčastěji využíván krystalický diamant, křemík, křemen, safír nebo nějaký kov (např ocel nebo titan). Zdrojem uhlíku je směs plynů (typicky methanu ( $\text{CH}_4$ ) a vodíku ( $\text{H}_2$ ), která je vstříkována do růstové komory a ohřívána například pomocí rozžhaveného vlákna, obloukového výboje, elektronového či laserového paprsku. Při teplotách nad 800°C je směs ionizována a vzniká tak plazma s chemicky aktivními radikály. Radikály reagují a začínají tvořit diamantové krystalky v okolí defektů substrátu, které se chovají jako spouštěcí zárodky růstového procesu. Vzniklé krystaly se postupně spojují a tvoří polykrystalický film. V tomto případě slouží metan jako zdroj uhlíku, zatímco velmi reaktivní atomární vodík vyleptává z rostoucího diamantu nediamantové formy uhlíku. Ve skutečnosti vodík leptá částečně i diamant ovšem daleko pomaleji než například grafit.

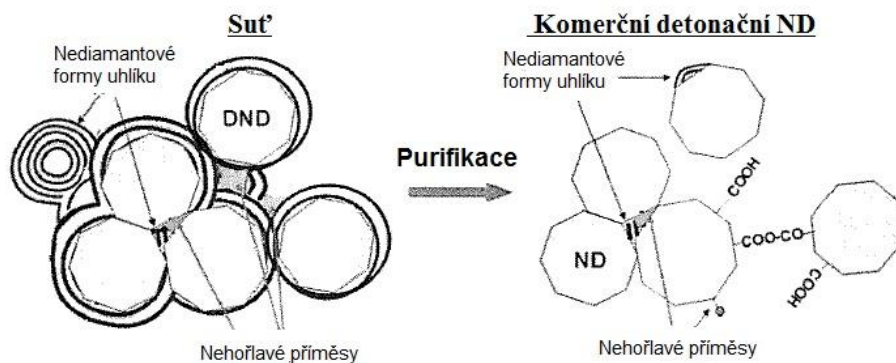
V závislosti na typu růstového prekurzoru a parametrech depozice můžeme ovlivnit velikost nanokrystalického diamantového filmu v rozmezí od 5 do 100 nm. Největšímu zájmu se díky svým výborným mechanickým vlastnostem a vysoké odolnosti těší nanokrystalické a ultrananokrystalické vrstvy. Tyto vrstvy jsou hojně využívány v biomedicínské aplikaci při potahování implantátů [11]. Díky vysoké stabilitě, vynikajícím elektrochemickým vlastnostem, selektivitě při vazbě biologických materiálů a biokompatibilitě sehrály svoji roli také při vývoji biosenzorů. V roce 2005 americká firma Apollo Diamond vyvinula způsob, při kterém lze metodou CVD při správné kombinaci teploty, tlaku a složení plynů pěstovat

monokrystalické diamanty. Takoveto krystaly jsou téměř 100 % čisté a kvalitou srovnatelné s přírodními diamanty. [5,11]

### 2.1.3 Detonační diamantové nanočástice

Umělé NDP lze také syntetizovat detonací výbušnin obsahujících uhlík v uzavřené kovové komoře. Poprvé byla tato metoda realizována v roce 1963 v SSSR skupinou vědců K. V. Volkov, V. V. Danilenkov a V. I. Elin. Tento tým, pracující ve výzkumném centru podílejícím se na vývoji jaderných zbraní, zjistil, že vojenská výbušnina obsahující 40 % TNT a 60 % hexogenu je charakterizována zápornou kyslíkovou bilancí. Při detonaci v inertním prostředí (jako je argon nebo voda) tedy vznikají díky nedokonalému spalování saze obsahující diamantový uhlík.

Při explozi je na čele rázové vlny dosaženo správných podmínek pro termodynamickou stabilitu diamantu, tedy vysokého tlaku (20-30 GPa) a vysoké teploty (přes 3000 °C). Po detonaci musí být komora rychle zchlazena, aby byla minimalizována transformace diamantu do grafitových forem dle fázového diagramu uhlíku. Doba, po kterou jsou podmínky vhodné pro tvorbu diamantu je limitována. Detonační NDP jsou tudíž velmi malé (~ 5 nm) a mají vrstvenou strukturu. Diamantové jádro je obklopeno atomy  $sp^2$  uhlíku (grafit či amorfni uhlík) a funkčními skupinami obsahujícími kyslík, jako je například hydroxyl nebo karboxyl, jejichž prostřednictvím dochází k nežádoucí agregaci nanodiamantů. V závislosti na materiálu a matici použitých při výrobě, mohou detonační NDP obsahovat oxidy a karbidy, včetně těch ze železa, chrómu, křemíku, vápníku, mědi, draslíku, titanu a síry. Pro biomedicínské aplikace jsou tedy nutné post-syntetické úpravy krystalů (Obr.3) [5,11,1]



Obr.3: Schéma hlavních strukturálních komponent detonační suti (vlevo) a komerčně dostupných produktů (vpravo) [5]

## 2.2 Vlastnosti

Nanodiamantové částice se těší velkému zájmu v oblasti biomedicínských aplikací (jako je například purifikace, fluorescenční značení a zobrazování či cílený přenos léčiv) především díky svým unikátním chemickým, biologickým a fyzikálním vlastnostem (biokompatibilita, snadná modifikace povrchu, stabilní fluorescence a další)

Mimo oblast biomedicíny nalézá tento materiál své uplatnění také v průmyslu. Díky své charakteristické struktuře tvořené silnými kovalentními vazbami mezi atomy uhlíku je diamant nejtvrděší známý přírodní materiál. Extrémní tvrdost z něj činí ideální materiál pro mechanické aplikace jako je broušení, řezání a leštění. Jeho další výhodou, oproti jiným tvrdým materiálům, je poměrně nízký součinitel tření a vysoká tepelná vodivost, která umožňuje odstranění přebytečného tepla z řezného nástroje. [5]

### 2.2.1 Chemie povrchu

Chemické složení diamantových nanočástic je ovlivněno především použitou technologií výroby. Na jejich povrchu se nacházejí funkční skupiny obsahující kyslík, nejčastěji karboxylové a hydroxylové skupiny, ketoskupiny, anhydridy a laktony, které vznikají v průběhu produkce a následné purifikace. Příkladem může být ošetření kyslíkatou kyselinou za účelem odstranění  $sp^2$  atomů uhlíku a kovových zbytků z povrchu částic. Bylo zjištěno, že HPHT nanodiamantové částice obsahují po působení kyslíkatou kyselinou téměř 7 % karboxylových skupin, což je dostatečné množství pro navázání biomolekul. Tyto post-syntetické úpravy zvyšují homogenitu materiálu, odstranění nečistot z povrchu zároveň snižuje jeho toxicitu. [12,2,13]

Výhodou nanodiamantů, oproti jiným nanočásticím, je velmi snadná modifikace povrchu, který poskytuje univerzální platformu pro navázání biomolekul skrze kovalentní i nekovalentní vazbu. Na nanodiamant pak může být navázán například antigen, DNA, růstové hormony či globulární proteiny. Povrchové karboxylové skupiny jsou využívány jako ligand pro kovalentní spojení těchto biomolekul k částici skrze amidové vazby. Toto spojení umožňuje větší míru specifity a síly vazby, ovšem realizace je složitější než u spojení nekovalentního, kde stačí prosté smíchání jednotlivých komponent. Nekovalentní vazba může být realizována prostřednictvím elektrostatických sil, polárních vazeb nebo hydrofobních interakcí. Nespornou výhodou částic nanometrových rozměrů je také velikost jejich povrchu ( $300-400 \text{ m}^2/\text{g}$ ). [2,13,14]

### 2.2.2 Biokompatibilita

Možné použití nanodiamantových částic v oblasti biomedicíny nutně vedlo k otázce týkající se biokompatibility tohoto materiálu. Potencionální cytotoxicita je spojena především s velmi malými rozměry částic, které umožňují jejich průnik do buněk a lokalizaci v organelách. Další klíčovou vlastností je čistota materiálu, spojená s co možná nejvyšším procentuálním zastoupením  $sp^3$  atomů uhlíku, zajišťující jeho biologickou inertnost. Cytotoxicita je také závislá na technologii výroby. Například HPHT diamanty méně ovlivňují životaschopnost, metabolickou aktivitu a proliferaci buněk než diamanty syntetizované



detonací. Důvodem je menší velikost částic a přítomnost nečistoty na povrchu detonačních nanodiamantů. I přesto vykazují v porovnání s kovovými a polovodičovými nanočásticemi (např. kvantové tečky) velmi nízkou toxicitu. [2,13,14]

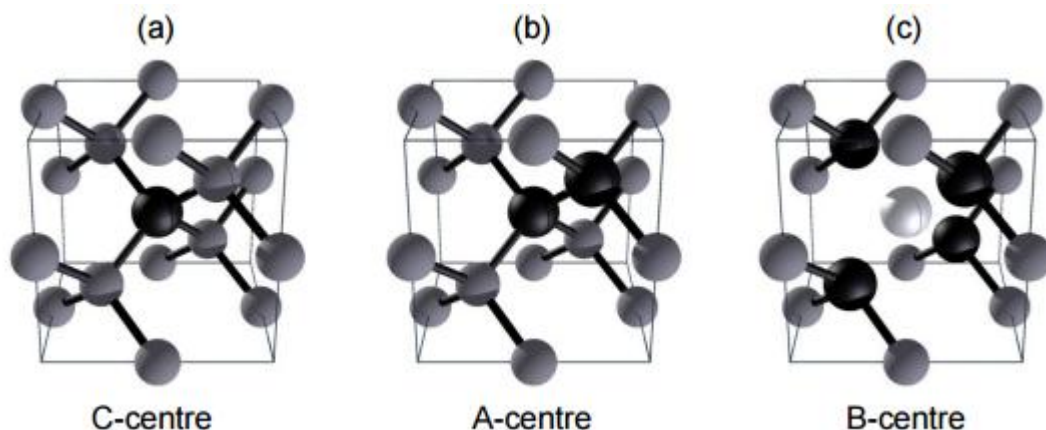
Existuje celá řada studií zabývajících se biokompatibilitou uhlíkových nanomateriálu. V jednom z experimentů byla porovnávána cytotoxicita nanodiamantových částic a uhlíkových nanovláken u dvou buněčných linií (konkrétně makrofágů a buněk neuroblastomu). Výsledky ukazují, že přítomnost nanodiamantů významně neovlivňuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), mitochondriální funkce a tvorbu ATP u těchto buněk. Naproti tomu uhlíková nanovláknina vykazovala cytotoxicitu v obou případech. [15] V další studii Puryz a kol. zkoumali dlouhodobý účinek na organismus *in vivo*. Po dobu šesti měsíců byly myšim orálně podávány nanodiamantové částice (celkové množství se pohybovalo v rozmezí od 16 do 450 mg). U prvních tří generací myši nebyl pozorován vliv na reprodukční schopnost, hmotnostní dynamiku a růst vnitřních orgánů. [16]

### 2.2.3 Optické vlastnosti

Čistý diamant je vysoce transparentní v ultrafialové, viditelné i infračervené oblasti (výjimkou je oblast v rozmezí 2000-6000 nm, kde transmisivita značně klesá díky infračervenému absorpčnímu systému uhlík-uhlík). Transparentnost je hlavním důvodem, proč je tento nerost tolik ceněn jako klenot, a zároveň se stává atraktivním materiálem pro optické aplikace. Dále je charakterizován vysokým indexem lomu a značnou disperzí: zatímco index lomu při vlnové délce 644 nm je 2,41, jeho hodnota se zvyšuje na 2,54 při 300 nm a až na 2,7 v ultrafialové oblasti při 230 nm. Ale tyto částice nemusí být pouze čiré, pokrývají širokou škálu barev od žluté, modré, zelené až po růžovou či červenou. Tento jev je způsobený přítomností substitučních atomů (jako je například vodík, brom, fluor, dusík a mnoho dalších), které mohou kromě vzhledu ovlivnit také fyzikální vlastnosti nerostu. V poslední době se řada nových aplikací zaměřuje právě na přítomnost těchto defektů a barevných center v krystalové mřížce, které mají jedinečné optické vlastnosti. Z pohledu biomedicínské aplikace jsou nejvýznamnější tzv. centra „dusík – vakance“ (nebo-li N-V centra z anglického nitrogen-vacancy). [4,5]

#### N-V centra

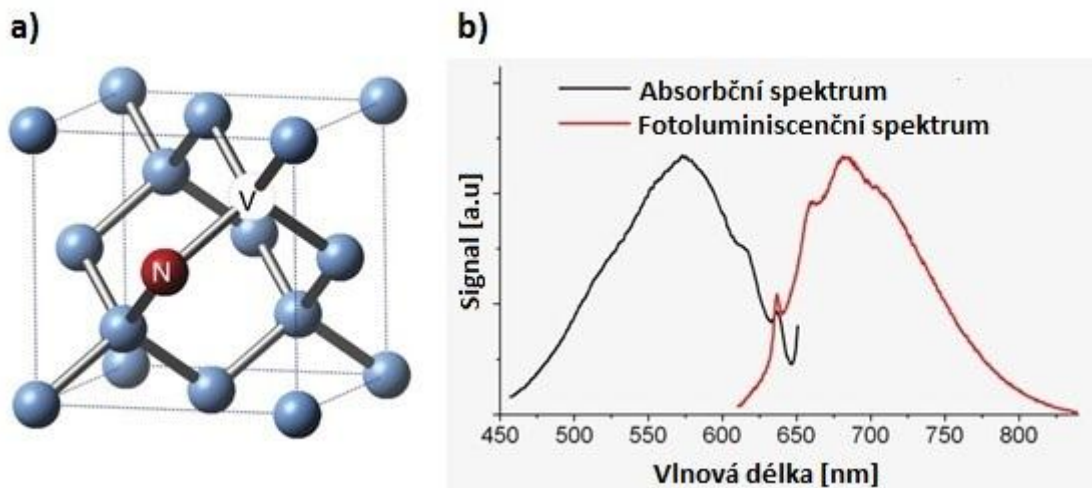
Existují celé stovky luminiscenčních příměsí, které mohou být zabudovány do struktury nanodiamantu, ovšem dusík si zaslouží zvláštní pozornost. Jedná se o nejčastěji se vyskytující nečistotu zodpovědnou za velké množství bodových poruch, které mají unikátní optické vlastnosti. Dusík může v nanodiamantu existovat ve formě samostatné substituční příměsí, nazývajících se jako C-centra nebo ve formě agregátů nazývajících se jako A- centra (dvojice sousedící atomů) a B-centra (čtyři atomy dusíku obklopující vakance)(*Obr.4*). Ze všech struktur, které může dusík v diamantu tvořit, je nejzajímavější a také nejvíce studované centrum dusík-vakance (NV). NV má při pokojové teplotě jedinečné vlastnosti, které z něj činí zajímavý objekt pro praktické použití v mnoha oblastech výzkumu.



Obr.4: Struktura některých dusíkatých defektů v diamantu a) C-centra b) A-centra a c) B-centra. Uhlíkové atomy jsou znázorněny šedou barvou, dusíkaté černou a vakance bílou bez vazeb se sousedními atomy. [5]

Centrum dusík-vakance je bodová porucha v krystalové mřížce nanodiamantu . Skládá se z nejbližšího páru atomu dusíku (substituujícího atom uhlíku) a vakance, tedy neobsazeného uzlu mřížky. NV centra se mohou vyskytovat ve dvou stavech s odlišným nábojem, neutrální  $N-V^0$  a negativní  $N-V^-$ . Atom dusíku má pět valenčních elektronů, z nichž tři jsou kovalentně vázány na atom uhlíku, zbývající dva tvoří volný elektronový pár. Vakance má tři elektrony, z nichž dva se váží na atom dusíku a třetí zůstává nepárový. V případě  $N-V^-$  se předpokládá, že neutrální  $N-V^0$  získává další, šestý elektron například od jiného atomu dusíku fungujícího jako dárce. Nábojový stav defektu tedy nejvíce závisí na přítomnosti dalších příměsí v jeho okolí. [5,8,17],

Nejužitečnější vlastností těchto center je především jejich silná absorpce a následná fotoluminiscence ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra., která umožňuje využití při zobrazování na buněčné úrovni. Negativní a neutrální NV centra se liší svými excitačními a emisními spektry. Jak můžeme vidět na Obr.5, absorpční maximum  $N-V^-$  center se pohybuje okolo 560 nm a emisní maximum okolo 690 nm což odpovídá zářivě červenému světlu. Spektra neutrálních NV center jsou posunuta blíže k modré oblasti elektromagnetického záření. Intenzita luminiscence z nanodiamantů obsahujících NV centra závisí na počtu NV center v částici. Velkou výhodou N-V je jejich vysoká fotostabilita (nedochází k fotodegradaci známé „photobleaching“) a časová stabilita průběhu fluorescence – absence „blikání“. [14,18,17]



Obr.5: a) Krystalová mřížka diamantu s barevnými NV centry. b) Excitační a emisní spektrum NV center [19]

Centra NV vznikají z jednotlivých substitučních dusíkatých center ozářením, které je následováno žháním při vysokých teplotách. Nejdříve dojde k odstranění atomů uhlíku z krystalické mřížky ozářením vysokoenergetickým svazkem urychlených částic (3 MeV), může se jednat například o elektrony či protony. Tím vytvoříme volná místa, tedy vakance. Následuje žhání při vysokých teplotách (nad 600 °C), které způsobí, že vakance migrují v krystalické mřížce. V případě, že se vakance dostane do blízkosti atomu dusíku, vzniká pár tvořící centrum N-V, který je stabilnější než samotná vakance.[14,18, 20]

## 2.3 Aplikace

### 2.3.1 Fluorescenční sondy

Proto, abychom detailněji pochopily principy fungování živých organismů, je potřebné jejich sledování na buněčné úrovni. Aby se zabránilo rušení signálu vlastní fluorescencí buňky, je výhodné použít fluorescenční sondy, které pohlcují vlnové délky delší než 500 nm, a emitují na vlnových délkách nad 600 nm. Existuje celá řada fluorescenčních proteinů a organických barviv splňujících tyto požadavky. Omezujícím faktorem pro dlouhodobé in vitro nebo in vivo pozorování je však jejich nestabilní fluorescence podléhající fotodegradaci. Alternativou mohou být kvantové tečky, které disponují lepšími fluorescenčními vlastnostmi. Jejich primární nevýhodou je ovšem vysoká míra cytotoxicity. Ideálním materiálem pro fluorescenční značení a zobrazování jsou nanodiamantové částice, jejichž fluorescence je stabilní a zároveň jsou vysoce biokompatibilní. Pro tyto účely se používají především NDP připravené metodou HPHT u nichž lze vygenerovat největší počet fluorescenčně aktivních NV center.[2,14,21]

### 2.3.2 Nosiče léčiv

Diamantové nanočástice mají mnoho charakteristických vlastností, díky nimž se stávají ideálními kandidáty pro cílené dodávání léčiv. Nevyvolávají zánětlivou reakci imunitního systému organismu a lze na ně pevně navázat různé molekuly. Mohly by se tak v budoucnosti uplatnit při léčbě různých onemocnění (např. rakoviny). [1] Již v roce 1995 provedl Kossovsky a kol. experiment, ve kterém byly použity komplexy ND-cellobiosa-MAP (adhezní protein mušlí). Takto modifikované NDP byly implementovány do těl králíků, u kterých se prokázala specifická reakce na tyto proteiny. [21] Další studie demonstrovaly nanodiamantem zprostředkovanou dodávku doxorubicinu (DOX). Jedná se o léčivo indukující apoptózu, hojně využívané při léčbě rakoviny. Komplexy s ND-DOX byly použity při modelové léčbě rakoviny prsu (4T1) a rakoviny jater (LT2-M). Bylo zjištěno, že cirkulační čas DOX se prodloužil téměř 10 krát. Mezi další výhody patří, že tyto komplexy nepotlačují funkci kostní dřeně (nejčastěji se projevující poklesem počtu bílých krvinek), nulová úmrtnost při vysokých dávkách a významné zmenšení tumoru.[22,23]

### 2.3.3 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství a regenerační medicína jsou velmi zajímavými oblastmi, zejména s ohledem na jejich potenciál umožnit obnovu poškozené tkáně. Bylo prokázáno, že nanodiamantové monovrstvy mohou sloužit jako platforma pro neurální růst, podobně jako materiály potažené proteiny. Vynikající mechanické vlastnosti, spolu se snadnou modifikací povrchu, biokompatibilitou a schopností dodávat léky a biomolekuly činí s nanodiamantů ideální materiál, který by mohl pomoci vytvořit multifunkční tkáňový nosič. [1]

### 2.3.4 Genová terapie

Genová terapie je velmi slibnou metodou pro léčbu široké škály geneticky podmíněných (dědičných nebo nádorových) chorob. Jejím cílem je inaktivace či nahrazení defektního genu jeho funkční kopií nebo naopak vnesení nového genu, který organismu napomáhá v boji proti nemoci. Velmi snadnou a rychlou metodou ovlivňující genovou expresi regulací transkripce je RNA interference (RNAi). V tomto procesu hrají klíčovou roli krátké sekvence RNA, nazývané jako siRNA (“small interfering RNA“) nebo miRNA (“micro RNA“). Tyto malé molekuly RNA jsou schopny navázat se na mRNA (“messenger RNA“), která nese informaci o pořadí aminokyselin budoucího proteinu. Podle míry komplementarity mezi těmito molekulami dojde buď k inhibici nebo úplné degradaci úseku mRNA. Toho může být využito například pro regulaci buněčného dělení v léčbě rakoviny. Tento přístup se liší od klasických léčebných metod, které potlačují příznaky, ale neřeší příčinu na genetické úrovni. [24]

Existuje několik hlavních aspektů ovlivňujících účinný přenos aktivní molekuly do buňky, ať už se jedná o již zmíněné malé molekulární léky, nukleové kyseliny nebo terapeutické proteiny. Ideální nosič by měl být schopný navázat dostatečné množství aktivních molekul, efektivně proniknout do buňky a uvolnit zde nepoškozené aktivní molekuly. Zároveň je důležitá nízká úroveň toxicity těchto nosičů. [25,26]

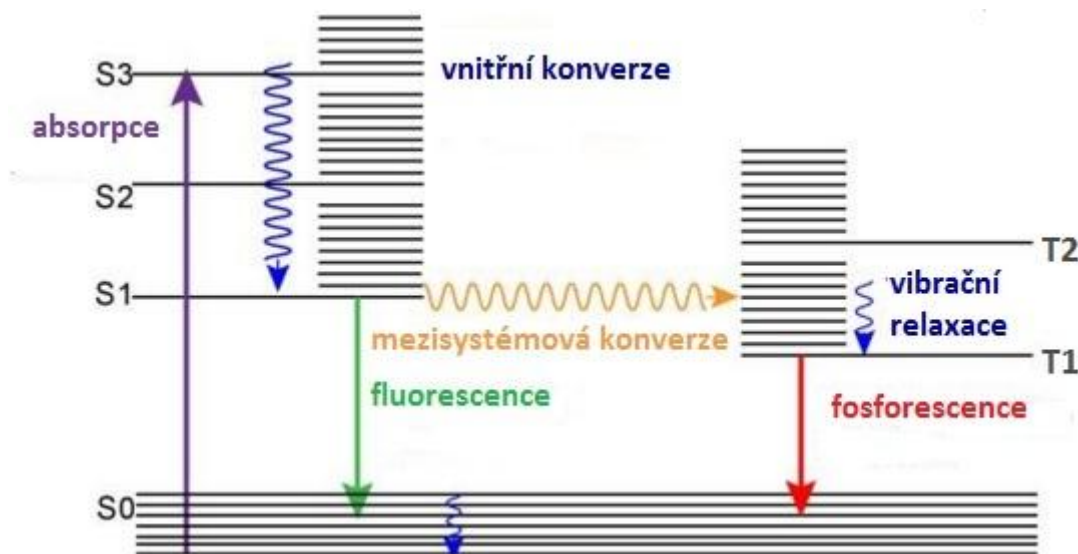
Prezentovány jsou dva přístupy dodávky genů do hostitelské buňky: virové a neviróvé. Běžnější je přenos pomocí virů, protože viry mají přirozeně vyvinutou schopnost infikovat buňku s vysokou účinností. Použití virových vektorů je ovšem spojeno se složitým procesem přípravy a rizikem vyvolání nežádoucí imunitní reakce, proto nebylo doposud zavedeno do klinické praxe. Naproti tomu syntetické neviróvé systémy, jako jsou lysozomy a polymery, přinášejí několik výhod včetně snadné syntézy a snížení rizika cytotoxicity a imunogenicity. Jejich použití je ale omezeno relativně nízkou transfekční účinností. Přičemž transfekcí rozumíme dodání nukleové kyseliny do nitra eukaryotní buňky. [3]

V poslední době se objevují studie zabývající se aplikací nanočástic jakožto nosičů nukleových kyselin v genové terapii (např. zlatých, silikonových nebo diamantových). Zkoumána je především transfekce kationtových komplexů nanodiamant-polymer (velmi často polyethylenimin-PEI) s navázanou siRNA nebo miRNA. PEI je velmi rozšířený neviróvý genový nosič, jehož vysoká transfekční účinnost je přisuzována převážně schopnosti účinně kondenzovat DNA a opustit endozomální váček dříve než dojde k její degradaci. Studie zabývající se dodávkou genu do buněk prostřednictvím komplexu ND-PEI prokazují účinnost této metody. [3,27] V jedné ze studií byly testovány diamantové nanočástice funkcionalizované dvěma typy polymerů: polyethyleniminem (PEI) a polyallylamin hydrochloridem (PAH). Bylo zjištěno, že komplexy ND-PAH mají vyšší schopnost vázat siRNA. ND-PEI-siRNA měly ale v konečném důsledku větší vliv na inhibici EWS-Fli1 genu u buněk Ewingova sarkomu. [25,26]

### 3 Fotoluminiscence

Fotoluminiscence je proces emise světla, která je výsledkem absorpce elektromagnetického záření. Jedná se o jednu z mnoha forem luminiscence (emise světla) vyvolané fotoexcitací. Při interakci fotonu s molekulou dochází k předání energie a excitaci (přechodu) elektronu do elektronové hladiny s vyšší energií. Následuje rychlá vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu excitovaného stavu a až poté dochází k elektronovému přechodu zpět na základní energetickou hladinu, při kterém je vyzářen foton. Energie emitovaného záření je obvykle nižší než energie záření absorbovaného, tento fenomén je nazýván jako Stokesův posuv.

Možné elektronické a vibrační stavy molekuly a přechody mezi nimi znázorňuje Jablonského diagram (Obr.6). Stavy jsou uspořádány svisle dle hodnoty energie a horizontálně dle spinové multiplicity. Barevné šipky reprezentují zářivé a nezářivé přechody. Zářivé přechody zahrnují absorpci (v případě, že je foton pohlcen) a emisi, při které dochází k vyzáření fotonu po přechodu elektronu na nižší energetickou hladinu. K vyzáření fotonu může dojít dvěma způsoby, prostřednictvím fluorescence nebo fosforescence. Fluorescence je spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_1$  do některé z vibračních hladin  $S_0$  (doba trvání je typicky okolo  $10^{-8}$  s). Naproti tomu fosforescence je zářivý přechod z vyššího energetického stavu do nižšího o rozdílné multiplicitě (delší doba trvání -  $10^{-3}$  až  $10^0$  s). [28,29]



Obr.6: Jablonského diagram [29]

Mezi nezářivé přechody řadíme vibrační relaxaci, vnitřní a mezisystémovou konverzi. Uvolnění excitovaného stavu na nejnižší vibrační úroveň se nazývá vibrační relaxace. Vnitřní konverze nastává, když dojde k přesunu z energeticky vyššího vibračního stavu do vibračního stavu s nižší energií. Stejný proces, který ale probíhá mezi vibračními stavy s různou spinovou multiplicitou se nazývá konverze mezisystémová. [28]

### 3.1 Doba života fluorescence a kvantový výtěžek

Kvantový výtěžek je poměr množství emitovaných fotonů ku počtu fotonů absorbovaných. Jak už bylo zmíněno dříve, k deexcitaci na základní energetickou hladinu může dojít prostřednictvím zářivých a nezářivých procesů. Kvantový výtěžek je dán vztahem (1). Hodnota kvantového výtěžku se může blížit 1, v případě, že rychlostní konstanta nezářivých přechodů je mnohem menší než rychlostní konstanta přechodů zářivých, tedy  $k_{nr} \ll k_r$ . Látky s největším kvantovým výtěžkem jsou charakteristické nejjasnější emisí.

$$Q = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1)$$

Kde  $Q$  je kvantový výtěžek,  $k_r$  je rychlostní konstanta zářivého a  $k_{nr}$  rychlostní konstanta nezářivého přechodu.

Doba života fluorescence je definována jako průměrný čas, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do stavu základního. Dojde-li k excitaci populace fluoroforů, jedná se o čas potřebný k poklesu počtu excitovaných molekul na  $1/e$  nebo 36 % původní populace, to je také úměrné poklesu intenzity záření. Obecně platí, že její hodnota se pohybuje v rozmezí od jednotek pikosekund až do stovek nanosekund. Je charakteristická pro každou substanci a její prostředí. Výpočet lze provést dle vztahu (2). [29,28]

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2)$$

Kde  $\tau$  je doba dohasínání fluorescence,  $k_r$  je rychlostní konstanta zářivého a  $k_{nr}$  rychlostní konstanta nezářivého přechodu.

V případě excitace vzorku nekonečně krátkým pulzem světla dostaneme počáteční populaci ( $n_0$ ) fluoroforů v excitovaném stavu. V čase dochází k poklesu populace podle rovnice (3). Kde  $n(t)$  je počet excitovaných molekul v čase  $t$  po excitaci.

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(f_r + f_{nr}) \cdot n(t) \quad (3)$$

Emise je náhodný jev a každá excitovaná molekula má stejnou pravděpodobnost vyzáření fotonu v daném časovém úseku. Výsledkem toho je exponenciální pokles populace v excitovaném stavu, který je vyjádřen vztahem (4).

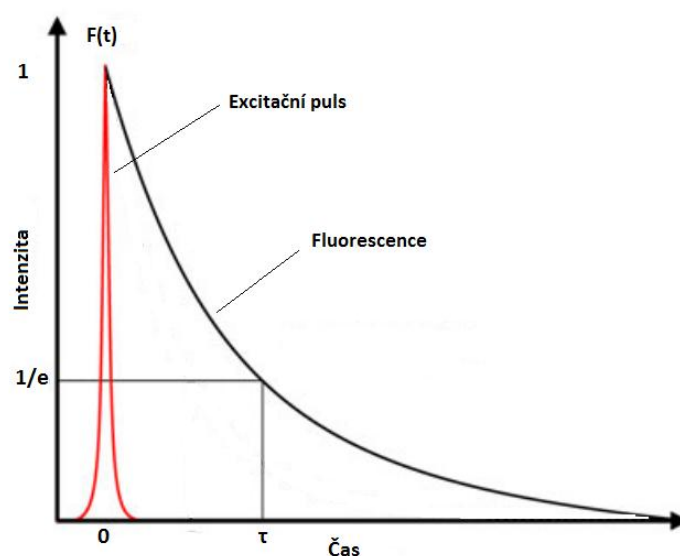
$$n(t) = n_0 \cdot \exp(-t/\tau) \quad (4)$$

Kde  $n(t)$  je počet excitovaných molekul v čase  $t$  po excitaci,  $n_0$  počet excitovaných molekul v čase  $t=0$  a  $\tau$  je doba dohasínání fluorescence.

Při fluorescenčních experimentech ovšem nepozorujeme počet excitovaných molekul, ale spíše intenzitu fluorescence, která je tomuto počtu molekul  $n(t)$  úměrná. Získáme tak ekvivalentní vztah (5) pro intenzitu fluorescence k rovnici (4). [28]

$$I(t) = I_0 \cdot \exp(-t/\tau) \quad (5)$$

Kde  $I_0$  je intenzita fluorescence v čase 0 a  $I(t)$  v čase  $t$ ,  $\tau$  je doba dohasínání fluorescence.



Obr.7: Křivka dohasínání fluorescence [30]

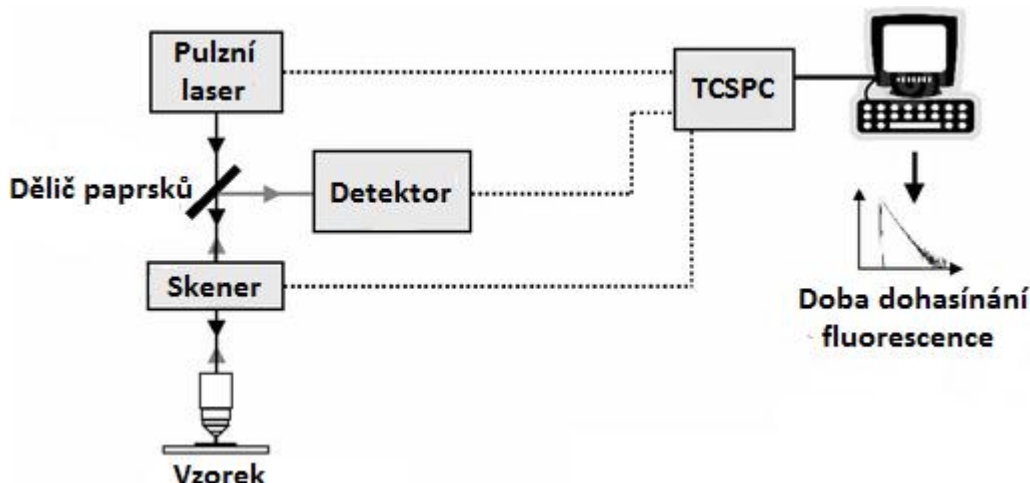
Jelikož doba života fluorescence nezávisí na koncentraci, absorpci vzorkem (tedy ani na jeho tloušťce), blednutí fluoroforu („photobleaching“) a intenzitě excitačního záření, metody založené na jejím měření jsou daleko robustnější než ty založené na měření intenzity. Na druhé straně je doba života závislá na mnoha parametrech prostředí (pH, teplota, polarita, koncentrace iontů), které tak můžeme měřit. Mimo lokální snímání prostředí nám tato metoda umožňuje detekovat např. molekulární interakce nebo změny konformace molekul. [31]

### 3.2 Zobrazování doby života fluorescence (FLIM)

FLIM (Fluorescence lifetime imaging) je fluorescenční zobrazovací technika, která vytváří obraz na základě rozdílné doby života fluorescence jednotlivých substancí ve vzorku. FLIM není ovlivněn fluktuacemi v intenzitě fluorescence a umožňuje rozlišení fluoroforů s podobnými emisními spektry nebo odlišení struktur od autofluorescence pozadí. Hodnoty



doby dohasínání fluorescence lze získat měřením v časové nebo frekvenční doméně. Konfokální laserové skenovací mikroskopy pracují převážně v oblasti časové (TCSPC). Za účelem získání 2-D obrazu je každému fotonu přiřazen příslušný pixel na základě informace o času jeho příchodu vztažené k začátku experimentu. Podrobnější popis prostorové rekonstrukce obrazu metodou TTTR je uveden níže. Obr. 8 znázorňuje jednoduché schéma experimentálního nastavení pro měření doby dohasínání fluorescence metodou TCSPC. Emitované záření ze vzorku, excitovaného krátkými laserovými pulzy, dopadá na detektor. Elektrický signál získaný z detektoru je převeden do předzesilovače a poté na TCSPC elektroniku. [30,32]



Obr.8: Jednoduché schéma experimentálního nastavení pro měření doby dohasínání fluorescence metodou TCSPC [33]

### Časová doména

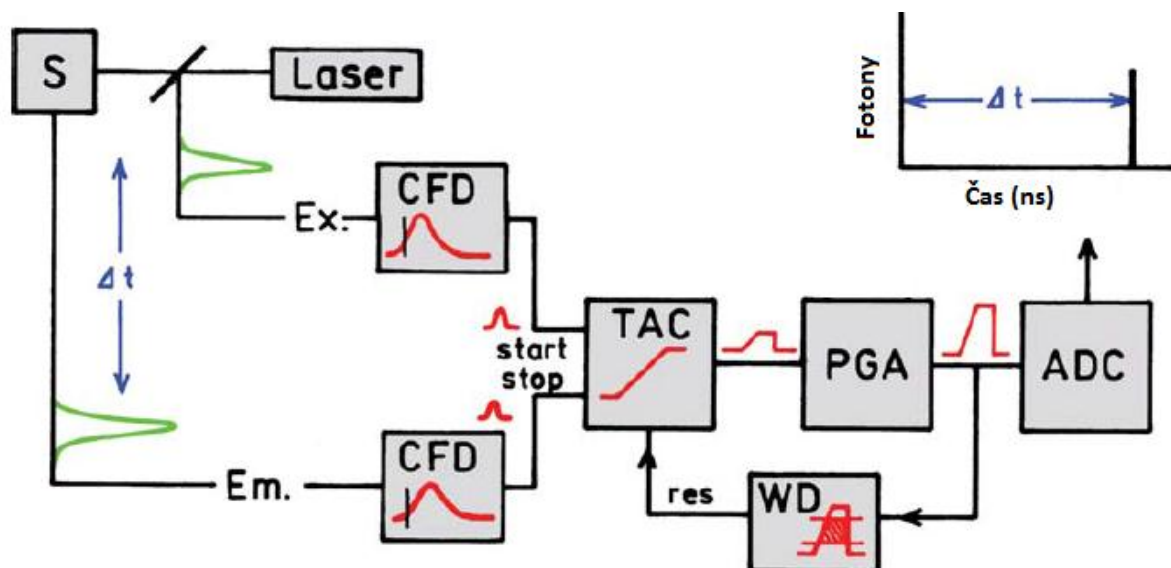
Při měření kinetiky dohasínání fluorescence v časové doméně dochází k excitaci vzorku velmi krátkým pulzem světla. Přičemž je vhodné, aby šířka pulzu byla mnohonásobně kratší než je měřená doba života fluorescence. Po excitaci pulzem měříme intenzitu emise v závislosti na čase. Doba dohasínání je poté vypočtena jako směrnice křivky závislosti  $\log I(t)$  na čase  $t$  nebo je určena jako čas, při kterém intenzita klesne na  $1/e$  původní hodnoty v čase  $t=0$ .

### TCSPC

V současné době nejvyužívanější metodou měření v časové doméně je časově korelované čítání jednotlivých fotonů (TCSPC – time-correlated single-photon counting). Princip této metody vychází ze statistického charakteru dohasínání fotonů. Jako světelný zdroj jsou zde použity pikosekundové nebo femtosekundové pulzní lasery s vysokou opakovací frekvencí (MHz). Metoda spočívá v detekci jednotlivých fotonů fluorescenčního záření a určení doby zpoždění oproti záření excitačnímu. Důležitou podmínkou je, že při každém excitačním pulzu může být detekován nanejvýš jeden jediný emitovaný foton. Ve skutečnosti je průměrně zaznamenáván jeden foton na 100 laserových pulzů. Momentálně dostupná elektronika totiž není dostatečně rychlá, aby detekovala více fotonů na jeden excitační pulz pro

dobu života fluorescence v řádu nanosekund. Důvodem je tzv. „mrtvý čas“ detektoru a elektroniky, který nastává po zaznamenání události a během kterého nelze detekovat další fotony, protože dochází ke zpracování předchozího signálu. V současné době jsou dostupné přístroje jejichž „mrtvý čas“ se pohybuje v řádech ns. Časový rozdíl v dopadu laserového pulzu a následně emitovaného fotonu je zanesen do histogram znázorňujícího distribuci fotonů v čase. V případě, že je dodržena podmínka detekce maximálně jednoho fotonu na jeden pulz, histogram reprezentuje křivku dohasínání. [28,34]

Schéma aparatury je znázorněno na *Obr.9*. Laserem generovaný pulz excituje vzorek a zároveň vyše signál, který projde přes diskriminátor frakční funkce (CFD- constant fraction discriminator), kde je zaznamenán přesný čas jeho příchodu. Stejný signál dále dopadá na časově-amplitudový převodník (TAC – time-amplitude converter), kde vyvolá pokyn pro generaci napětí, které s časem lineárně roste. Na druhém kanálu je detekován emitovaný foton, jehož přesná doba příchodu je zaznamenána pomocí CFD. Odsud je také vyslán „stop signál“ pro ukončení nárůstu napětí na TAC. TAC tak obsahuje informaci o napětí, které je úměrné časovému zpoždění ( $\Delta t$ ) mezi excitačním a emisním signálem. Toto napětí je podle své amplitudy zařazeno do příslušného kanálu mnohokanálového analyzátoru. Bezprostředním výstupem z měření je tedy graf závislosti četnosti pulzů na jednotlivých kanálech, který musí být dále analyzován. V případě potřeby je napěťový signál zesílen laditelným zesilovačem (PGA- programmable gain amplifier) a následně konvertován pomocí analogově digitálního převodníku na numerickou hodnotu. Signál je omezen prostřednictvím diskriminátoru pouze na určitý rozsah napětí, aby nedošlo k záznamu nesprávných údajů. Výsledná numerická hodnota je poté zaznamenána jako jedna událost s odpovídajícím časovým zpožděním. Opakováním tohoto měření pro velký počet fotonů získáme histogram dohasínání fluorescence. [28]

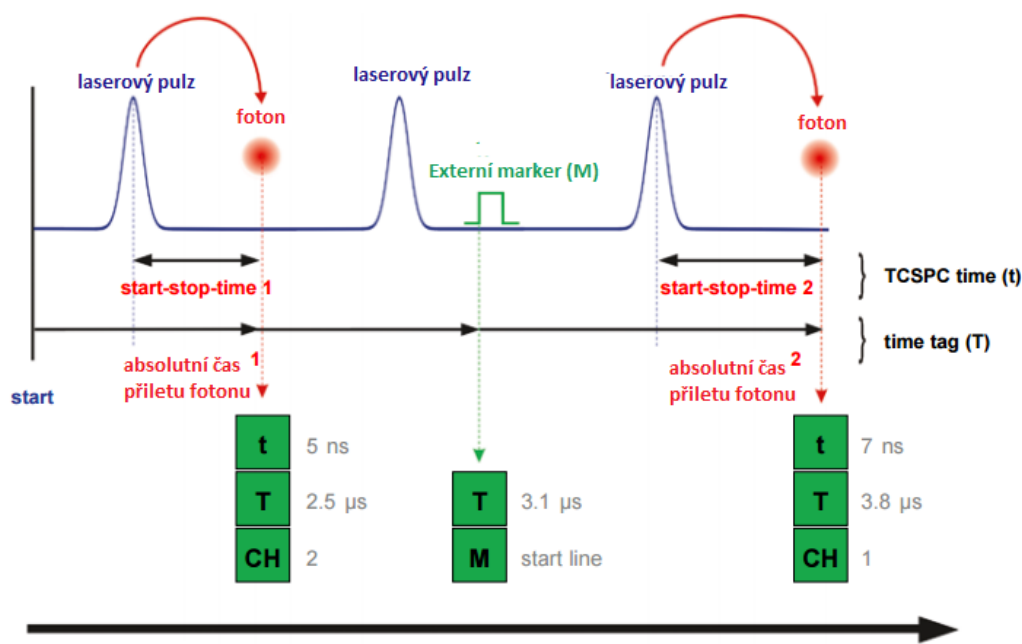


*Obr.9: Schéma aparatury pro TCSPC [28]*

Velmi často je u TCPSC zařízení využíváno reverzního módu. Rozdíl je v tom, že emisní signál je použit jako „start signál“ pro růst napětí na TAC a excitační signál naopak jako „stop signál“. Při normálním nastavení je u pulzních laserů s vysokou opakovací

frekvencí TAC resetován a nataven na nulu před příchodem každého „start pulzu“. Může se tak stát, že TAC je neustále v reset módu, pokud startovní signály přicházejí příliš rychle. [28,34]

Jakousi nadstavbou TCSPC je tzv. time-tagged time-resolved (TTTR) mód. Základní myšlenkou této metody je přidat ke každému naměřenému TCSPC času druhou časovou informaci o detekovaném fotonu. Tato „časová značka“ je zaznamenána v absolutním měřítku a reprezentuje čas příchodu každého fotonu vzhledem k začátku experimentu. U multidetektorového zařízení je zahrnuta také informace o kanálu, tedy na jakém detektoru byl foton zaznamenán. Kromě toho, s cílem podpořit časově rozlišené měření s konfokálním mikroskopem, TTTR datový tok je rozšířen o přesný časový záznam externích synchronizačních značek (markerů) odvozených ze zobrazovacího zařízení (jako např. piezo skeneru). Díky tomu můžeme vždy určit příslušnou XYZ pozici skeneru a provést 2D nebo 3D rekonstrukci obrazu. Obr.10 prezentuje princip měření. Pokaždé, když je registrován foton, jsou zaznamenány informace o odpovídajícím „start-stop“ času, „time tag“ času a příslušném kanálu. Analogicky je zaznamenán „time tag“ pro synchronizační signál. Při měření v TTTR módu tedy získáváme kompletní informaci o dynamice fotonu, záznam může být přenášen v reálném čase a neobsahuje žádná redundantní data. [31,32]



Obr.10: Schéma měření v TTTR módu [35]

## Frekvenční doména

Druhou možností měření doby dohasínání je měření ve frekvenční doméně, nebo-li metodou fázové modulace. V tomto případě je vzorek excitován světlem, jehož intenzita je sinusově modulovaná s úhlovou frekvencí  $\omega$ . Frekvence modulovaného záření se pohybuje v řádech MHz, jeho převrácená hodnota tak odpovídá převrácené hodnotě doby dohasínání. Fluorescenční vzorek buzen tímto způsobem je nucen odpovídat na stejné modulační frekvenci. Konečná doba života fluorescence vzorku způsobí, že emise je zpožděna v čase

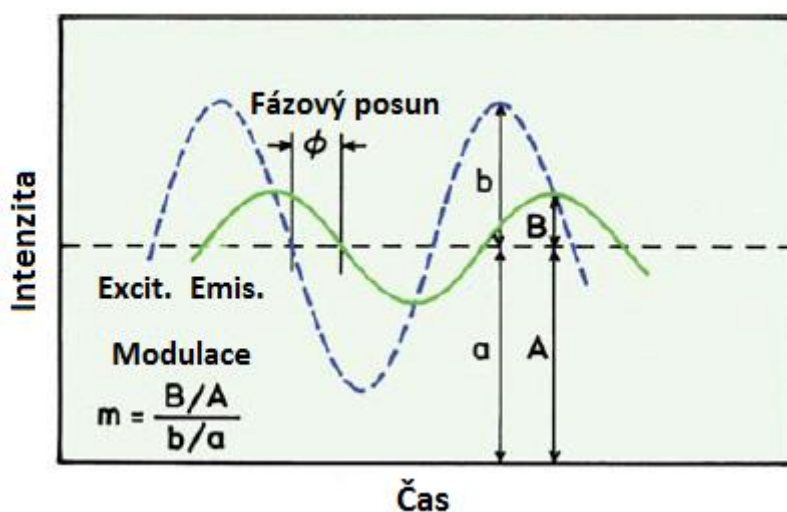
vzhledem k excitaci. Toto zpoždění odpovídá fázovému posunu  $\phi$ , který může být následně použit pro výpočet doby dohasínání. U emitovaného záření zároveň dochází k poklesu hloubky modulační. Doba dohasínání fluorescence potom může být vypočtena podle vztahu (6) a (7). Kde  $m = (B:A)/(b:a)$  je poměr hloubek modulační excitace a emisního záření (Obr.11). Tyto vztahy platí pouze pro čistě exponenciální dohasínání. [28,34]

$$\operatorname{tg}\phi = \omega \cdot \tau \quad (6)$$

Kde,  $\phi$  je fázový posun mezi excitacím a emisním zářením,  $\omega$  je úhlová frekvence a  $\tau$  je doba dohasínání fluorescence.

$$m = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}} \quad (7)$$

Kde,  $m$  je modulační,  $\omega$  je úhlová frekvence a  $\tau$  je doba dohasínání fluorescence.



Obr.11: měření doby dohasínání fluorescence v časové doméně. Poměry  $B/A$  a  $b/a$  reprezentují modulační emisního a excitace záření. [28]

## 4 Interakce diamantových nanočástic s buňkou

### 4.1 Endocytóza

Endocytóza je aktivní transport rozpuštěných látek, makromolekul, virů a pevných částic různé velikosti z okolí do nitra buňky. Materiál, který má být internalizován, je obklopen částí plazmatické membrány, která je následně vchlípena do intracelulárního prostoru za vzniku membránového měchýřku. Měchýřek je od plazmatické membrány odštěpen a uvolněn do cytoplazmy ve formě endozomu. Obsah endozomu může být vypuštěn volně do cytoplazmy, transportován do jiných buněčných kompartmentů nebo vyloučen prostřednictvím exocytózy zpět do extracelulárního prostoru. [36,37]

Endosomy můžeme rozdělit na rané a pozdní. Rané endosomy se nacházejí na periferii buňky a jejich vnitřní prostředí má středně kyselé pH. Hlavní funkcí těchto struktur, které stojí na počátku endocytotické dráhy, je tříditi pohlcený materiál a rozhodnout o jeho dalším osudu v nitru buňky. Látky zde mohou disociovat a jejich část (například některé receptory, proteiny a lipidy) jsou transportovány zpět na povrch buňky. Tento proces je označován jako „recyklace“. Zbýlý obsah je kumulován do tzv. pozdních endosomů, které se nacházejí v blízkosti jádra. Mají kyselější pH (5-6), které je udržováno pomocí ATP-poháněné  $H^+$  pumpy, která přečerpává  $H^+$  z cytosolu do endosomálního lumen. Obsahují již některé hydrolytické enzymy zahajující protelytický rozklad. Poslední fází je splynutí s lyzosomelem. Lyzosity jsou organely zajišťující buněčné trávení. Obsahují okolo 40 typů hydrolytických enzymů, jejichž aktivitu zajišťuje velmi kyselé vnitřní prostředí. Lyzozomální membrána izoluje tyto destruktivní enzymy od cytosolu buňky, ale jejich závislost na kyselém pH chrání struktury cytosolu i při poškození membrány. [36,37]

Dle charakteru přijímaného materiálu můžeme dělit endocytózu na fagocytózu a pinocytózu. Fagocytóza označuje děj, při kterém dochází k pohlcování částic větších než 250 nm v průměru. Naopak při pinocytóze jsou internalizovány kapaliny a malé částice v ní rozpuštěné. Zvláštním případem pinocytózy je receptory zprostředkovaná endocytóza.

#### 4.1.1 Fagocytóza

Během fagocytózy buňky pohlcují velké částice, jako jsou bakterie, úlomky buněk nebo dokonce celé neporušené buňky. Při kontaktu částice s receptory na povrchu buňky dojde k vytvoření povrchových výběžků zvaných panožky (pseudopodia), které postupně částici obalují. Vzniká tak intracelulární váček (větší než 0.25  $\mu m$  v průměru), který se nazývá fagosom. Fagosomy později fúzí s lyzositymi za vzniku fagolyzosomů. Fagocytóza je vlastností všech buněk, nejvýraznější je ovšem u tzv. fagocytujících buněk, kterými jsou například makrofágy nebo některé bílé krvinky. Jejich hlavní funkcí je pohlcování nepřátelských agens a odklizení poškozených buněk. Makrofágy mohou například každý den strávit více než  $10^{11}$  zestárých červenýchrvinek. [36,37,38]

## 4.1.2 Pinocytóza

Pinocytóza vyjadřuje proces, při kterém buňky přijímají část extracelulární tekutiny a její obsah. Tekutina je obklopena plazmatickou membránou a po následném oddělení vzniká pinocytární váček o velikosti okolo 150 nm. Většina váčků následně v cytosolu splývá s lyzosomi. Jedná se o proces, který u eukaryotních buněk probíhá nepřetržitě. Takovouto formu pinocytózy nazýváme konstitutivní, jedná se o nespecifický transport látek. V případě pohlcování molekul větších rozměrů mluvíme o makropinocytóze. Ta je charakteristická aktinem zprostředkovaným zřasením plazmatické membrány následovaným tvorbou filopodií, které slouží pro zachycení extracelulární tekutiny s rozpuštěnými látkami. Filopodie se následně opět spojí s plazmatickou membránou a vytváří ohraničené váčky o velikosti 0.5 – 5 µm zvané makropinozomy. Na druhé straně existuje také specifická forma pinocytózy známá jako receptorem zprostředkovaná endocytóza.

### Receptorem zprostředkovaná endocytóza

Receptorem zprostředkovaná endocytóza poskytuje mechanismus pro selektivní absorpci specifických molekul. Molekuly, které mají být internalizovány se nejdříve váží na specifické receptory na povrchu buňky. Receptory jsou soustředěny ve speciálních oblastech plazmatické membrány, nazývaných jako klatrinem potažené jamky („clathrin-coated pits“). Na cytosolové straně membrány je umístěn protein klatrin, podle kterého je tento proces označován také jako klatrinem zprostředkovaná endocytóza. Klatrinem potažené jámy tvoří téměř 2 % povrchu hepatocytů a fibroblastů. Po odštěpení vzniká endocytózový měchýřek, který je obalen síťovým pláštěm tvořeným klatrinem („coated vesicle“). V cytosolu dochází k uvolnění klatrinu z povrchu měchýřku a jeho zpětnému transportu k vnitřnímu povrchu plazmatické membrány. Vzniká tak raný endosom. Díky jeho kyselému prostředí dochází k disociaci vazby ligand-receptor a receptor se tak stejně jako klatrin vrací do plazmatické membrány prostřednictvím transportních váčků. [39,38]

Internalizace látek pomocí tohoto mechanismu je velice účinná. Receptory soustřeďují velké množství přenášené látky i přes jejich nízkou koncentraci v okolní tekutině. Buňka tak může pohlcovat i málo koncentrované látky, aniž by současně musela přijímat odpovídající objem kapaliny. Díky tomu je tento proces až 1000 krát účinnější než nespecifická pinocytóza. Nejlépe prostudovaným příkladem klatrinem zprostředkované endocytózy je internalizace cholesterolu. [36,37]

Posledním typem endocytózy je endocytóza kaveolární, která byla objevena až v polovině dvacátého století. Kaveoly jsou specializované struktury bohaté na cholesterol a sfingolipidy, které vznikají invaginací plazmatické membrány. Vnější strana těchto útvarů je obalena proteinem kaveolinem. Internalizace prostřednictvím kaveol není konstitutivní, dochází k ní pouze po stimulaci buněk. [40]

## 4.2 Mechanismus internalizace ND do buněk

Internalizace látek z extracelulárního prostoru je jednou z klíčových otázek nejenom pro účinné dodání léčiv, ale i pro pochopení mechanismů zapojených do rakovinné terapie

a pro další biomedicínské aplikace. Například pro efektivní optimalizaci genového nosiče je důležité, aby byl stanoven přesný profil jeho buněčného vychytávání, protože to do značné míry určuje jeho intracelulární zpracování a následnou účinnost transfekce. Hlavními mechanismy průniku látek z okolního prostředí do buňky jsou difuze a aktivní a pasivní transport. Způsob internalizace silně závisí na vlastnostech částice (jako je velikost a chemie povrchu), stejně jako na typu buňky.

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, endocytóza je aktivní transport, který je závislý na energii ve formě ATP (adenosintrifosfát). Jsou využívány dva způsoby blokace tvorby ATP a následně tedy i transportu částic endocytózou. Konkrétně se jedná o inkubaci buněk při nízké teplotě (většinou 4°C) a inkubaci po předchozím přidání  $\text{NaN}_3$ . Pro stanovení konkrétní endocytotické dráhy je nutné aplikovat další inhibitory: Cytohalosin D 10 pro blokaci fagocytózy, Chlorpromazin nebo sacharózu pro blokaci klatrinem zprostředkované endocytózy, inhibitor Filipín narušující syntézu cholesterolu potřebného pro endocytózu zprostředkovanou kaveolinem a amilorid zabraňující makropinocytóze prostřednictvím inhibice  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ATPázy. [41]

Existuje celá řada studií zabývajících se přesnou charakterizací průniku nanodiamantových částic do buňky. V jedné z nich byla zkoumána interakce buněk Ewingova sarkomu s fluorescenčními NDP funkcionalizovanými polymery polyalliaminem (PAH) a polyethyleniminem (PEI) a následně navázanou siRNA. Vyhodnocení proběhlo pomocí fluorescenční konfokální mikroskopie, elektronové transmisní mikroskopie a PCR (exprese genu EWS-Fli1). Bylo prokázáno, že navázaný polymer může ovlivnit mechanismus internalizace. Zatímco u komplexu ND-PAH-siRNA převládala klatrinem zprostředkovaná endocytóza, u ND-PEI-siRNA byl zjištěn také průnik částic prostřednictvím makropinocytózy. Makropinocytóza převládá u větších částic, jakými mohou být například agregáty. V případě ND-PAH se po 4 hodinách inkubace nacházela většina částic vně buňky ve formě agregátů, u pohlčených částic byla pozorována kolokalizace s lyzomy. Naopak komplexy ND-PEI byly převážně uvnitř buňky. Je tedy zřejmé, že částice s navázaným polyethyleniminem mají větší transfekční účinnost. Metoda PCR v 50 % potvrdila inhibici exprese cílové mRNA. Inhibice nebyla pozorována při aplikaci samotného komplexu PEI-siRNA. Přítomnost různých inhibitorů specifických drah jasně ukázala, že makropinocytóza je hlavní cestou dodávky aktivní siRNA degradující cílovou mRNA. [42]

V další studii byl porovnáván průnik nanodiamantových částic do nádorových a nenádorových buněk. Použity byly buněčné linie A549 (buňky lidského plicního adenokarcinomu), Beas-2b (buňky epitelu plic) a HFL-1 (plicní fibroblast). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí Ramanovy spektroskopie a fluorescenční konfokální mikroskopie. Účinnost pronikání částic do nádorových buněk je vyšší než u buněk nenádorových, rozdíl se projeví zejména při inkubaci delší než 60 min. Použitím různých typů inhibitorů bylo prokázáno, že endocytóza zprostředkovaná klatrinem je hlavní cestou příjmu NDs u nádorových i nenádorových buněk. Ovšem u nádorových buněk není vyloučena přítomnost dalšího internalizačního mechanismu. [43] Stejného výsledku bylo dosaženo také při použití Hella buněk.[44] Naopak v nedávné studii z roku 2015 byla určena jako hlavní cesta příjmu

nanočástic HepG2 buňkami (karcinom jater) makropinocytóza. Po přidání inhibitoru amiloridu blokujícího tuto endocytotickou dráhu došlo k poklesu vychytávání o více jak 50 %, při inhibici klatrinem zprostředkované endocytózy se množství pohlceného materiálu téměř nezměnilo. Kromě toho byla na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu pozorována tvorba filopodií (výběžky cytoplazmy), které jsou pro makropinocytózu charakteristické. [45]

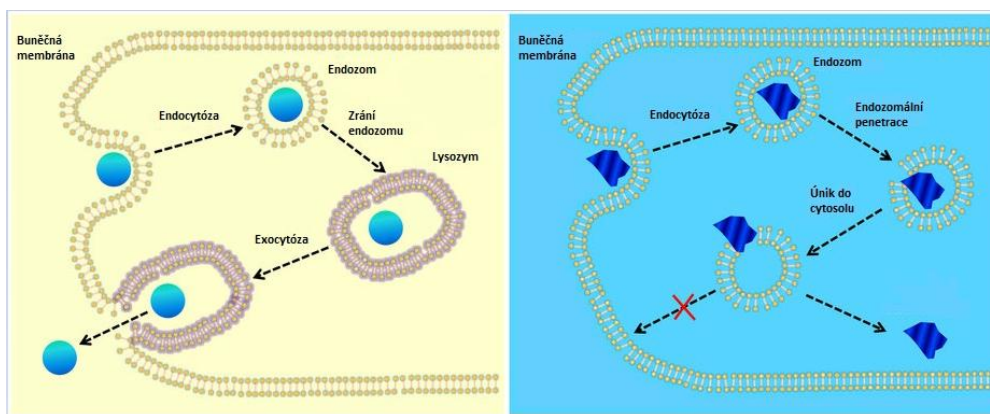
### 4.3 Buněčná dynamika nanočásti

Pro úspěšnou aplikaci nanočástic jako nosičů léčiv, nukleových kyselin či proteinů je důležitá nejen jejich efektivní penetrace prostřednictvím endocytózy, ale také následná lokalizace uvnitř buňky. Bezprostředně po proniknutí do buňky se nanočástice vyskytují v raných endozomech. Intracelulární translokace do značné míry závisí na skutečnosti, zda jsou částice schopny z endozomů uniknout do cytoplazmy či nikoliv. Jejich volný výskyt v cytoplazmě je rozhodující pro výslednou účinnost dodávané látky. V případě, že by částice nebyly uvolněny, dojde ke splynutí endozomu s lyzozomem a následné degradaci těchto látek. Uzavření nanočástic v membránových vezikulách také zvyšuje pravděpodobnost jejich buněčného vyloučení prostřednictvím exocytózy.

Nedávné studie ukazují, že klíčovou roli při uvolňování nanočástic z raných endozomů hraje především jejich morfologie. Naopak nebylo prokázáno, že by byl tento proces ovlivněn velikostí částic, složením, chemií povrchu nebo jejich elektrostatickými charakteristikami.

V jednom z experimentů je porovnávána buněčná dynamika několika částic odlišných tvarů a složení. Nejdříve byly vyšetřovány nanodiamantové částice, které měly nepravidelný tvar a ostré rohy. Bylo zjištěno, že takovéto NDs unikly z endozomu krátce po internalizaci, zároveň nedocházelo k jejich buněčnému vyloučení. Následně byly tyto částice potaženy tenkou vrstvou  $\text{SiO}_2$ . Chování těchto částic uvnitř buňky bylo totožné s předchozím případem. Chemickým leptáním povrchu NDs s ostrými hranami byly získány částice sférického tvaru. U těchto částic byla pozorována převaha výskytu v membránových vezikulách ( endozomech a později lyzosomech) a snadné vyloučení do extracelulárního prostoru. Stejně chování bylo prokázáno u kulatých  $\text{SiO}_2$  nanočástic. Předchozí výsledky byly potvrzeny experimenty se sférickými a ostrými nanočásticemi zlata, které mají zcela odlišnou chemii povrchu a náboj než NDs a  $\text{SiO}_2$  NP. [46]





Obr.12: Schéma intracelulárního chování částic s rozdílnými morfologickými vlastnosti [46]

Další studie se zabývá lokalizací diamantových a  $\text{SiO}_2$  částic s navázanou pEGFP-N1 plasmidovou DNA (nesoucí gen EGFP) v buňkách HepG2. Nanodiamantové částice byly zachyceny v endozomech jen velmi krátkou dobu a poté byly transportovány do cytoplazmy. Jen v zanedbatelném počtu případů byla zjištěna jejich kolokalizace s lyzozomy. To bylo také potvrzeno kontrolou intracelulárního štěpení kaspázy-3, která je ukazatelem poškození lyzozomů. Naopak převážná většina sférických  $\text{SiO}_2$  nanočástic byla zachycena v endozomech a následně i lyzozomech. Při smíchání obou druhů nanočástic v poměru 1:1 došlo k jejich uvolnění do cytosolu stejně jako v případě samotných NDs. Stalo se tak v důsledku protržení endozomální membrány NDs s ostrými hranami.

I přes téměř dvojnásobnou internalizaci  $\text{SiO}_2$  nanočástic, byl pozorován jen velmi slabý fluorescenční signál proteinu GFP u těchto vzorků. Naproti tomu u vzorků inkubovaných s NDs byla exprese tohoto genu značná. [45]

Obě studie tak potvrzují významnou roli morfologie nanočástic pro jejich uvolnění z endozomu v krátkém čase po internalizaci, které je klíčové pro funkčnost dodávaných makromolekul. Ovšem je nutné poznamenat, že nebylo pozorováno přímé proniknutí ostrých nanočástic skrze plazmatickou membránu. Tento fakt může být způsoben rozdílným složením plazmatické a endozomální membrány. Ačkoliv endozomální membrána je odvozena z plazmatické, dochází v průběhu její tvorby ke značné modifikaci lipidů. Zejména k poklesu obsahu některých lipidů posilujících membránu. [45,46]

V případě kationických komplexů ND-PEI se mluví o uvolnění z endozomu prostřednictvím “efektu protonové houby”. Ten je zřejmě výsledkem vysoké pufovací schopnosti PEI, který obsahuje ionizovatelné amino skupiny s hodnotou  $\text{pK}_a$  blízkou endozomálnímu/lyzozomálnímu pH. V průběhu zrání endozomu jsou z cytosolu aktivně “pumpovány” vodíkové ionty ( $\text{H}^+$ ), vedoucí k acidifikaci endozomálních kompartmentů a aktivaci hydrolytických enzymů. Přítomný PEI začne tyto protony vodíku vázat a brání tak acidifikaci endozomu. V důsledku toho zvýší protonová pumpa svou aktivitu, což je následováno pasivním vstupem chloridových iontů ( $\text{Cl}^-$ ) kompenzujících kladný náboj. Zvyšující se koncentrace soli je kompenzována přísunem vody, dochází k bobtnání endozomu vedoucí k jeho ruptuře. Obsah váčku včetně komplexů je tak uvolněn do cytosolu. [47]

## 5 Metody

První polovina kapitoly je věnována popisu jednotlivých charakterizačních metod (měření zeta potenciálu a hydrodynamického průměru nanočástic, konfokální fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie). Použité postupy přípravy vzorků (příprava komplexů, buněk, jejich stimulace a příprava vzorků pro jednotlivá měření) jsou zahrnuty v druhé části.

### 5.1 Charakterizační metody

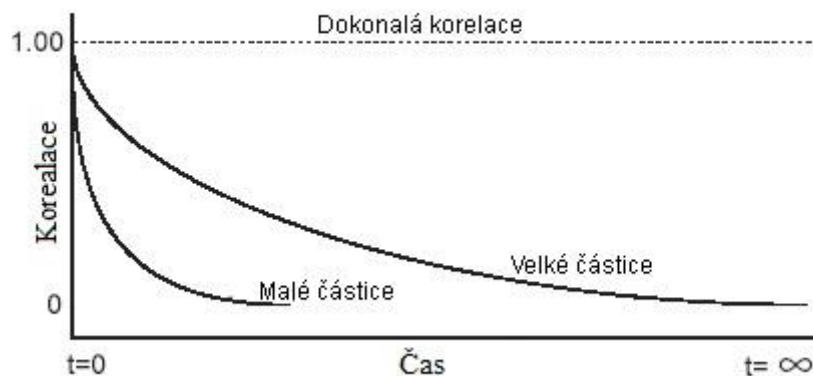
#### 5.1.1 Měření zeta potenciálu a hydrodynamického průměru nanočástic

##### Hydrodynamický průměr

Dynamický rozptyl světla ( Dynamic light scattering – DLS) je metoda umožňující měření velikosti dispergovaných částic v rozsahu od 1 nm až do 2  $\mu\text{m}$ . [48] Podstatou této techniky je analýza fluktuace intenzity rozptýleného světla získaného ozáření vzorku laserovým paprskem v čase. Tyto fluktuace jsou způsobeny interferenčním zesilováním a zeslabováním světla rozptýleného na nestacionárních částicích v suspenzi, které podléhají Brownovu pohybu. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se mění intenzita rozptýleného záření. Rychlost pohybu částic je nepřímo úměrná jejich velikosti, tedy malé částice se pohybují rychleji než částice velké. Vztah mezi velikostí částic a jejich rychlostí je definován ve Stokes-Einsteinově rovnici. Součástí přístroje je digitální korelátor, který jednoduše měří podobnost signálů v určitých časových periodách. Výsledkem je korelační funkce, která nám umožňuje určit velikost částice., neboť rychlost rozpadu korelační funkce pro malé částice je mnohem rychlejší než pro velké částice (*Obr.13*). Fitováním korelační křivky exponenciální funkcí získáme difuzní koeficient (D). Velikost částice pak vypočítáme dosazením hodnoty difuzního koeficientu (D) do Stokes-Einsteinovy rovnice (9).[48,49]

$$d(H) = \frac{k \cdot T}{3\pi\eta D} \quad (8)$$

Kde  $d(H)$  je hydrodynamický průměr částice,  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  termodynamická teplota,  $D$  translační difuzní koeficient a  $\eta$  je viskozita disperzního prostředí.

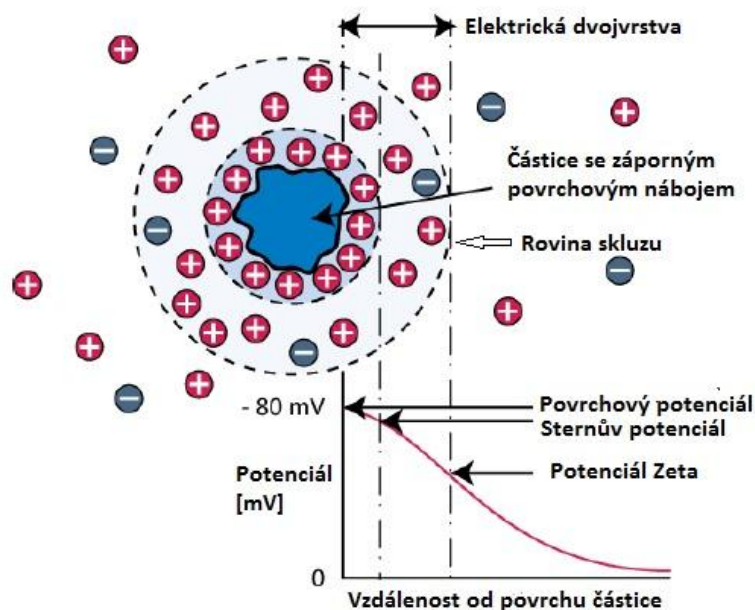


Obr.13: Graf korelační funkce pro malé a velké částice [50]

Získaná veličina se nazývá hydrodynamický průměr, který je definován jako průměr koule, která má stejný translační difuzní koeficient jako měřená částice. Hydrodynamický průměr může zahrnovat solvatační obal nebo naadsorbovanou vrstvu na povrchu částice. To znamená, že velikost částice naměřená metodou DLS může být větší než skutečný geometrický rozměr částice. Výsledná průměrná velikost koloidní částice je vážena podle páté mocniny, což vede k nadhodnocení velkých částic. Může tak dojít k zavádějícím výsledkům v případě výskytu velkých agregátů ve vzorku. [48,49]

### Zeta potenciál

Částice vykazující na svém povrchu elektrický náboj ovlivňuje distribuci iontů v okolním prostředí. V důsledku toho dochází v těsné blízkosti jejího povrchu ke zvýšení koncentrace iontů opačného náboje. Velikost intenzity elektrického pole generovaného nabitou částicí klesá spolu se vzdáleností od jejího povrchu, přičemž pokles této intenzity je úměrný úbytku koncentrace iontů. Výsledkem je přítomnost elektrické dvojvrstvy obklopující partikuly. Uvažujeme-li tedy částici s nenulovým nábojem nacházející se v kapalině, je možné rozdělit oblast těsně nad povrchem na dvě vrstvy: vnitřní vrstvu, nazývanou také jako Sternovu vrstvu, tvořenou ionty, které jsou velmi pevně vázány k povrchu částice a vnější vrstvu nebo-li difuzní vrstvu obsahující volně vázané ionty. Uvnitř difuzní vrstvy existuje pomyslná hranice označovaná jako rovina skluzu. V případě pohybu částice v roztoku se ionty uvnitř této hranice pohybují spolu s ní, naopak ionty nacházející se za touto hranicí nejsou přitahovány dostatečnou silou a částici tedy nenásledují. Potenciál existující na této hranici je znám jako potenciál zeta ( $\zeta$ -potenciál).



Obr.14: Schéma rozložení potenciálu na povrchu nabitě částice[51]

Zeta potenciál je klíčovým ukazatelem stability koloidních systémů. Jeho velikost indikuje stupeň elektrostatického odpuzování mezi sousedními, stejně nabitými částicemi v disperzi. Obecně platí, že suspenze vykazující hodnoty Zeta potenciálu menší než  $-30\text{mV}$  nebo větší než  $+30\text{mV}$  jsou považovány za elektricky stabilní a uvnitř těchto systému tak nedochází k shlukování částic. V případě nízké (kladné nebo záporné) hodnoty Zeta potenciálu, přitažlivé síly mohou překonat síly odpudivé a disperze má tendenci agregovat. [52,53]

Měření Zeta potenciálu koloidní disperze je běžně realizováno metodou Dopplerovy laserové velocimetrie v kombinaci s elektroforézou. Suspenze je umístěna do cely, na jejichž koncích jsou elektrody generující elektrické pole. Nabitě částice se vlivem aplikovaného elektrického pole pohybují směrem k elektrodě s opačnou polaritou. Elektroforetická pohyblivost částic je zjišťována technikou Dopplerovy laserové velocimetrie. V případě ozáření migrujících částic laserovým paprskem, dojde na jejich povrchu k rozptylu světla, které vykazuje v porovnání s referenčním paprskem Dopplerův (frekvenční) posuv. Tento frekvenční posuv je úměrný rychlosti pohybu částice. Při znalosti dalších parametrů, jako je viskozita, dielektrická konstanta média a síla elektrického pole, lze dopočítat hodnotu Zeta potenciálu. Podle Henryho rovnice (8). [54,55]

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta F(\kappa a)}{3\eta} \quad (8)$$

Kde,  $U_E$  je elektroforetická pohyblivost částice,  $\zeta$  je Zeta potenciál,  $F(\kappa a)$  Henryho funkce,  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta a  $\eta$  viskozita media. [54]

V případě přístroje Zetasizer Nano ZPS je analýza Dopplerova posuvu realizována metodou fázové analýzy rozptylu světla (PALS). Tato technika využívá stejné optické nastavení jako konvenční Dopplerova elektroforéza, liší se pouze ve zpracování signálu. Namísto frekvenčního posunu je určen fázový posun, který je úměrný změně pozice částice. [56]

Pro určení stability komplexu a ověření navázání polymeru, potažmo DNA, bylo provedeno měření Zeta potenciálu a hydrodynamického průměru částic na přístroji Zetasizer Nano ZPS od firmy Malvern. Obě hodnoty byly naměřeny pro celkem devět vzorků, jak je shrnuto v *Tab.1*. U všech typů použitých diamantových nanočástic proběhla analýza uvedených vlastností v destilované vodě. Výjimkou byly komplexy ND-PEI2000-DNA, u kterých byla navíc provedena měření v PBS, růstovém médiu bez séra a se sérem. Důvodem byla snaha získat informace o chování těchto komplexů v různých prostředích, včetně sérového média, ve kterém následně probíhala stimulace buněk.

Z každého vzorku bylo odebráno 20  $\mu$ l do měřicí kyvety a doplněno 580  $\mu$ l příslušného roztoku. Naplněná kyveta byla doplněna celou a umístěna do přístroje.

*Tab.1: Přehled vzorků měřených na Zetasizeru Nano ZSP*

Typ částice	Typ roztoku	Předpokládaná polarita ZP
ND - oxidované	voda	-
ND-PEI2k	voda	+
ND-PEI750k	voda	+
ND-PEI2k-DNA	voda	-
ND-PEI750k-DNA	voda	-
ND-PEI750k-2xDNA	voda	-
ND-PEI2k-DNA	PBS	-
ND-PEI2k-DNA	médium	-
ND-PEI2k-DNA	médium - FBS	-

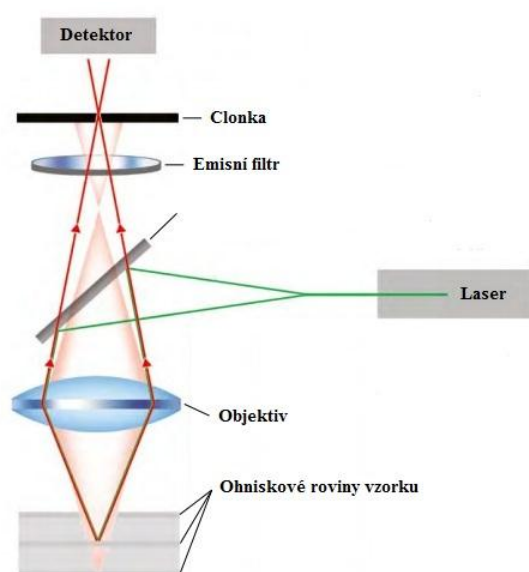
## 5.1.2 Fluorescenční konfokální mikroskopie

U klasického fluorescenčního mikroskopu je v jednom momentě osvětlována velká plocha, což má za následek fluorescenci v celém vzorku. Nejvyšší intenzita excitačního záření působí ve fokální rovině čočky, ovšem ozářeny jsou i zbylé části vzorku a dochází tak k jejich fluorescenci, která se ve výsledném obrazu projeví jako šum.

Součástí konfokálního mikroskopu je clonka („pinhole“), která slouží k blokaci záření, které vychází z oblasti mimo fokus. Clonka je lokalizována v rovině konjugované s rovinou zaostření (výraz „konfokál“ je odvozen ze slov „konjugovaný“ a „fokální“). Významné množství emitovaného záření vycházející z míst nad nebo pod cílovou ohniskovou rovinou, které není konfokální s clonkou, je odfiltrováno (přibližně 95 %). Konfokální mikroskopie tak poskytuje vyšší kontrast a rozlišovací schopnost než tradiční optické mikroskopy. Potlačení

nežádoucího signálu mimo rovinu zaostření nám dále umožňuje nasnímat sérii několika desítek optických řezů v z-rovině a následnou rekonstrukci 3D obrazu.

Schéma konfokálního mikroskopu je na *Obr.15*. Úzký svazek laserového paprsku dopadá na dělič paprsků (v tomto případě dichromatický filtr – působí jako zrcátko pro vlnovou délku excitačního záření a pro všechny ostatní vlnové délky je transparentní), kde je odražen a prostřednictvím objektivu fokusován na vzorek do bodu o průměru odpovídající difrakční mezi mikroskopu. Emitované světlo (o delší vlnové délce) prochází objektivem, dichromatickým zrcátkem, emisním filtrem a skrze druhou clonku dopadá na detektor (obvykle fotonásobič). Tímto způsobem je skenován celý vzorek bod po bodu pomocí rastrovacího zařízení. Detektor je připojený k počítači, který díky informacím o souřadnicích jednotlivých bodů skládá výsledný obraz. [35,57]



*Obr.15: Schéma konfokálního mikroskopu [35]*

Interakce diamantových nanočástic s buňkami byla charakterizována metodou fluorescenční konfokální mikroskopie. Vzorky byly vizualizovány na konfokálním mikroskopu MicroTime 200 (PicoQuant, Německo) na Fakultě biomedicínského inženýrství ČVUT v Praze a na přístroji Olympus FluoView FV1000 (Olympus) na Mikrobiologickém ústavu AV ČR.

#### Časově rozlišená konfokální mikroskopie -MicroTime 200

Vizualizace vzorků na konfokálním mikroskopu MicroTime 200 byla realizována metodou FLIM (Flourescence lifetime imaging) (viz kapitola 3.2.). Tato metoda umožňuje rozlišovat struktury na základě odlišné doby dohasínání fluorescence. Jako excitační zdroj byl použit pikosekundový pulzní laser s vlnovou délkou 532 nm, šířkou pulzu 100 ps, opakovací frekvencí až 80 MHz a výkonem 1,9  $\mu$ W. Fokusace laserového paprsku a sběr emisního záření byl realizován vodním objektivem (Olympus, 60x, NA 1.2). Záznam signalu probíhal na dvou detektorech s emisními filtry LP 550 a LP 650. Zkratka LP zastupuje pojem 'longpass', jedná se tedy o filtry propouštějící pouze vlnové délky delší než je uvedená

hodnota za zkratkou. Pro ovládání měření a následnou analýzu obrazu byl použit software SymPhoTime 64. [35].

V případě měření fixovaných buněk byl vzorek umístěn do nerezové měřicí komůrky se 70 % ethanolem. Pro schopnost přesně určit přítomnost částice v buňce byl každý vzorek snímán ve třech fokálních rovinách ve vzájemné vzdálenosti 1-2  $\mu\text{m}$  s rozlišením 256x256 px.

#### Olympus FluoView FV1000

Konfokální mikroskop FluoView FV1000 (40x, NA 0.95) byl použit pro vizualizaci vzorků v širokém poli (1x1mm) při rozlišení 1024x1024 px. Vzorky byly měřeny ve 12-ti jamkové destičce, ve které probíhala stimulace buněk. Jednotlivé struktury byly rozlišeny na základě jejich emisních spekter. Jádra buněk, značená fluoroforem Hoechst 33342, byla excitována diodovým laserem o vlnové délce 405 nm. Diamantové částice byly excitovány na vlnové délce 559 nm. Získané obrázky byly analyzovány v softwaru Olympus FLUOVIEW 2.0.

### **5.1.3 Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie umožňuje získat informaci o optických a fluorescenčních vlastnostech jednotlivých buněk (nebo jiných částic) ve vzorku o velkém objemu za velmi krátký čas. Princip je založený na detekci rozptýleného a fluorescenčního záření suspendovaných buněk, unášených rychlým proudem nosné tekutiny, po ozáření laserovým paprskem. Separace jednotlivých buněk je zajištěna hydrodynamickou fokusací, která je dána rozdílnou hodnotou tlaků mezi vzorkem a unášející tekutinou podléhající laminárnímu proudění. Detekovány jsou dva typy rozptylu: přímý (forward scatter – FCS) a boční (side scatter – SSC), měřený pod úhlem 90°. Intenzita přímo rozptýleného záření je úměrná velikosti částic, boční rozptyl podává informaci o granulitě a vnitřní komplexitě buněk. Další možností je označení cílových struktur fluorescenčním barvivem a následná detekce emitovaného záření.

Speciální typem průtokové cytometrie je fluorescenčně-aktivované třídění buněk (FACS). Tato metoda umožňuje separaci buněčné populace do několika skupin na základě fluorescenčního značení. Přístroj je vybaven speciální tryskou, která rozkmitáním nosné kapaliny docílí rozdělení suspenze na jednotlivé kapky obsahující vždy jednu buňku. Na základě charakteru naměřené fluorescence je každé kapce přiřazen elektrický náboj. Kapičky následně procházejí elektrostatickým vychylovacím systémem, který je separuje podle jejich náboje do dvou a více sběrných nádob. [58]

V této práci byl pro ověření účinnosti transfekce nanodiamantových komplexů použit průtokový cytometr (FACS) BD LSR II (BD Bioscience, USA), který je vybaven čtyřmi laserovými zdroji o vlnových délkách 405 nm, 488 nm, 561 nm a 633 nm a umožňuje detekovat až dvanáct parametrů (deset fluorescenčních a dva rozptylové). Měření proběhlo na Mikrobiologickém ústavu AV ČR.



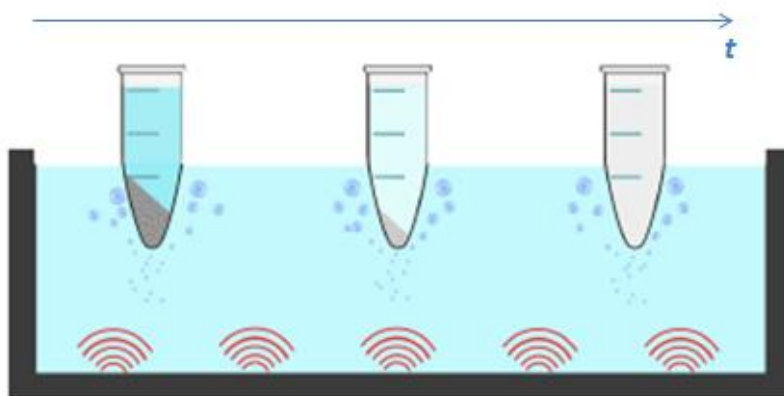
Sledována byla transfekční účinnost komplexů ND-PEI2k-DNA a ND-PEI750k-DNA pro buněčnou linní CT26. Pro informaci o viabilitě byla buněčná jádra označena fluoroforem Hoechst 33258 (excitace při 405 nm). DNA sekvence navázaná na komplex ND-PEI byla obarvena fluorescenční značkou AlexaFluor 488 ( excitace při 488 nm). Jako pozitivní kontrola bylo použité komerčně dostupné transfekční činidlo X-tremeGENE™ HP od firmy Roche, za negativní kontrolu byl považován vzorek s nestimulovanými buňkami.

## 5.2 Příprava vzorků

### 5.2.1 Příprava komplexů ND-PEI-DNA

V experimentu byly použity fluorescenční nanodiamantové částice připravené metodou HPHT, jejichž povrch je oxidovaný a nese negativní náboj. Pro navázání DNA vykazující stejnou polaritu bylo nutné nanočástice funkcionalizovat kationtovým polymerem. Použit byl polymer polyethylenimin (PEI) s molekulovou hmotností 2000 Da a 750 kDa. PEI je jedním z nejúčinnějších transfekčních činidel a to především díky své pufrací kapacitě umožňující ochranu DNA před lysozomální degradací (kapitola 4.3.) a schopnosti kondenzovat DNA.[59]

Diamantové nanočástice dispergované v roztoku mají tendenci agregovat a tak tvořit nežádoucí shluky. Deaglomerace klastrů docílíme použitím ultrazvukové homogenizace (sonikace). Zvukové vlny o vysoké intenzitě šířící se vodním prostředím vedou ke střídání vysokotlakých a nízkotlakých cyklů. V průběhu nízkotlakého cyklu vytváří ultrazvukové vlny v roztoku malé “vakuové bubliny“. V okamžiku, kdy bublina dosáhne objemu, při kterém již nemůže přijímat další energii, dojde během vysokotlakého cyklu k jejímu kolapsu. Tento fenomén se nazývá kavitace. Lokální nárůst tlaku a teploty provázející kavitaci vede k mechanickému rozrušení Van der Waalsových sil umožňující rozpad agregátů.[60]



Obr.16: Znárodnění procesu ultrazvukové homogenizace v čase.[61]

Suspenze diamantových nanočástic o koncentraci 2 mg/ml byla připravena ze zásobní suspenze (koncentrace 4 mg/ml) smíchaním s demineralizovanou vodou v poměru 1:1. Pro rozrušení agregovaných částic byl připravený vzorek sonikován 60 min ve vodní lázni.



Roztok PEI o koncentraci 9 mg/ml byl získán zředěním deionizovanou vodou a sonikací v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut.

500 µl suspenze diamantových nanočástic bylo opatrně přeneseno do mikrozkušavek s roztokem PEI o stejném objemu umístěných v sonikační lázni. Pro separaci nenavázaných molekul PEI, které jsou pro buňky toxické, byly vzniklé komplexy centrifugovány 15 min při 11 000 otáčkách/min. Komplexy ND-PEI o výsledné koncentraci 1 mg/ml byly získány nahrazením vzniklého supernatantu stejným objemem demineralizované vody. Rozrušení agregátů vytvořených působením odstředivé síly při centrifugaci bylo docíleno sonikací hrotem po dobu 30 min.

Komplexy ND-PEI-DNA byly připraveny přidáním 50 µl suspenze ND-PEI k 10 µl DNA a následnou sonikací v lázni po dobu 30 min. Pro úspěšné navázání DNA bylo nutné nechat vzorek odstát 30 min při pokojové teplotě. V případě vzorků použitých k měření metodou průtokové cytometrie byla DNA označena fluorescenčním barvivem AlexaFluor 488.

## 5.2.2 Příprava buněčných vzorků

V experimentu byly použity tři typy buněk (Tab.2) : CT26 ( buňky karcinomu tlustého střeva), 3T3 ( fibroblasty izolované z embrya myši) a jako poslední IC-21, které byly vybrány především pro jejich přirozenou schopnost fagocytovat materiál z okolního prostředí.

Všechny tyto linie jsou komerčně dostupné a jsou uchovávány v kryozkušavkách v hlubokomrazícím boxu při teplotě okolo – 80 °C. Kultivace buněk probíhala v inkubátoru při teplotě 37°C a 5% zastoupení CO<sub>2</sub>. Aby nedošlo ke kontaminaci, veškerá manipulace s buňkami probíhala v laminárním boxu za použití sterilních chemikálií a jednorázového laboratorního plastu.

Tab.2: Charakterizace použitých buněčných vzorků

Buněčný vzorek	Organismus	Typ buňky	Vlastnosti	Onemocnění
CT26	myš	fibroblast -tlusté střevo	adherentní	rakovina
IC-21	myš	peritoneální makrofág	adherentní	-
3T3	myš	fibroblast -embryo	adherentní	-

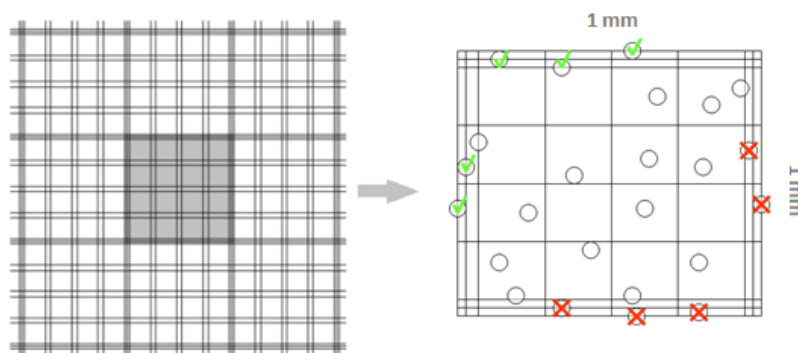
### Použité chemikálie

- **DMEM** (Dulbekovo modifikované Egelovo médium) – růstové médium pro adherentní buněčné line. K médiu se přidává FBS (fetální bovinní sérum, 10%), díky němuž kultura získá potřebné živiny a antibiotika (ATB, 1%) zabraňující kontaminaci bakteriemi.
- **RPMI** – médium použité pro kultivaci buněčné linie IC-21. Přídavek FBS (20%) a ATB (1%)
- **PBS** (fosfátový pufovací roztok) – fosfátový roztok sloužící k udržení stálého pH extracelulární tekutiny

- **Trypsin** – trávící enzym štěpící peptidové vazby. Využívá se k uvolnění adheovaných buněk ze dna Petriho misek.
- **EDTA** (Kyselina ethylendiaminotetraoctová) – chelatační činidlo, které pomáhá odstranění hořečnatých a vápenatých iontů, které jsou součástí adhezních faktorů. Stejně jako trypsin slouží k uvolnění adheovaných buněk.
- **DMSO** (dimethylsulfoxid)-kryoprotektivní látka zabráňující krystalizaci vody a uvolňování intracelulární tekutiny a tím poškození buněk při zamražení.
- **Ethanol** (70%) – slouží k fixaci buněčných vzorků
- **Trypanová modř** - barvivo schopné difundovat do intracelulárního prostoru (z živých buněk je okamžitě opět transportován ven, v mrtvých zůstává). Využívá se při stanovení počtu buněk v Bürkerově komůrce.

### Kultivace buněk

Kryozkumavku s buňkami bylo nutné co nejrychleji (1-3 min) rozmrazit ve vodní lázni o teplotě 37°C. Buněčná suspenze byla přenesena do 15 ml kónické zkumavky a pomalu doplněna do objemu 10 ml přdehřátým růstovým médiem DMEM (obohaceným o 10% FBS a 1% ATB)/ RPMI (20% FBS, 1% ATB) pro IC-21. Zkumavka byla centrifugována 5 min při rychlosti 1100 otáček/min a vzniklý buněčný pelet následně resuspendován v 1 ml DMEM/RPMI. Pro stanovení přesné koncentrace buněk byla použita Bürkerova komůrka. 8 µl buněčné suspenze smíchané se stejným množstvím trypanové modři bylo umístěno do Bürkerovy komůrky a pozorováno pod světelným mikroskopem. Výsledná koncentrace buněk byla získána stanovením počtu buněk ve vyznačeném čtverci na *Obr.17* a dosazením do vztahu (10). Pro experiment byla zvolena koncentrace buněk 400 000 buněk/ml. Odpovídající objem buněčné suspenze byl přenesen na vyčištěné sklíčko a inkubován 20 min (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), aby došlo k adhezi buněk ke dnu. Po uplynutí této doby bylo přidáno k buněčné suspenzi 2 ml (1ml v případě 12-ti jamkové dstičky) DMEM/RPMI. Jednou za dva dny bylo nutné, z důvodu kumulace toxických produktů metabolismu a úbytku živin, vyměnit růstové médium za čerstvé.



*Obr.17: Bürkerova komůrka [62]*

$$\text{koncentrace buněk} = \frac{\text{počet buněk ve čtverci} \cdot 1000}{\text{objem čverce}} \text{ [buněk/ml]} \quad (10)$$

## Pasážování buněk

Při 80 % konfluenci bylo nutné pro zachování kultury buňky pasážovat. Z Petriho misky bylo odebráno staré růstové médium a povrch opatrně opláchnut PBS (přibližně 2 ml na 10 cm<sup>2</sup> kultivační plochy), aby došlo k odstranění zbytků séra inhibujícího účinky trypsinu. Pro uvolnění adherovaných buněk bylo PBS nahrazeno 0,5/2,5 ml (pro malou/velkou Petriho misku) roztoku trypsinu s EDTOU. Po 10 minutách inkubace bylo pod mikroskopem zkontrolováno, že došlo k uvolnění většiny buněk (>90 %), poté byl přidán původní objem DMEM/RPMI. Celý objem byl přenesen do 15 ml kónické zkumavky, centrifugován (5 min, 1100otáček/min) a vzniklý buněčný pelet resuspendován v 1 ml DMEM/RPMI. Dle požadované koncentrace byly příslušné objemy rozděleny na jednotlivá sklíčka a vloženy na 20 minut do inkubátoru. Po uplynutí této doby byly přidány 2 ml růstového média DMEM/RPMI. Jednou za dva dny bylo růstové médium vyměněno.

V případě buněčné linie IC-21 nebyl použit pro uvolnění adherovaných buněk roztok trypsinu s EDTOU, ale po odsátí růstového média byl aplikován PBS bez Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>. Po 10-ti minutové inkubaci byly buňky ze dna mechanicky odstraněny. Další postup byl totožný jako v předchozím případě.

## Zamrazení buněk

Pro delší skladování buněk bylo nutné kulturu zamrazit v hlubokomrazícím boxu. Mrazící směs byla získána smícháním 900 µl plného růstového média (DMEM) a 100 µl kryoprotektivního DMSO. K připravené směsi byl přidán 1 ml buněčné suspenze získané pasážováním a celý objem přenesen do speciální kryozkumavky. Kryozkumavka byla umístěna do kryokontejneru se 100% izopropylalkoholem, který slouží k velmi pomalému zamrazování (o 1°C/min). Buňky byly uchovávány při teplotě -80°C.

### **5.2.3 Příprava vzorků pro fluorescenční konfokální mikroskopii**

Buněčné vzorky (IC-21,CT26, 3T3) byly stimulovány nanodiamantovými částicemi s různou povrchovou funkcionalizací (oxidované, s navázaným PEI 2 kDa/750 kDa, s navázaným PEI 2 kDa/750 kDa a DNA. Celkem se tedy jednalo o 15 vzorků (*Tab.3*). V případě měření na konfokálním mikroskopu Olympus FluoView FV1000 byly použity pouze buňky 3T3 a CT26.

Stimulace vzorků pro měření na přístroji MicroTime 200 probíhala na sklíčkách v malých Petriho miskách s objemem média 2 ml (DMEM + FBS + ATB). Pro měření na přístroji Olympus FluoView FV1000 byly buňky stimulovány ve 12-ti jamkové destičce s objemem 1 ml (RPMI + FBS + ATB). Do média byly přidány diamantové nanočástice s příslušnou povrchovou modifikací tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 25 µg/ml. Následně byly vzorky umístěny do inkubátoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) a stimulovány 120 min. Veškeré médium bylo odsáto a pomocí 1 ml PBS odstraněny jeho zbytky spolu s neadherovanými buňkami a volnými částicemi. V případě měření fixovaných vzorků byl PBS odstraněn a nahrazen 2 ml 70% ethanolu.

Pro vizualizaci vzorků na konfokálním mikroskopu Olympus FluoView FV1000 byla jádra buněk obarvena fluoroforem Hoechst 33342. Hoechst je známé fluorescenční barvivo vážící se do malého žlábků dvoušroubovice DNA. Jeho excitační maximum se nachází při vlnové délce 350 nm a emisní maximum na 461 nm. Buňky byly stimulovány po dobu 15 min, při koncentraci barviva 1 µg/ml.

Tab.3: Souhrn vzorků připravených pro vizualizaci metodou fluorescenční konfokální mikroskopie

Typ buněk	IC-21	CT26	3T3
Typy povrchových modifikací NDP	ND - oxidované		
	ND-PEI2000		
	ND-PEI750000		
	ND-PEI2000-DNA		
	ND-PEI750000-DNA		

## 5.2.4 Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii

Účinnost transfekce metodou průtokové cytometrie byla studována pro buněčnou linii CT26 stimulovanou komplexem ND-PEI 2kDa/750kDa-DNA a transfekčním činidlem X-tremeGENE™ HP s navázanou DNA. V obou případech byla DNA značena fluoroforem AlexaFluor 488.

Příprava komplexů ND-PEI-DNA je popsána v kapitole 5.1.1..Pro vzorek s transfekčním činidlem X-tremeGENE™ HP bylo nutné připravit dvojnásobný objem, neboť tento vzorek byl spolu s negativní kontrolou použit pro kalibraci přístroje. Použitý poměr DNA:X-tremeGENE™ HP byl 5:1. Připravené vzorky byly přikryty alobalem a ponechány 30 minut při pokojové teplotě, aby došlo k navázání DNA. Po uplynutí určeného času byly vzorky doplněny PBS do objemu 200 µl. Následná stimulace buněk probíhala ve 12-ti jamkové destičce s obsahem média 1 ml (RPMI + ATB) s výslednou koncentrací ND-PEI-DNA 25 µg/ml. Vzorky byly umístěny do inkubátoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) na 120 min. Pro uvolnění adherentních buněk bylo z jamek odebráno médium a nahrazeno 100 µl trypsinu (inkubace: 5 min, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Trypsin byl doplněn 1 ml PBS, následně byly buňky opatrně resuspendovány a přeneseny do 15 ml zkumavek. Zkumavky byly centrifugovány 2 min při 15000 otáčkách/min (2x). Po druhém stočení byl buněčný pelet doplněn 400 µl PBS. Vzorky byly v dubletech (po 200 µl) přeneseny do 96- jamkové mikrodestičky, ve které následně probíhalo měření. Před začátkem experimentu byl ke každému měřenému vzorku a k jedné z každé dvojice vzorků pro kalibraci přidán fluorofor Hoechst 33258.

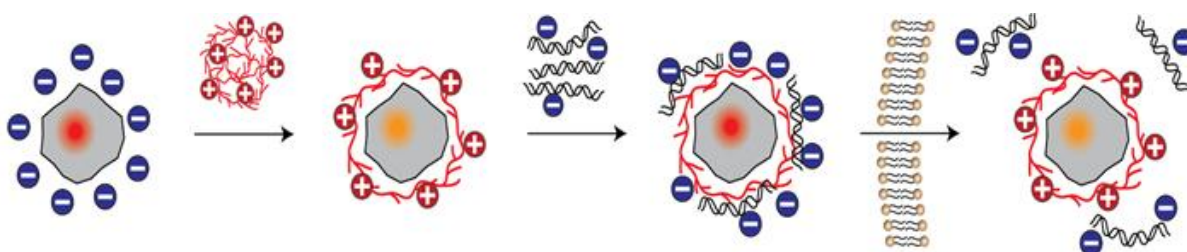
Tab.4: Souhrn vzorků připravených pro studium metodou průtokové cytometrie

Typ buněk	CT26
Typ nosiče DNA	-
	ND-PEI2000
	ND-PEI750000
	X-tremeGENE™ HP

## 6 Výsledky

### 6.1 Příprava a charakterizace diamantových nanočástic

Fluorescenční diamantové nanočástice (ND) s oxidovaným povrchem mají záporně nabitý povrch. Díky působení odpuzivých sil mezi záporně nabitým povrchem ND a záporně nabitou DNA není možné navázat DNA přímo na částici. Proto je nutné její povrch funkcionalizovat vhodným kationickým polymerem. Pro tyto účely byl zvolen polyethylenimin (PEI) se dvěma různými molekulovými hmotnostmi: 2000 Da a 750 kDa. PEI je adsorbován na oxidovaný povrch NDP. Polymer tak vytvoří souvislou kladně nabitou vrstvu, která usnadňuje průnik do buňky plazmatickou membránou a zároveň umožňuje nekovalentní navázání DNA prostřednictvím elektrostatických interakcí.



Obr.18: Schéma funkcionizace povrchu nanočástice polyethyleniminem následované navázáním DNA

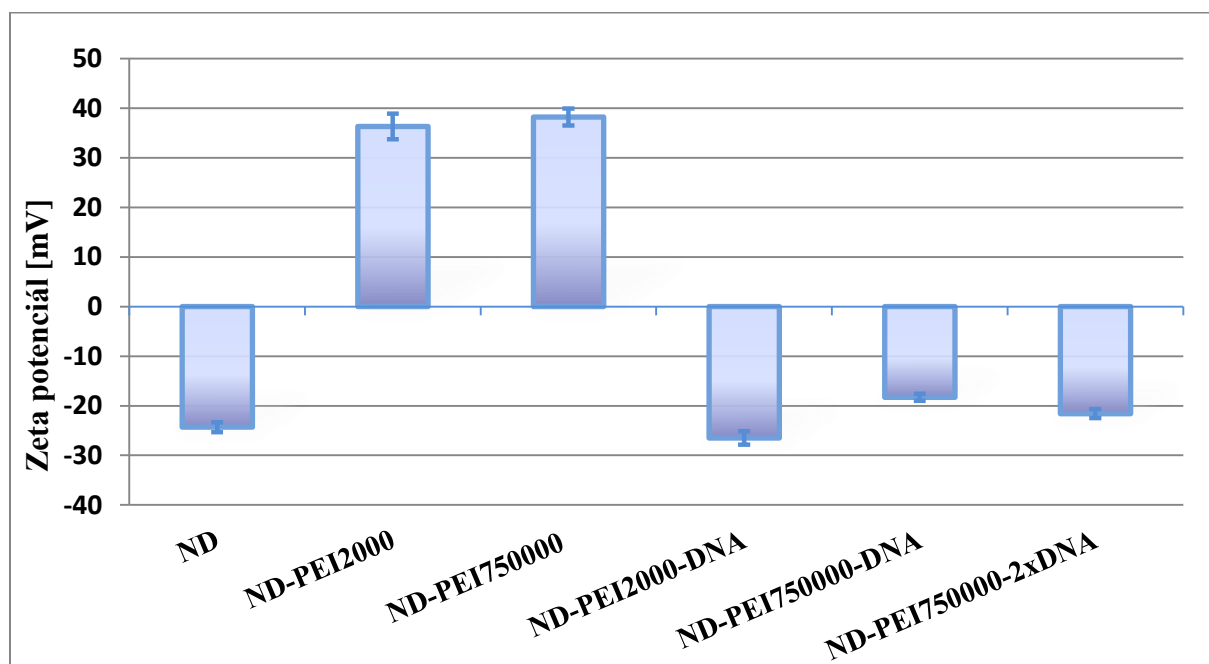
Oxidované diamantové nanočástice jsou charakteristické negativním zeta potenciálem (25 mV), při navázání kladně nabitého polymeru (PEI) očekáváme změnu na kladné hodnoty. Navázáním záporně nabité molekuly DNA dochází k částečné kompenzaci náboje polymeru a posunu zeta potenciálu zpět do záporných hodnot. Zeta potenciál je zároveň ukazatelem koloidní stability suspenze. Obecně platí, že suspenze vykazující hodnoty zeta potenciálu menší než  $-30\text{mV}$  nebo větší než  $+30\text{mV}$  jsou považovány za elektricky stabilní a uvnitř těchto systémů by nemělo docházet k shlukování částic. K ověření úspěšnosti navázání kationického polymeru a následně DNA byly funkcionalizované ND charakterizované měřením zeta potenciálu a dynamického rozptylu světla – kapitola 5. 2. 1. (pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZSP).

Velikost zeta potenciálu a hydrodynamického průměru nanočástic byla naměřena pro všechny typy vzorků v destilované vodě. Pro informaci o vlastnostech částic v jiných roztocích (včetně růstového média používaného při stimulaci buněk) byl následně komplex ND-PEI2000-DNA analyzován také v PBS, DMEM bez séra a se sérem. Analyzované vzorky a naměřené hodnoty jsou shrnuty v Tab.5.

Tab.5: Naměřené hodnoty zeta potenciálu a hydrodynamického průměru diamantových nanočástic s různou povrchovou modifikací a různých roztocích

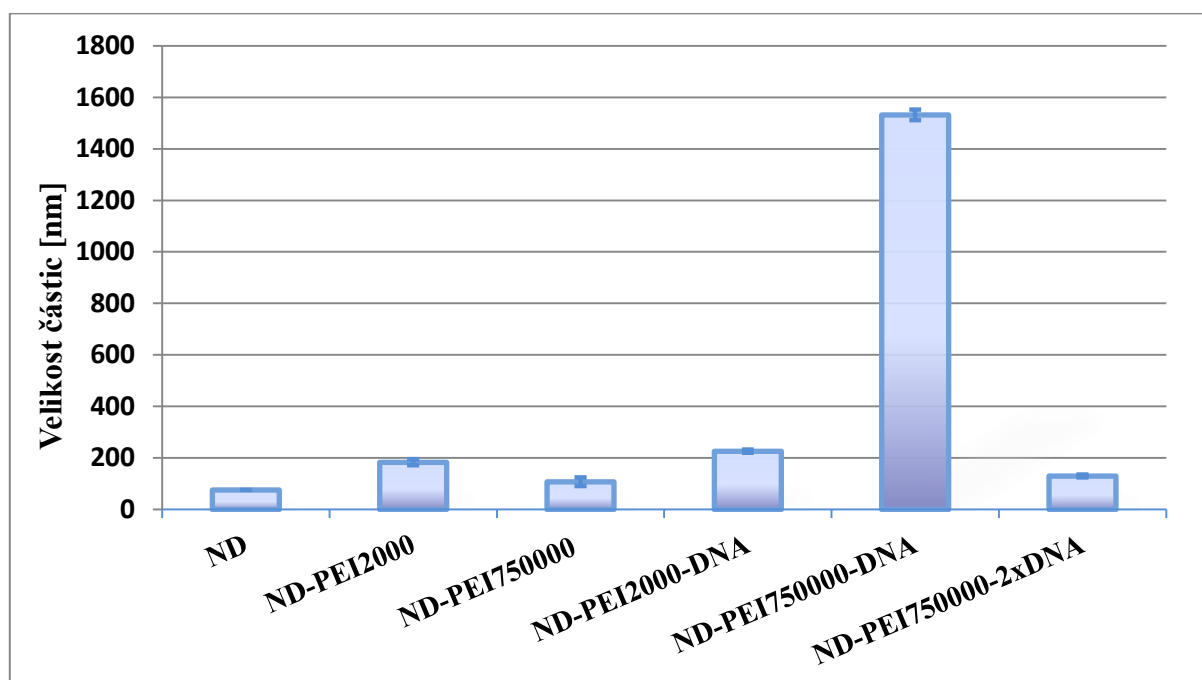
Typ částice	Typ roztoku	Zeta potenciál [mV]	Hydrodynamický průměr [nm]
ND - oxidované	voda	-24,3	75,8
ND-PEI2k	voda	36,3	183,2
ND-PEI750k	voda	38,2	107,4
ND-PEI2k-DNA	voda	-26,5	226,1
ND-PEI750k-DNA	voda	-18,3	1532,1
ND-PEI750k-2xDNA	voda	-21,6	129,8
ND-PEI2k-DNA	PBS	-28,5	736,5
ND-PEI2k-DNA	médium	-26,5	1250
ND-PEI2k-DNA	médium - FBS	-25,2	1400

Hodnoty zeta potenciálu pro vzorky měřené v destilované vodě jsou znázorněny v grafu na Obr.19. Z výsledků je patrné, že došlo k úspěšnému navázání polymeru a následně také DNA na částice. To dokazují kladné hodnoty ZP pro komplexy ND-PEI2000 a ND-PEI750000, které se pohybují okolo 35 mV a tedy nad hranicí udávající stabilitu suspenze. U komplexu ND-PEI750000-DNA byla naměřena záporná hodnota ZP (-18,3 mV) spadající mimo oblast stability. Po přidání dvojnásobného množství DNA se jeho hodnota snížila jen nepatrně (-21,6 mV). Hodnoty ZP pro ND-PEI2000-DNA (-26,5 mV) byly velmi podobné hodnotám pro NDP s oxidovaným povrchem (-24,5 mV).



Obr.19: Graf znázorňující hodnoty ZP pro nanodiamantové částice s různou povrchovou funkcionalizací (ve destilované vodě)

Hydrodynamické průměry diamantových nanočástic s různou povrchovou funkcionalizací analyzovaných v destilované vodě jsou vyneseny v grafu na *Obr.20*. Z grafu je zřejmé, že největší průměr nanočástic částic byl naměřen pro komplex ND-PEI750000-DNA. Tomu odpovídá také jeho hodnota ZP, která je výrazně pod hranicí stability. Nestabilní částice mají tendenci vytvářet agregáty o velikosti až 1,5  $\mu\text{m}$ . Důvodem je zřejmě nedostatečná nábojová kompenzace PEI s vysokou molekulovou hmotností po navázání DNA. V případě dvojnásobného koncentrace DNA vykazuje suspenze nižší negativní hodnotu zeta potenciálu a daleko menší velikost částic (130 nm). Samotné komplexy s polymerem jsou reprezentovány velmi malou hodnotu hydrodynamického průměru. Pro ND-PEI750k je to 107,4 nm a pro ND-PEI2000 o něco více, tedy 183,2 nm. Nejmenší hydrodynamický průměr (75 nm) mají, dle očekávání, oxidované NDP.

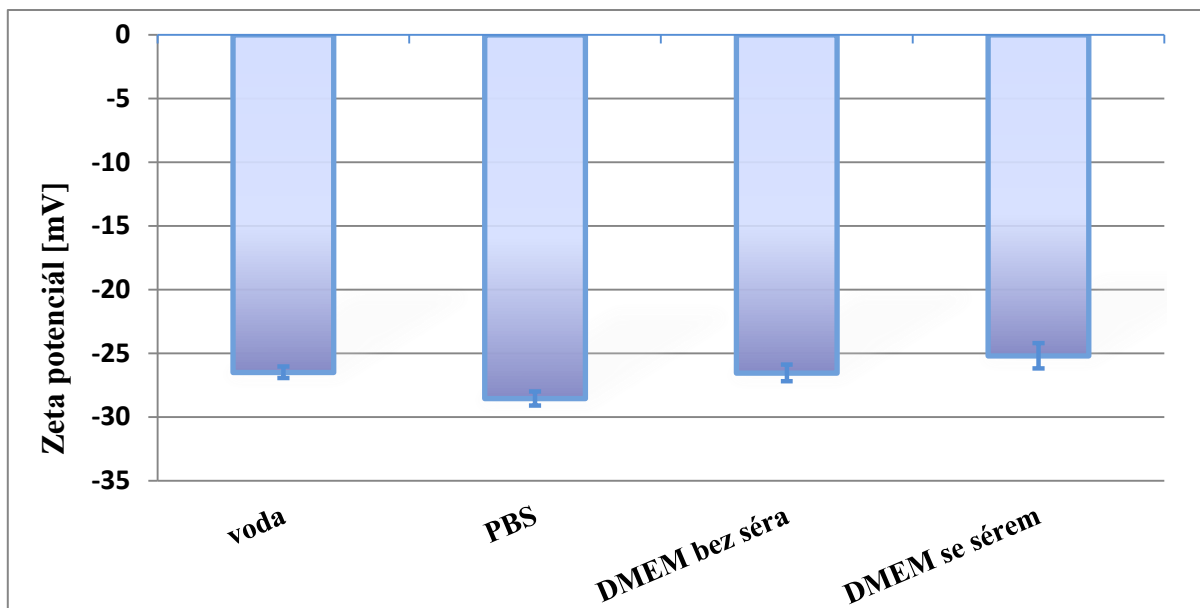


*Obr.20: Graf znázorňující hodnoty hydrodynamického průměru diamantových nanočástic s různou povrchovou funkcionalizací (v destilované vodě)*

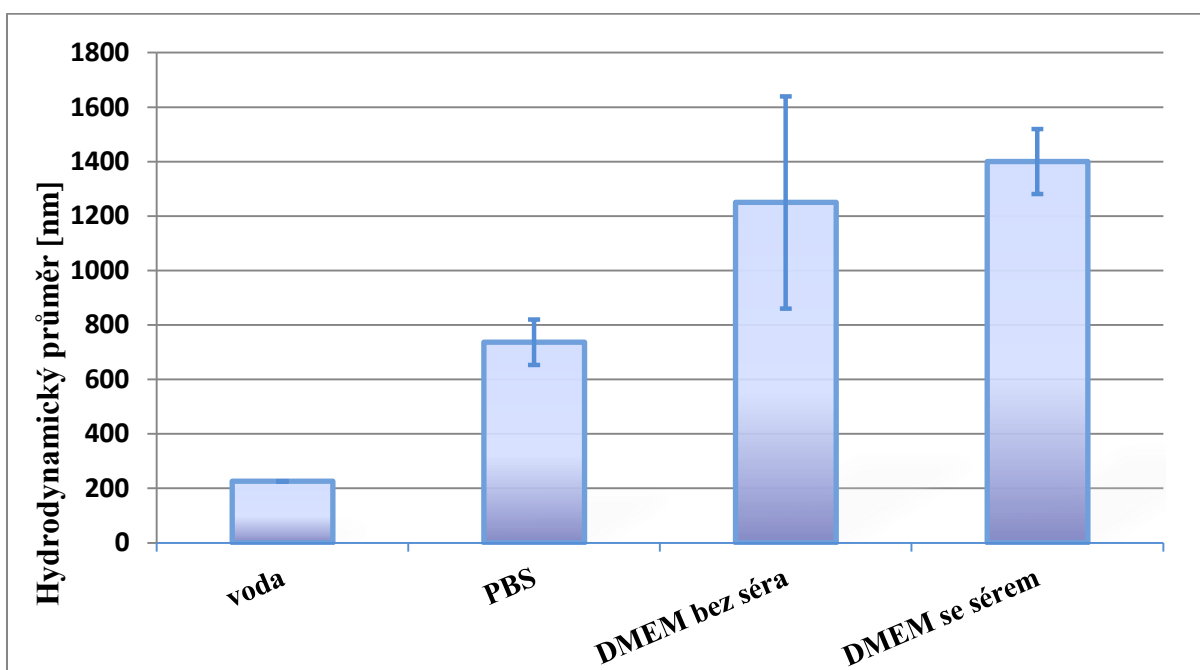
Hodnoty zeta potenciálu a hydrodynamického průměru pro komplex ND-PEI2000-DNA v různých prostředích jsou zaneseny do grafů na *Obr.21* a *Obr.22*. Všechny uvedené hodnoty zeta potenciálů se nachází v intervalu od -25 mV do -30 mV, tedy v oblasti koloidní nestability. Nejvíce se hranici stability blíží vzorek měřený v PBS s hodnotou zeta potenciálu -28,5 mV.

Nejnižší hodnota hydrodynamického průměru odpovídá nanočásticím analyzovaným ve vodě (226 nm). V dalších roztocích jsou hodnoty hydrodynamického průměru výrazně vyšší (PBS – 736 nm, DMEM bez séra – 1250 nm, DMEM se sérem – 1400 nm), to poukazuje na zvýšenou tendenci nanočástic k tvorbě agregátů.





Obr.21.: Graf znázorňující hodnoty zeta potenciálu pro komplex ND-PEI2000-DNA v různých roztocích



Obr.22.: Graf znázorňující hodnoty hydrodynamického průměru pro komplex ND-PEI2000-DNA v různých roztocích

## 6.2 Zobrazování diamantových nanočástic

Pro vizualizaci struktur v mikroskopii je důležitý dostatečný kontrast mezi pozorovanou strukturou a pozadím. V případě fluorescenční mikroskopie je klasicky kontrast daný intenzitou fluorescence a barvou fluorescence (spektrum fluoroforu). Emisní maximum N-V center fluorescenčních diamantových nanočástic se nachází přibližně okolo 680 nm. Přirozená autofluorescence buňky nemá jasný pík, ale pohybuje se při nižších vlnových

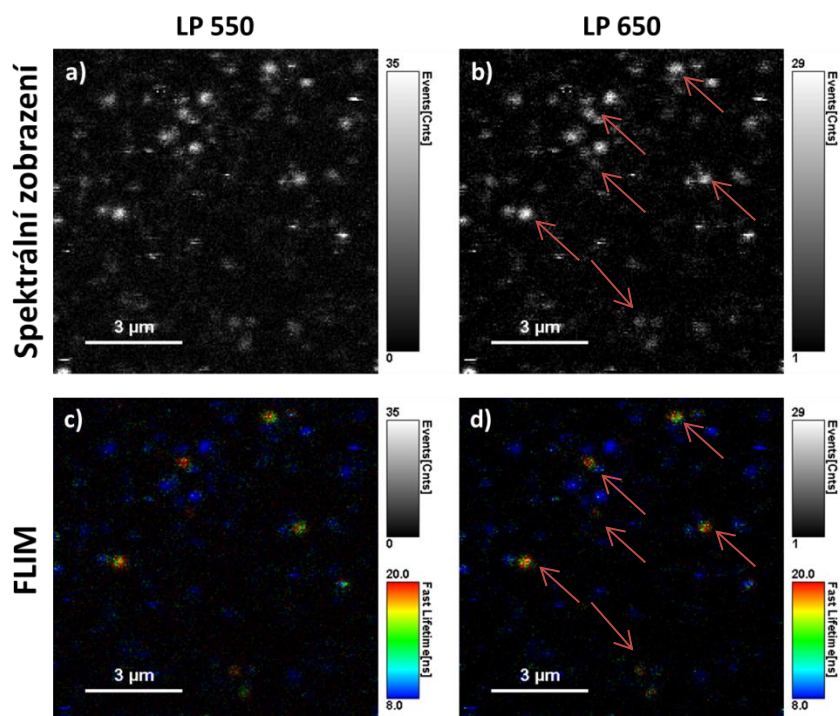


délkách (okolo 500 nm). Nejčastěji zmiňovaným zdrojem autofluorescence je flavin, organická sloučenina hojně se vyskytující v řadě biochemických reakcí a koenzymy oxido-redukčních reakcí NADH a NADHP. Emisní filtry tedy volíme tak, aby fluorescence NDP byla detekována s větší účinností než fluorescence buňky. Dalším důležitým parametrem, který může zvýšit kontrast v mikroskopii, je doba života fluorescence. Při zobrazování doby života fluorescence (FLIM – Fluorescence lifetime imaging) je v každém pixelu obrázku změřená doba života fluorescence a zobrazená pomocí zvolené barevné škály. Metoda FLIM umožňuje odlišit diamantové částice od ostatních struktur v buňce. Je to dáno tím, že doba dohasínání fluorescence těchto částic se pohybuje v rozmezí od 11 ns do 20 ns (v závislosti na okolním prostředí), zatímco doba dohasínání přirozené fluorescence (autofluorescence) buňky je nižší, přibližně v rozmezí 1-4 ns. [63,64].

V této kapitole jsou demonstrovány rozdíly zobrazování diamantových nanočástic metodou FLIM v porovnání s klasickou fluorescenční mikroskopií. V druhé části jsou shrnuty výhody snímání vzorků ve více fokálních rovinách.

### 6.2.1 Zobrazování samotných diamantových nanočástic

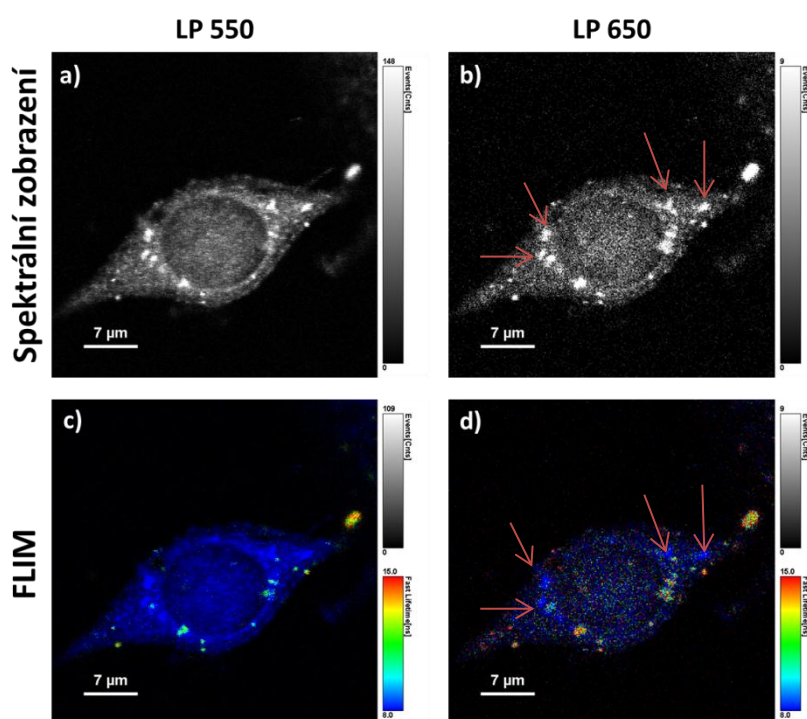
Snímky diamantových nanočástic získané metodou FLIM a klasickým spektrálním zobrazením při použití různých filtrů (LP 550 a LP 650) jsou na *Obr.23*. Nanočástice na *obr.23b* a *23d* jsou označeny červenými šipkami. Filtr propouštějící delší vlnové délky pouze částečně potlačí signál pozadí. Na rozdíl od spektrálního zobrazení umožňuje metoda FLIM zřetelné odlišení diamantových nanočástic od ostatních struktur na snímku.



*Obr.23: Vizualizace diamantových nanočástic na základě rozdílné vlnové délky emisního záření při použití filtru 550 LP (a) a 650 LP (b) a na základě odlišné doby dohasínání fluorescence při použití filtru 550 LP (c) a 650 LP (d).*

## 6.2.2 Zobrazování diamantových částic v buňkách

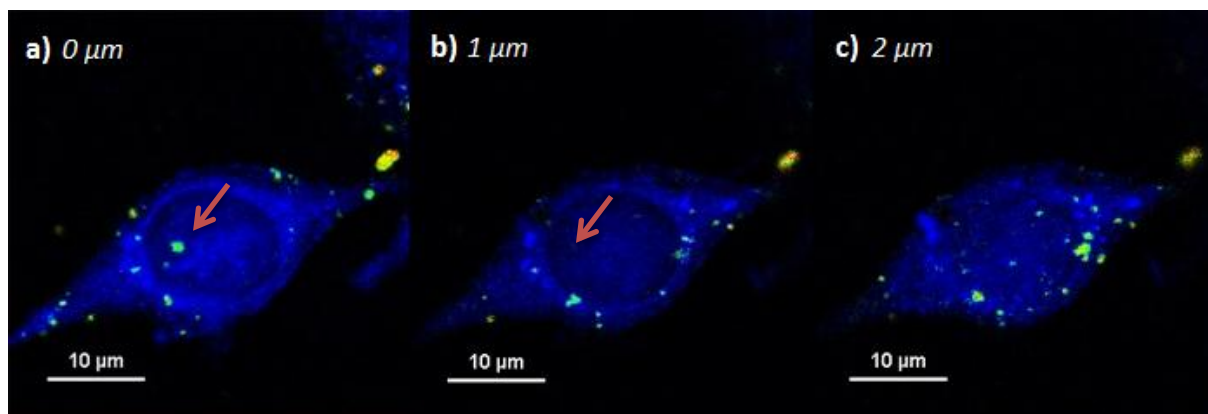
Rozdíl ve vizualizaci diamantových částic v buňkách při použití klasického fluorescenčního konfokálního mikroskopu a při použití techniky FLIM pro emisní filtry 550 LP a 650 LP je zobrazen na *Obr. 24*. Filtr propouštějící vlnové délky emisního záření nad 650 nm nám poskytuje ostřejší snímek, ale neumožňuje zřetelné odlišení NDP od buněčných struktur u obrázků z klasického fluorescenčního konfokálního mikroskopu (červenými šipkami jsou označeny části buňky, které vykazují stejnou intenzitu jako diamantové nanočástice). Naopak díky odlišné době života fluorescence, která je v obrázku kódovaná barevnou škálou, na FLIM snímku je možné ND částice jednoznačně odlišit od buněčného pozadí.



*Obr.24: Vizualizace buňky s nanodiamantovými částicemi na základě rozdílné vlnové délky emisního záření při použití filtru 550 LP (a) a 650 LP (b) a na základě odlišné doby dohasínání fluorescence při použití filtru 550 LP (c) a 650 LP (d).*

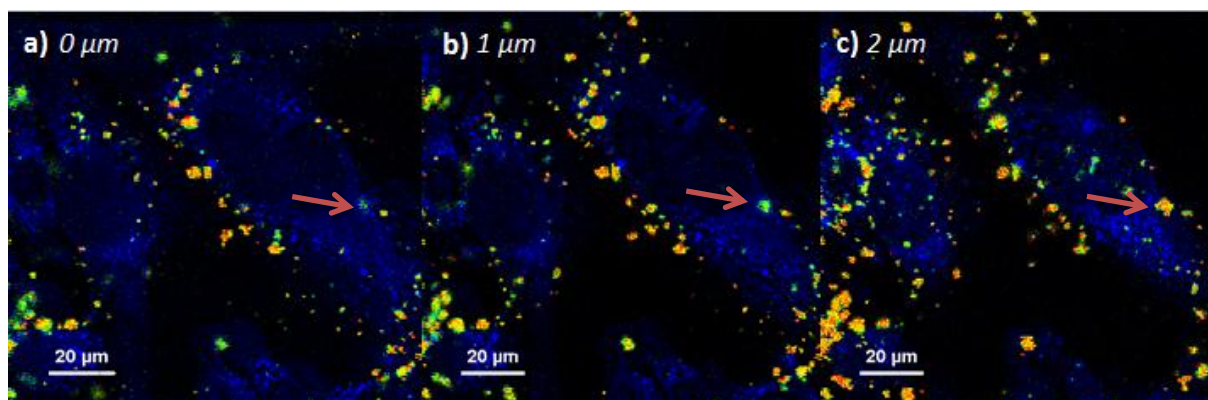
### Snímání ve třech fokálních rovinách

Abychom mohli s jistotou určit, zda se diamantové částice nacházejí uvnitř buňky či nikoliv, byl každý vzorek nasnímán ve 3 fokálních rovinách, vzájemně vzdálených 1 až 2  $\mu\text{m}$ . Pokud bychom pro vzorek na *Obr.25* měli k dispozici pouze první obrázek (*Obr.25a*), mohli bychom mylně interpretovat, že částice označená šipkou se nachází uvnitř jádra. Podíváme-li se na následující snímek (*Obr.25b*), kde je jádro zřetelně zaostřeno, částici již nevidíme. Je tedy zřejmé, že NDP není lokalizovaná v jádře, ale pod ním.



Obr.25: Obrázek znázorňující buňku s NDP ve třech fokálních rovinách

Signál z větších částic adherovaných na membráně buňky lze detekovat i v rovinách pod/nad oblastí, kde se částice nachází. Názorný příklad představuje obrázek Obr.26. Na prostředním snímku (Obr.26b) zaostřeném na jádro buňky vidíme zřetelný signál (označený šipkou), který by v případě jediného snímku jasně dokazoval přítomnost NDP v cytoplazmě. Ve fokální rovině zaostřené na povrch buňky je ovšem tento signál daleko silnější. Částice tedy není v cytoplazmě, ale je přichycena na vnější povrch plazmatické membrány.



Obr.26 Obrázek znázorňující buňku s NDP ve třech fokálních rovinách

### 6.3 Účinnost průniku NDP do buněk

V této kapitole jsou uvedeny výsledky ověření účinnosti průniku diamantových nanočástic do buněk metodami fluorescenční konfokální mikroskopie (FLIM, standartní měření) a průtokové cytometrie (FACS).

Metoda FLIM (MicroTime 200) byla vybrána na základě charakteristické doby dohasínání N-V center nanočástic, která umožňuje jejich odlišení od ostatních struktur ve vzorku (kapitola 6.2.). Pro kvalitativní posouzení internalizace nanočástic byly pořízeny snímky zahrnující velmi malé množství buněk. Každý vzorek byl současně nasnímán ve třech fokálních rovinách, aby bylo zamezeno chybnému určení lokalizace NDP (kapitola 6.2.1). Tato metoda nám tak dává nejpřesnější informaci o průniku NDP do jednotlivých buněk.

Pro obecnější představu o chování NDP v buněčném prostředí byly vzorky naměřeny na standardním fluorescenčním konfokálním mikroskopu (Olympus Fluoview FV1000). Snímky o velikosti 1x1 mm umožňují kvalitativní posouzení průniku nanočástic. Procentuální zastoupení buněk obsahující NDP je ovšem orientační, neboť snímáním ve větším rozsahu lze zobrazovat pouze agregáty, ne jednotlivé nanočástice. Zároveň nelze s jistotou posoudit, zda se nanočástice nachází uvnitř cytoplazmy. Emisní záření neposkytuje dostatečně selektivní informaci, signály z jiných struktur tak mohou být chybně považovány za NDP.

Průtoková cytometrie (BD LSR II) je často používanou metodou ve studiích zabývajících se hodnocením průniku NDP do buněk. Z toho důvodu byla zvolena v této práci pro porovnání s metodami fluorescenční konfokální mikroskopie. Její hlavní výhodou je objektivní výsledek vycházející z analýzy velkého množství buněk. Nevýhodou je, že do pozitivních výsledků jsou zahrnuty i NDP nacházející se na povrchu buňky.

Typy použitých diamantových nanočástic a buněk jsou specifikovány v kapitolách uvádějících výsledky pro jednotlivé metody.

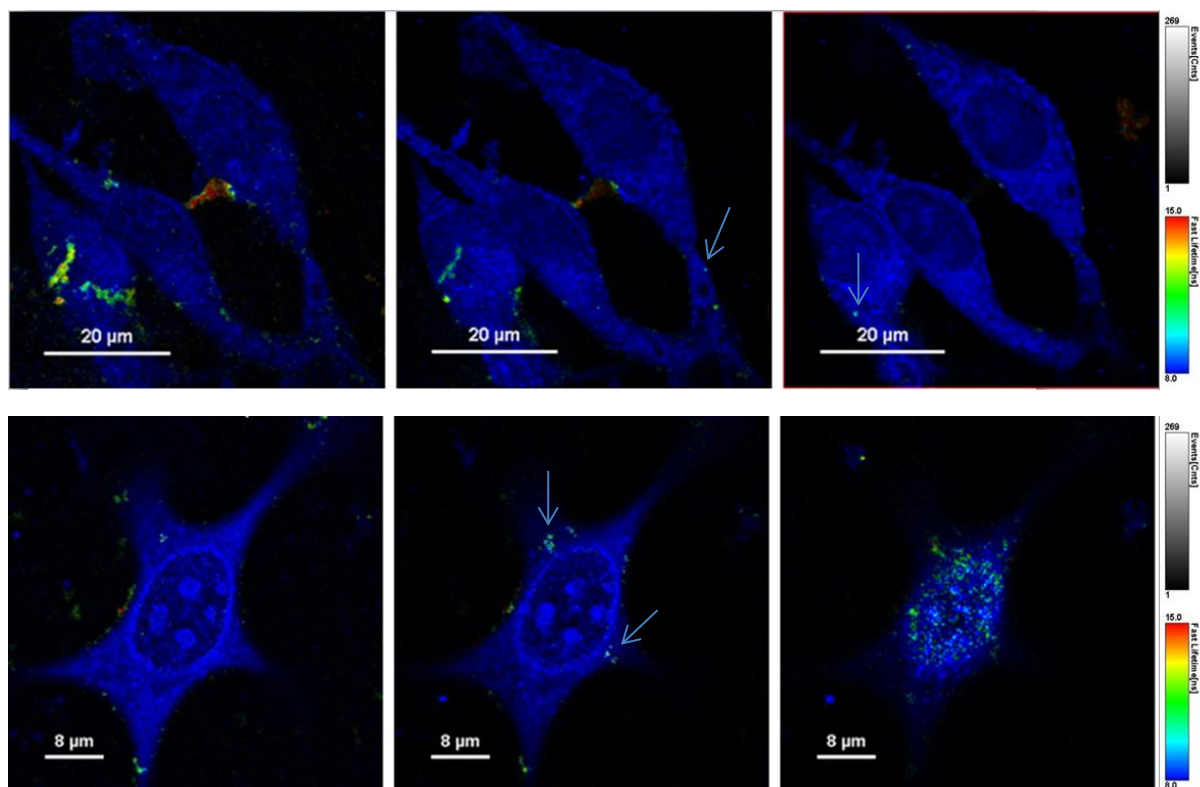
### **6.3.1 Konfokální mikroskopie - FLIM**

Obrázky *Obr.27-41* zachycují snímky pořízené technikou FLIM na konfokálním mikroskopu MicroTime 200. Stimulace buněk probíhala po dobu 120 min, následně byly vzorky zafixovány 70% ethanolem. Použity byly NDP s různou povrchovou funkcionalizací (s oxidovaným povrchem, navázaným PEI2k/750 a s navázaným PEI2k/750k-DNA) a tři typy buněčných linií (CT26, 3T3, IC-21). Každý vzorek byl skenován ve třech fokálních rovinách vzájemně vzdálených 1-2  $\mu\text{m}$ , na obrázcích zleva (nejnižší) směrem doprava (nejvyšší). Vzorek byl excitován při vlnové délce 532 nm.

Jednotlivé hodnoty doby dohasínání fluorescence jsou reprezentovány barevnou škálou, jejíž rozsah byl nastaven v rozmezí od 8 (modrá) do 15 ns (červená). N-V centra diamantových nanočástic jsou charakterizovány delší dobou života fluorescence (11-20 ns) ve srovnání s buňkami, u nichž se tato hodnota pohybuje od 1 ns do 4 ns. Částice jsou tedy na snímcích vyobrazeny žlutou až oranžovo-červenou barvou a lze je snadno odlišit od modře zbarvených buněčných struktur.

## CT26

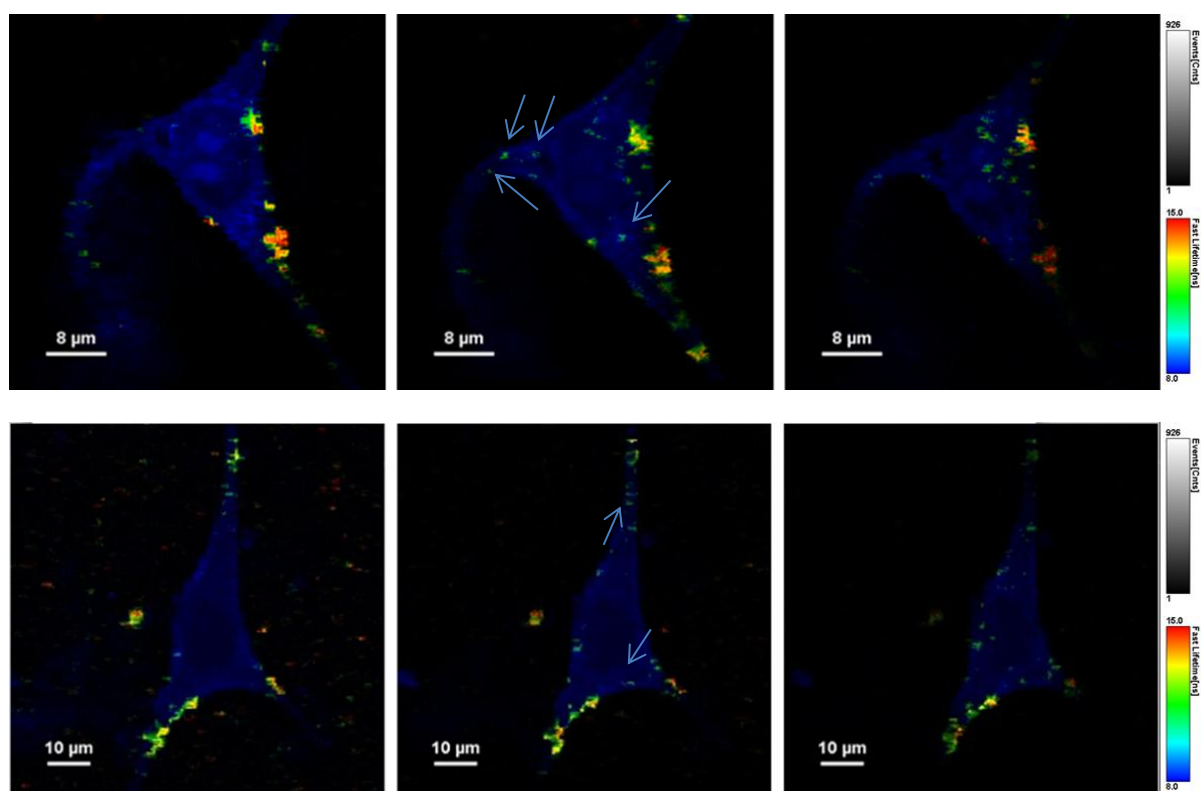
### CT26-ND



Obr.27: FLIM snímky – interakce nanodiamantových částic s oxidovaným povrchem s buňkami CT26

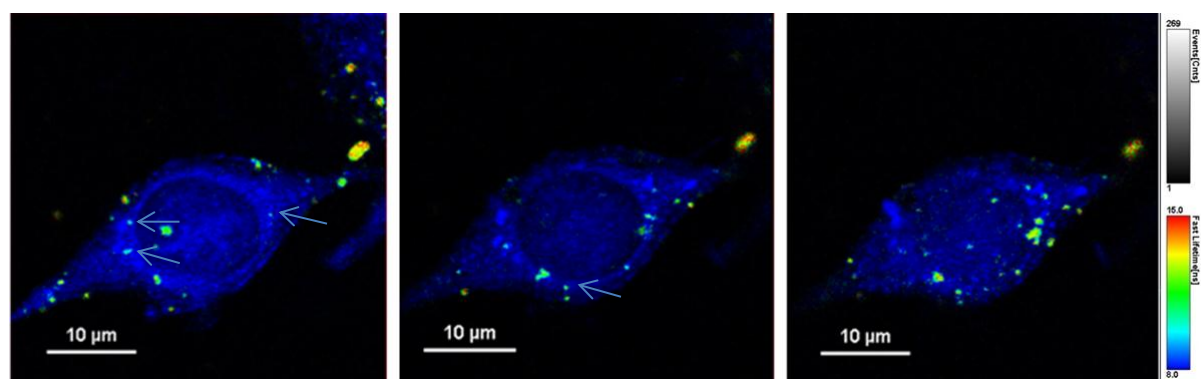


### CT26-ND-PEI2000



*Obr.28: FLIM snímky – interakce nanodiamantových částic s navázaným PEI2000 s buňkami CT26*

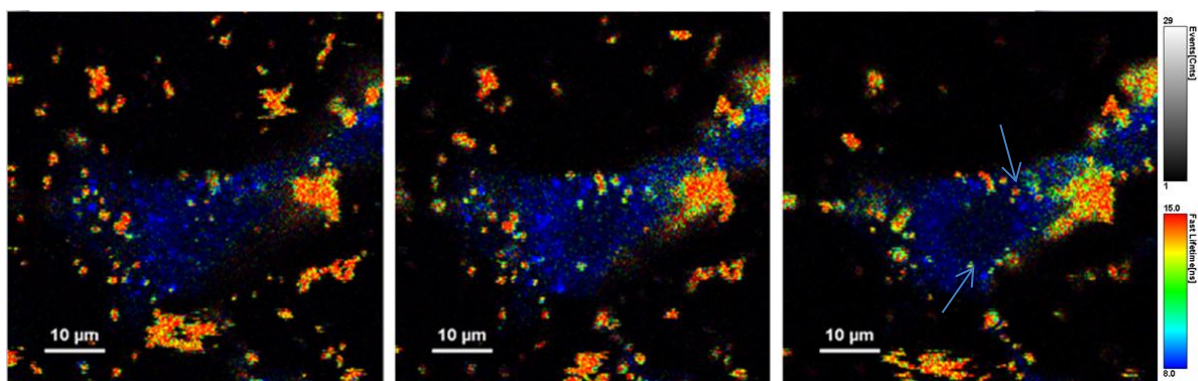
### CT26-ND-PEI750000



*Obr.29: FLIM snímky – interakce nanodiamantových částic s navázaným PEI750000 s buňkami CT26*

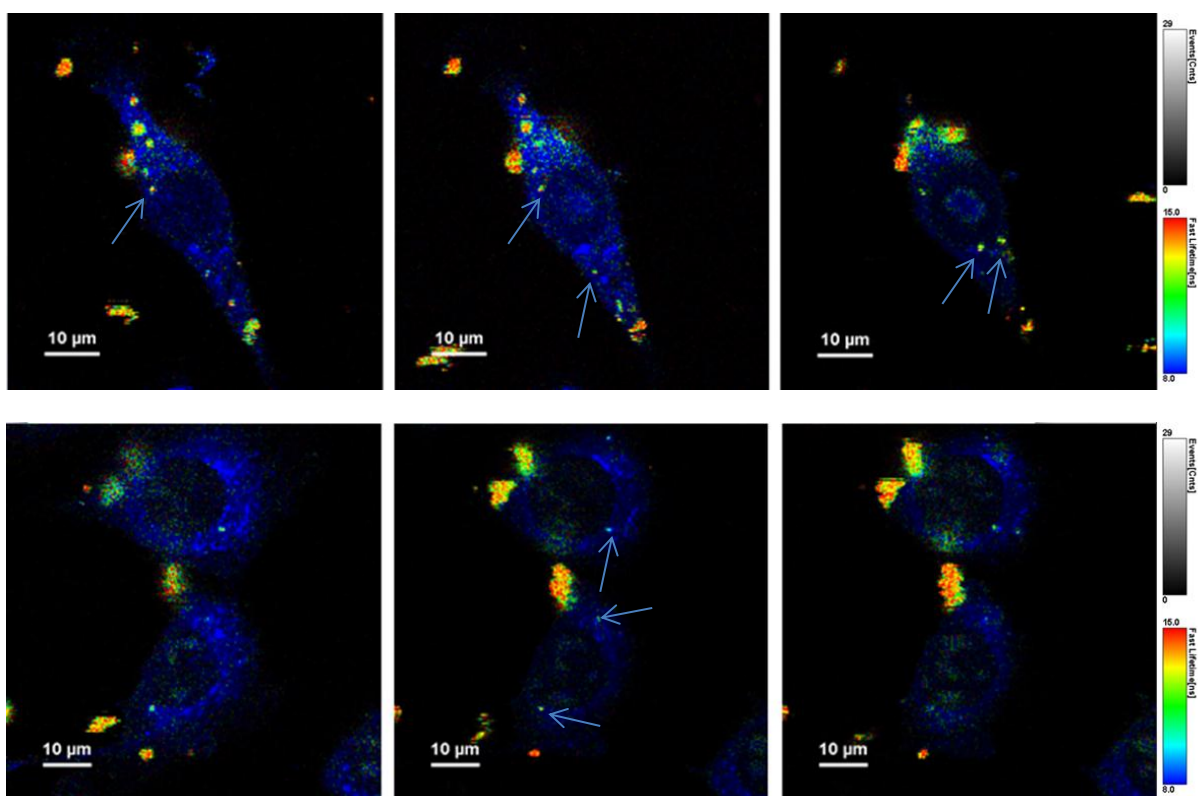
*Obr.27* zachycuje buňky CT26 stimulované NDP s oxidovaným povrchem. Částice se nacházejí v cytoplasmě pouze v omezeném množství, většina je adherována na povrchu plazmatické membrány. Celkové množství NDP v okolí buněk je malé. V případě ND-PEI2000 (*Obr.28*) dochází k tvorbě menších klastrů, jejichž přítomnost v buňce není prokazatelná. Stejně jako v předchozím případě jsou pohlcovány menší částice. NDP potažené PEI750000 nevykazují zvýšenou tendenci agregovat, převážná většina z nich se nachází v buňce a to především v perinukleárním prostoru.

### CT26-PEI2000-DNA



*Obr.30: FLIM snímky – interakce buněk CT26 s nanodiamantovými částicemi s navázaným PEI2000 a DNA*

### CT26-ND-PEI750000-DNA

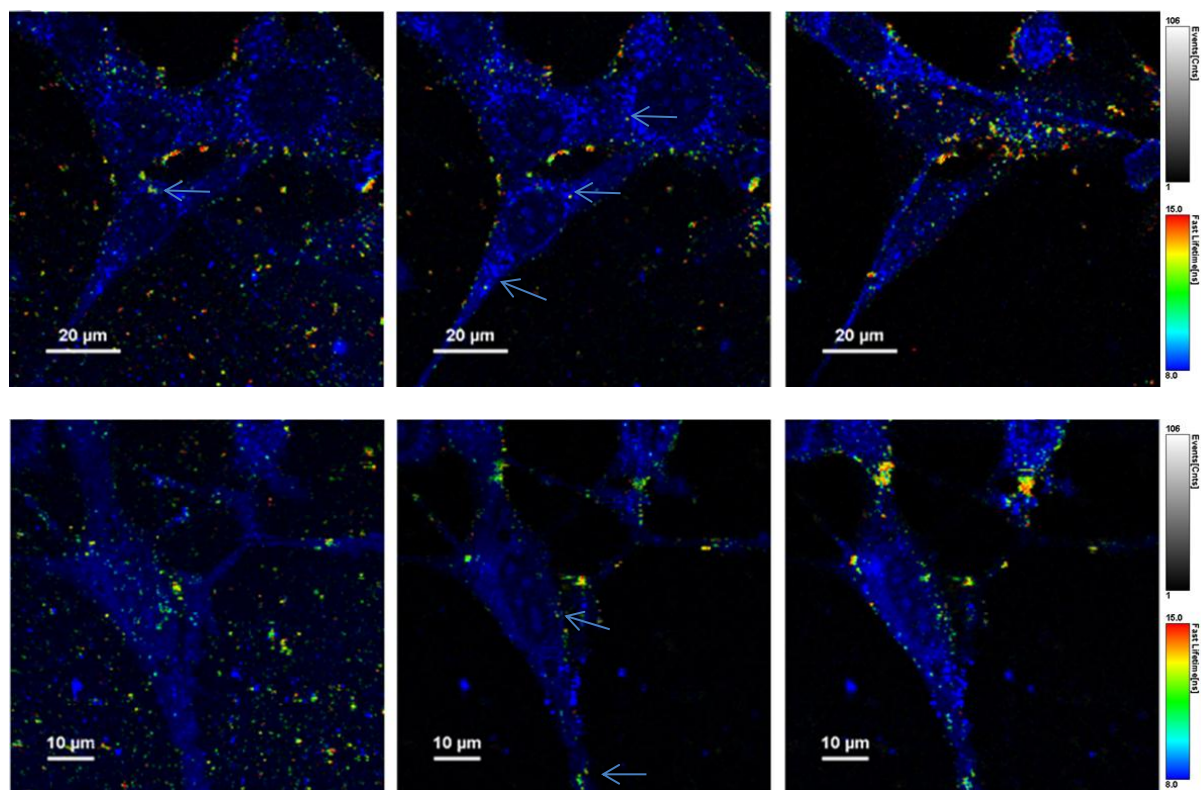


*Obr.31: FLIM snímky – interakce buněk CT26 s nanodiamantovými částicemi s navázaným PEI750000 a DNA*

Navázaná sekvence DNA zřejmě není schopna plně kompenzovat kladný náboj komplexu ND-PEI, vzniká tak nestabilní suspenze a dochází k agregaci. Tvorba agregátů je patrná u obou komplexů ND-PEI2000-DNA (*Obr.30*) i ND-PEI750000-DNA (*Obr.31*). Ovšem v případě PEI s nižší molekulovou hmotností jsou shluky více koncentrovány v okolí buňky. Velké agregáty není buňka schopna pohltnout, zůstávají tedy přilepené na jejím povrchu a internalizovány jsou jen malé shluky nebo jednotlivé částice.

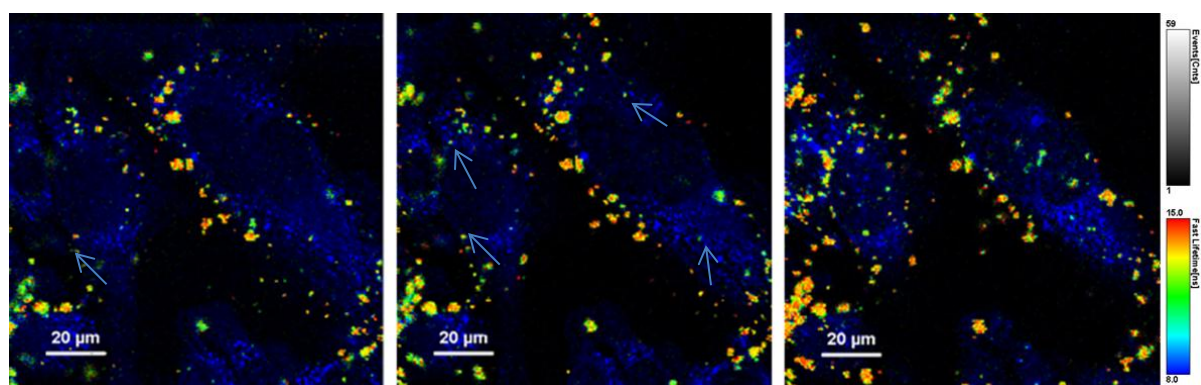
### 3T3

#### 3T3-ND



*Obr.32: FLIM snímky – interakce buněk 3T3 s nanodiamantovými částicemi oxidovaným povrchem*

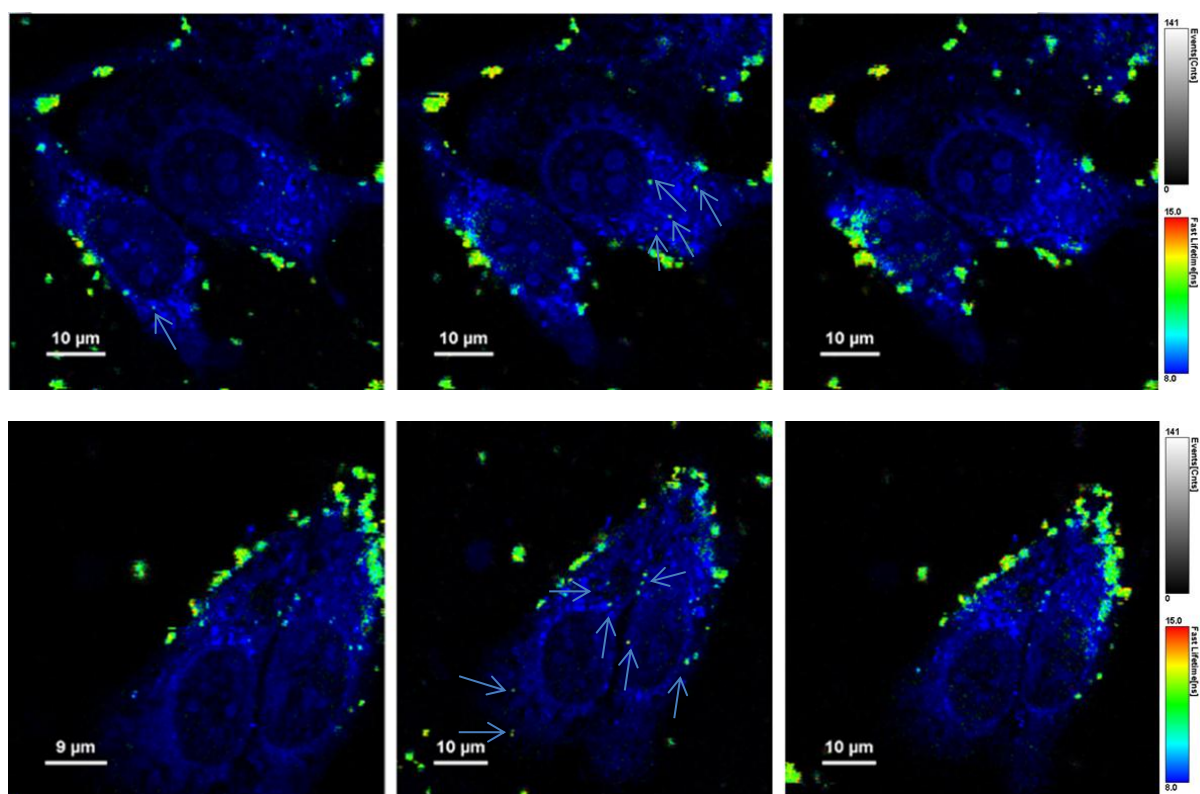
#### 3T3-ND-PEI2000



*Obr.33: FLIM snímky – interakce buněk 3T3 s nanodiamantovými částicemi s navázaným PEI2000*



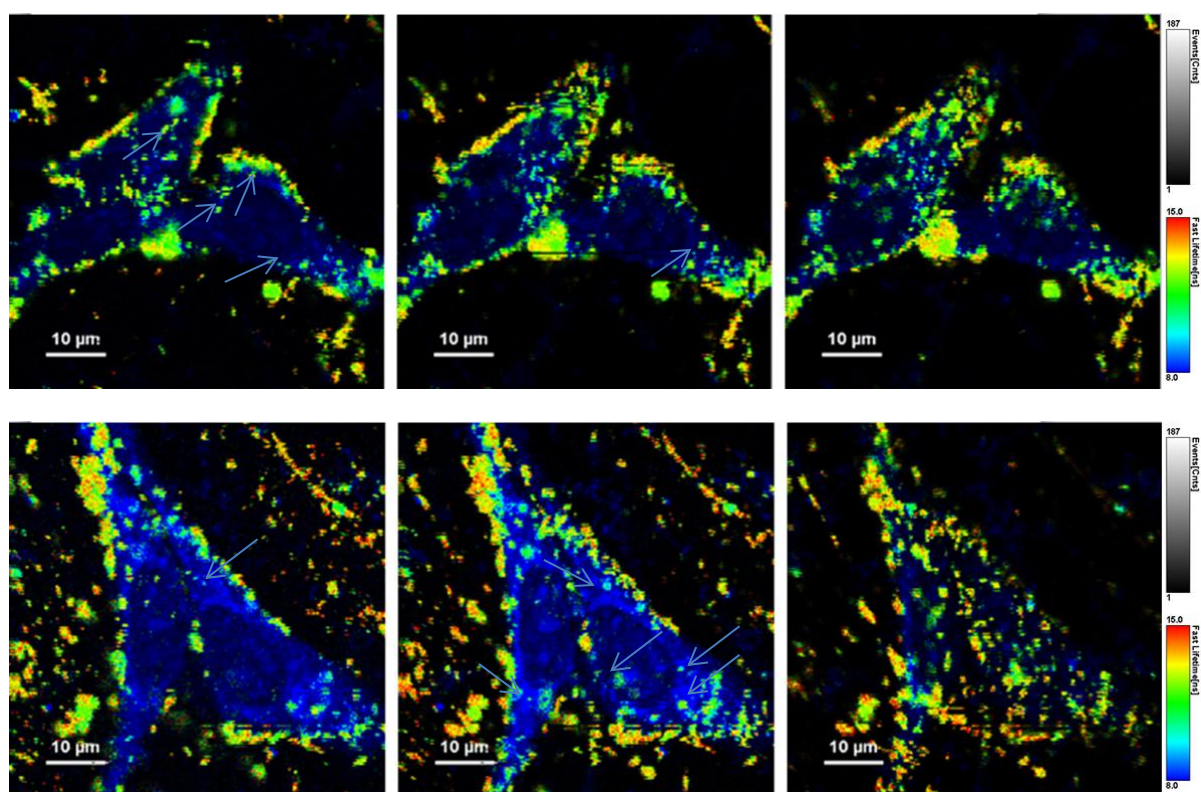
### 3T3-ND-PEI750000



Obr.34: FLIM snímky – interakce buněk 3T3 s nanodiamantovými částicemi s navázaným PEI750000

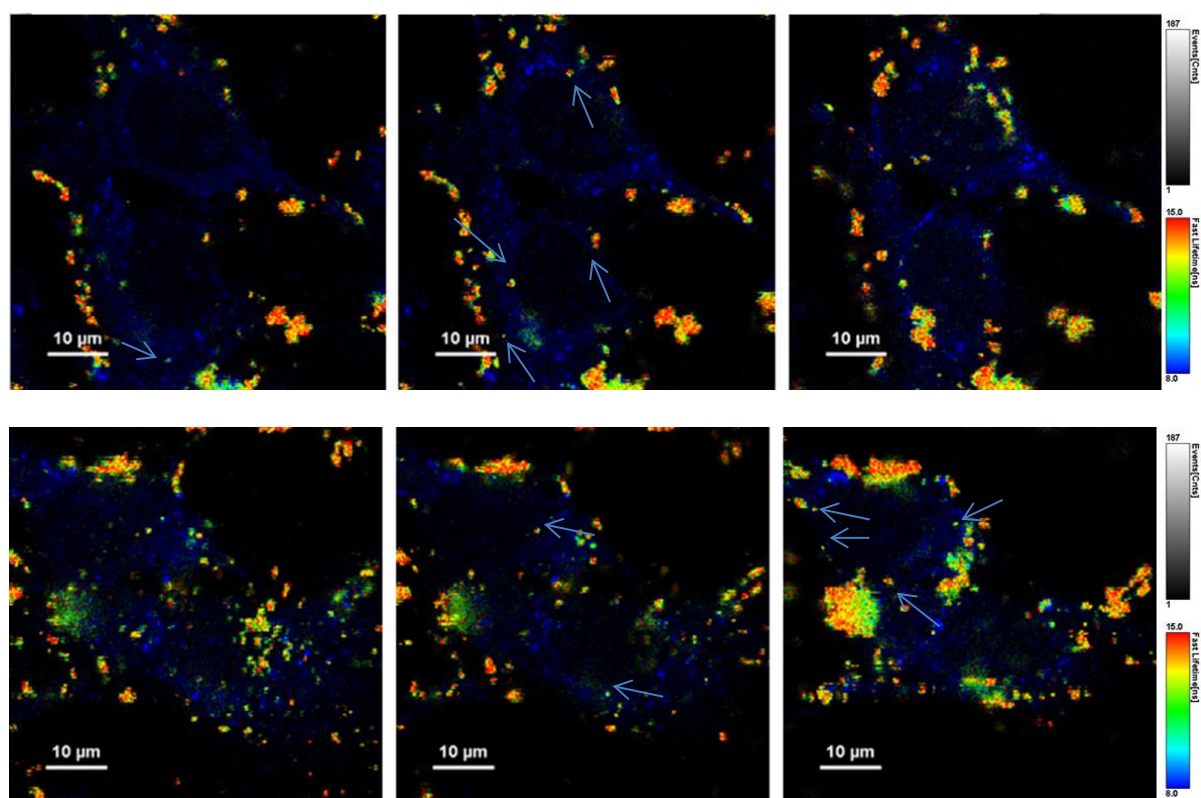
Na Obr.32 vidíme snímek buněk 3T3 v interakci s nefunkcionalizovanými NDP. Částice se vyskytují spíše jednotlivě, v malém množství okolo buňky, jen sporadicky jsou přítomny v cytoplazmě. Po navázání PEI (Obr.33 a 34) dochází k formování agregátů. Ve vzorcích se objevují jen vyjmečně volné částice, které nejsou v těsném kontaktu s buňkou. U nezagregovaných částic pozorujeme lepší internalizaci pro komplexy ND-PEI750000-

### 3T3-ND-PEI2000-DNA



Obr.35: FLIM snímky – interakce buněk 3T3 s NDP s navázaným PEI2000 a DNA

### 3T3-ND-PEI750000-DNA

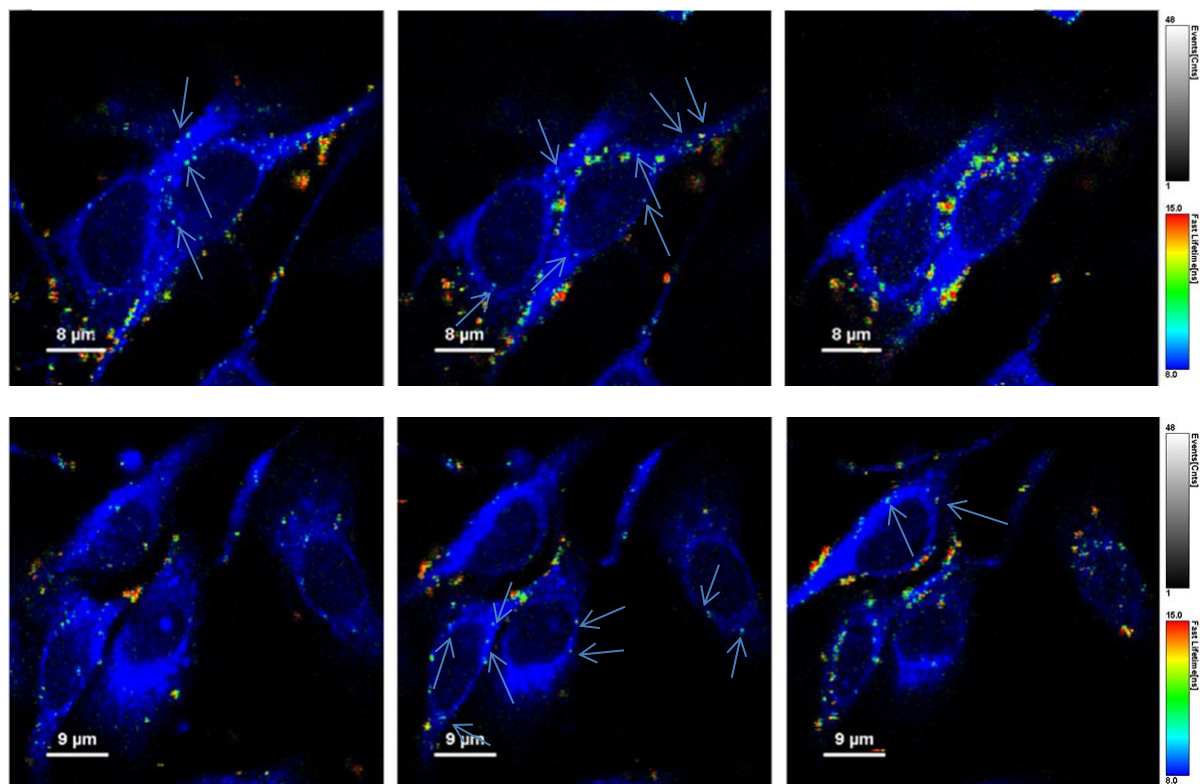


Obr.36: FLIM snímky – interakce buněk 3T3 s NDP s navázaným PEI750000 a DNA



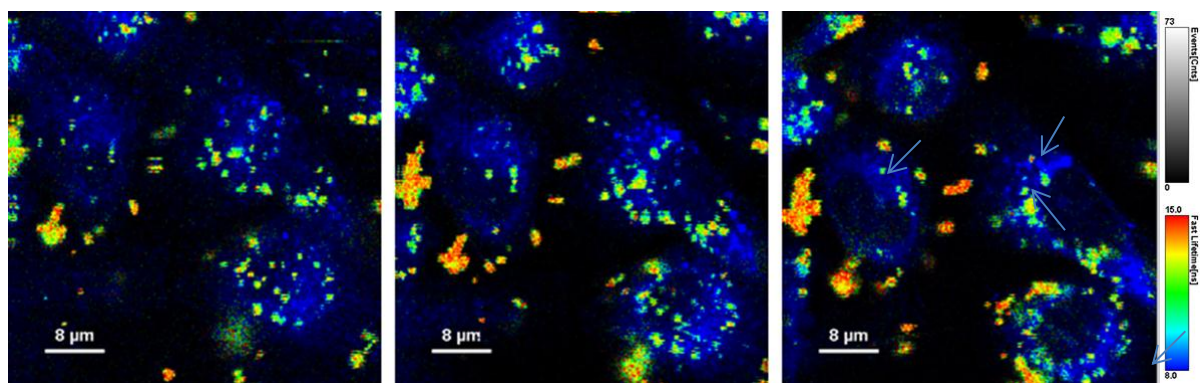
Komplexy s navázanou DNA mají zvýšenou tendenci soustředit se na povrchu plazmatické membrány. To platí především pro ND-PEI2000-DNA (Obr.35), kde můžeme zejména po stranách buňky pozorovat téměř souvislou vrstvu částic. Nezanedbatelné množství se nachází také uvnitř buňky. U ND-PEI750000-DNA (Obr.36) dochází k tvorbě větších agregátů, shluky menších rozměrů nebo jednotlivé částice jsou přítomny v cytoplazmě.

### IC-21-ND

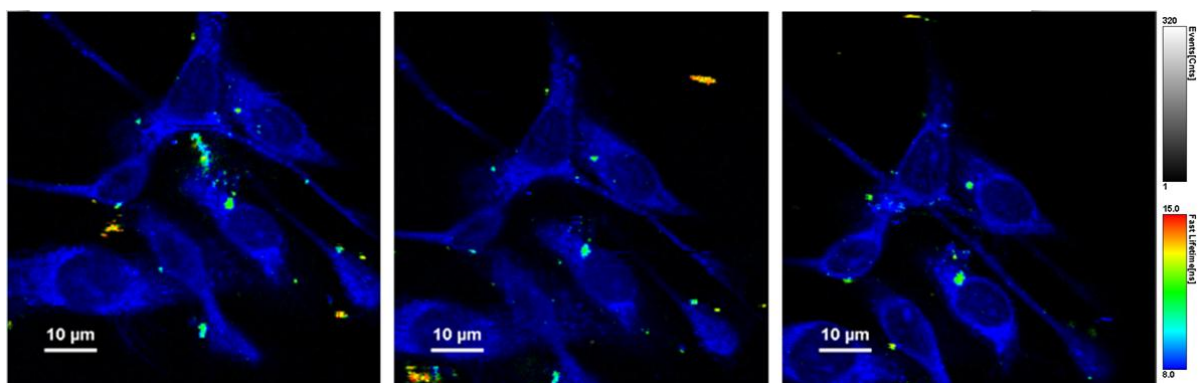


Obr.37: FLIM snímky – interakce buněk IC21 s nanodiamantovými částicemi s oxidovaným povrchem

### IC-21-NDPEI2000



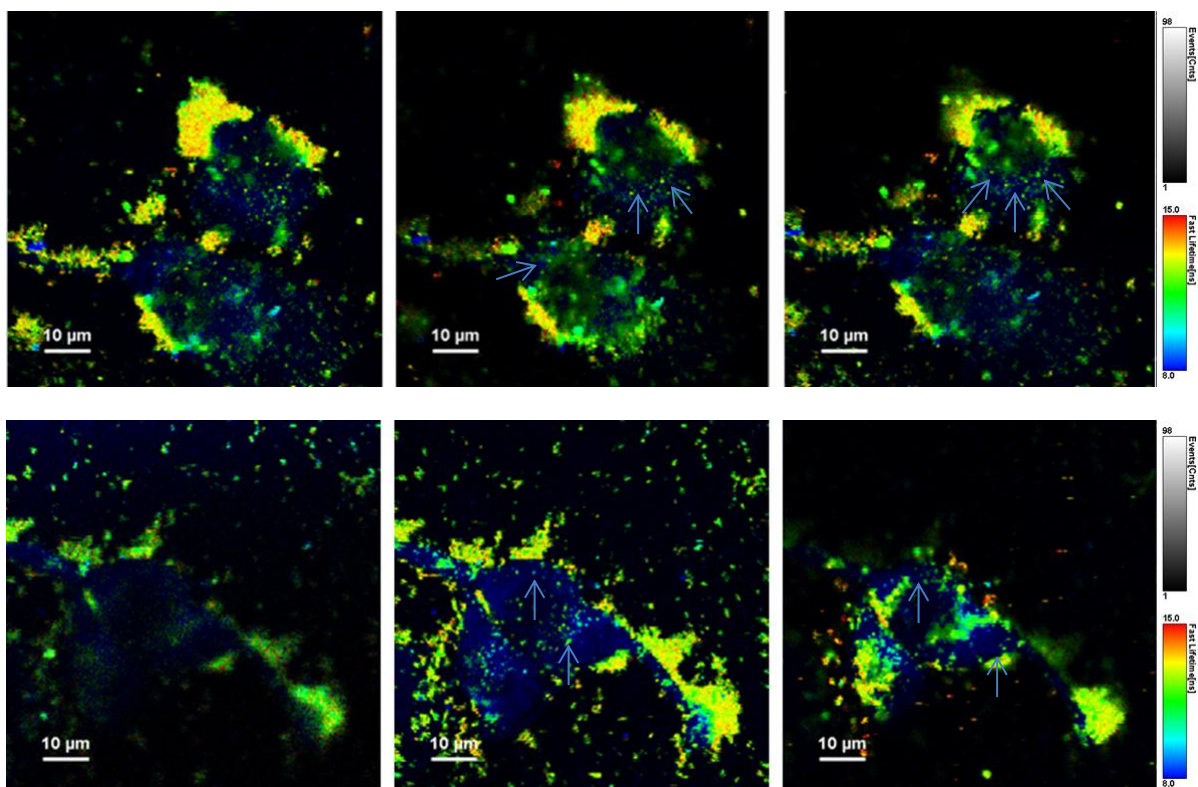
Obr.38: FLIM snímky – interakce buněk IC21 s nanodiamantovými částicemi s navázaným PEI2000



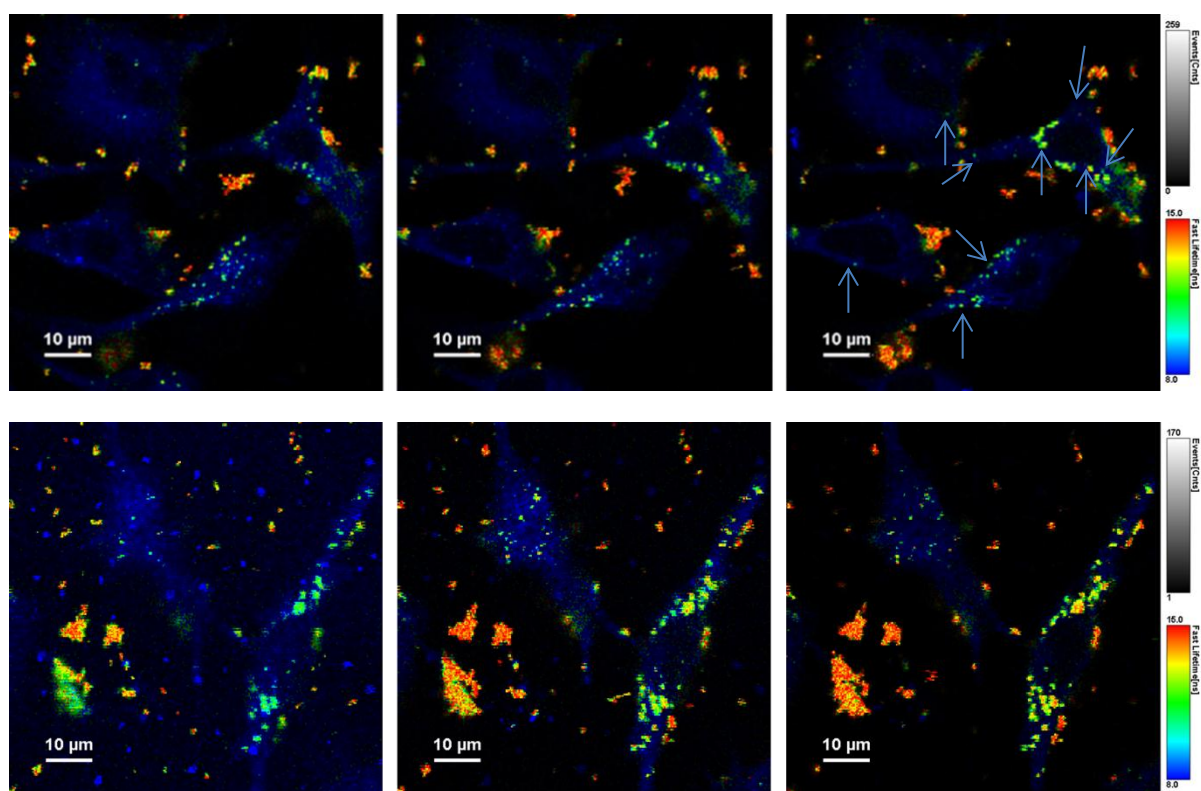
*Obr.39: FLIM snímky – interakce buněk IC21 s nanodiamantovými částicemi s navázaným PEI750000*

U buněk IC-21 se projevuje jejich přirozená schopnost fagocytovat látky z okolního prostředí. To potvrzuje *Obr.37*, kde můžeme vidět, že oxidované NDP se nacházejí v hojném množství uvnitř buňky ve formě jednotlivých částic. U NDP funkcionalizovaných PEI2000 už můžeme pozorovat tvorbu menších agregátů, ale i v tomto případě dochází k jejich pohlcování. Nejméně pohlcených částic bylo detekováno u komplexů ND-PEI750000. U žádných vzorků na *Obr.37-39* nedochází ke koncentraci částic na povrchu buňky, jako tomu bylo u buněk 3T3.

#### IC-21-ND-PEI2000-DNA



*Obr.40: FLIM snímky – interakce buněk IC-21 s nanodiamantovými částicemi s navázaným PEI2000 a DNA*



Obr.41: FLIM snímky – interakce buněk IC-21 s nanodiamantovými částicemi s navázaným PEI750000 a DNA

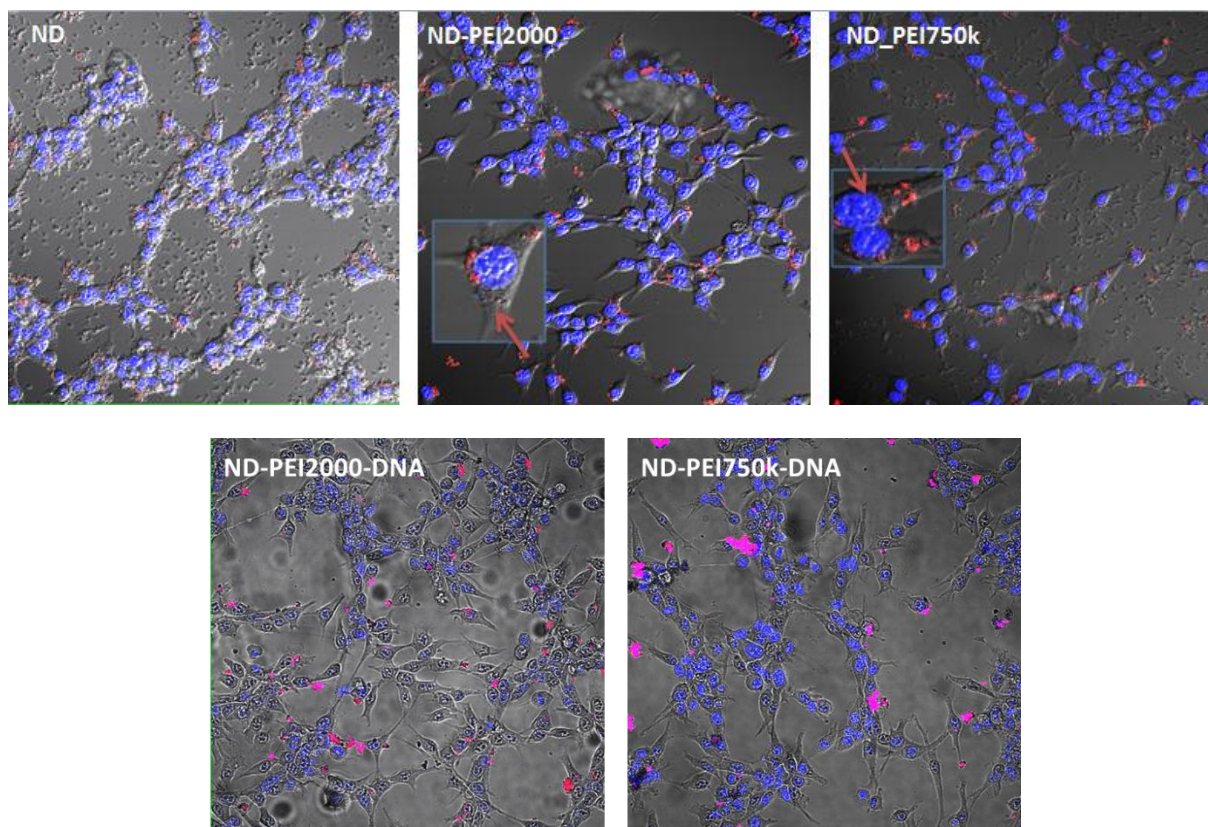
U komplexů ND-PEI2000-DNA (Obr.40) dochází k výraznému shlukování částic na povrchu buňky. Naopak částice, které nejsou v kontaktu s buňkou, nevykazují sklony k tvorbě větších agregátů. Vzhledem k silnému signálu vycházejícímu ze shluků na povrchu není snadné posoudit přítomnost NDP uvnitř buňky, ale zdá se, že se v cytoplazmě nachází větší počet malých částic. NDP s navázaným PEI750000 a DNA (Obr.41) se koncentrují do jednotlivých agregátů, které nejsou ve zvýšeném množství lokalizovány u cytoplazmatické membrány, jako tomu bylo v předchozím případě. I zde dochází k efektivní internalizaci malých částic.

### 6.3.2 Konfokální mikroskopie – standartní měření

Klasické konfokální snímky byly pořízeny na přístroji Olympus Fluoview FV10000. Pro lepší odhad lokalizace NDP byla buněčná jádra obarvena fluoforem Hoechst 33342. Měření probíhalo na třech kanálech (signál z NDP, signál z jader, standartní snímek buněk) v rovině s nejsilnějším signálem z jader. Výsledkem překrytí těchto třech skenů jsou Obr.42 a obr.43, kde modrá barva reprezentuje jádra buněk a červená diamantové částice. Studována byla internalizace funkcionalizovaných NDP (s oxidovaným povrchem, navázaným PEI2k/750 a s navázaným PEI2k/750k-DNA) do dvou typů buněk (CT26,3T3). Vzorokly byly stimulovány 120 min a následně zafixovány 70% ethanolem.

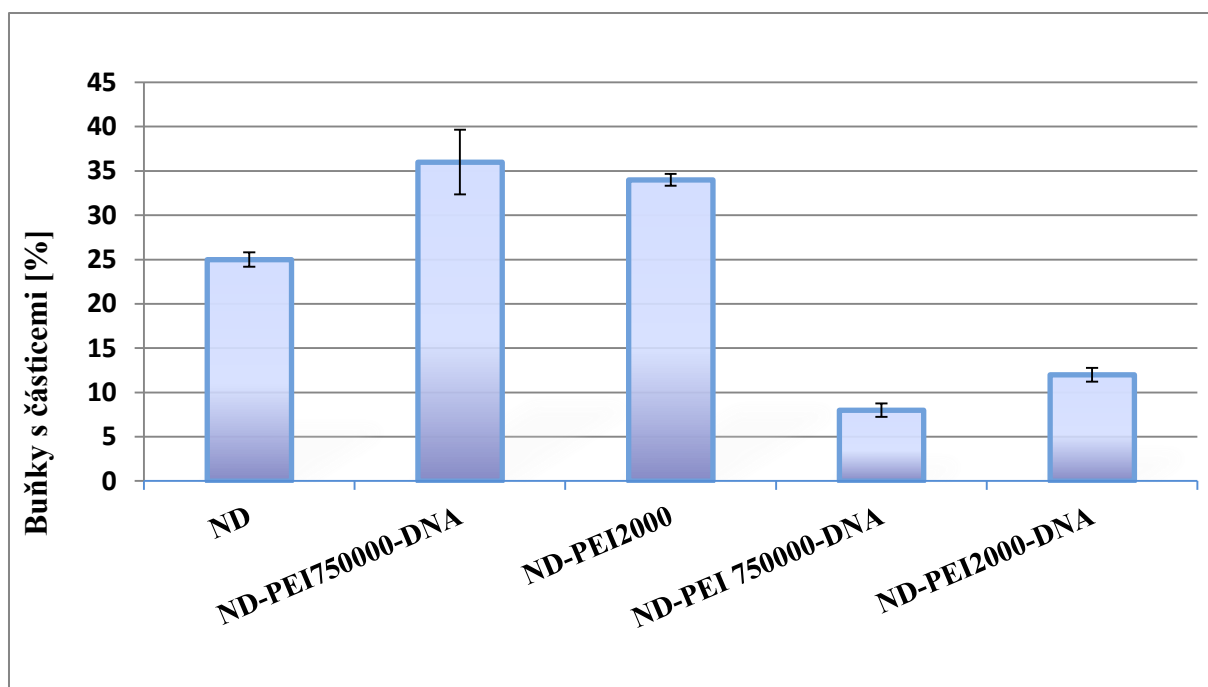


## CT26



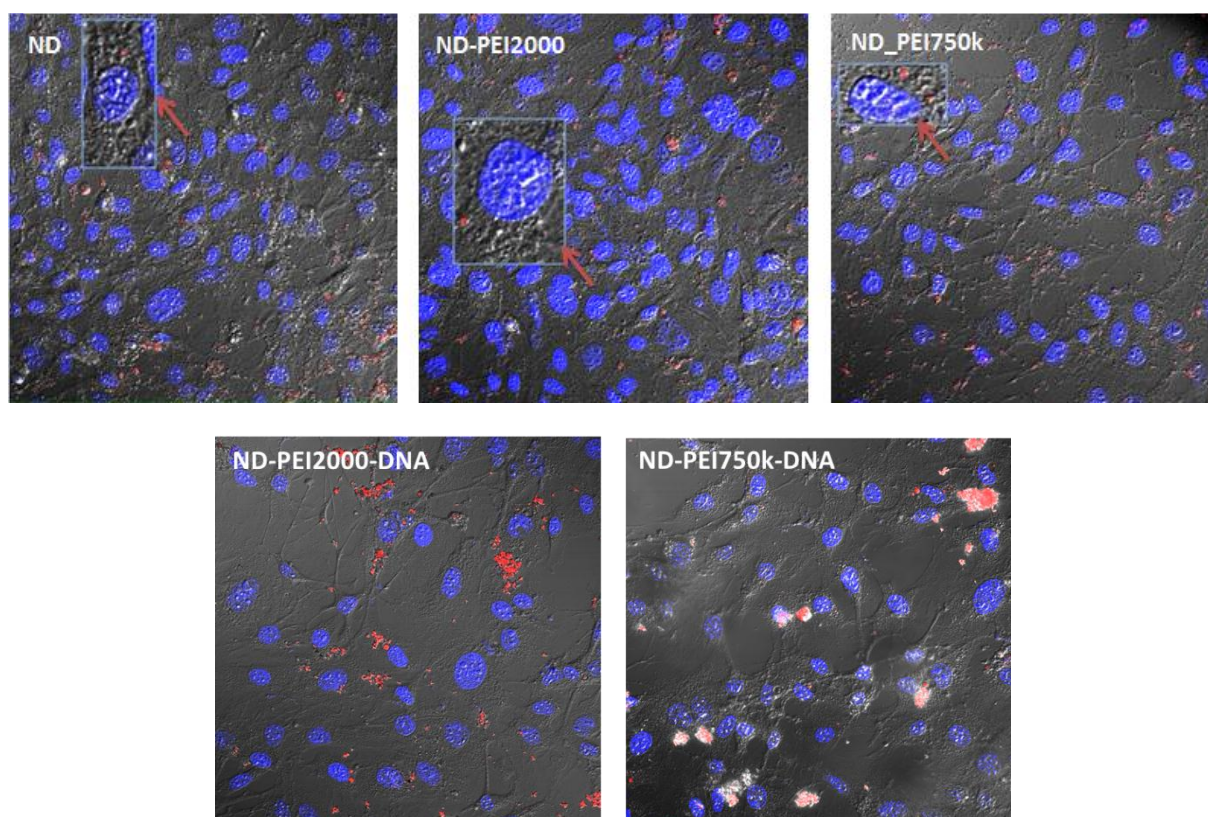
*Obr.42: Snímky z fluorescenčního konfokálního mikroskopu: CT26 buňky s NDP s různou povrchovou funkcionalizací*

*Obr.42* zachycuje buněčnou linii CT26 a částice s různou povrchovou modifikací. Na obrázcích komplexů s navázanou DNA vidíme dominantní výskyt velkých agregátů s téměř nulovým podílem částic lokalizovaných v buňkách. To také potvrzuje graf na *Obr.43*, udávající procento buněk s internalizovanými částicemi, které se pohybuje pro oba komplexy (ND-PEI2000-DNA i ND-PEI750000-DNA) ve velmi nízkých hodnotách (okolo 5 %). Z grafu dále vyplývá, že nejefektivněji jsou pohlcovány komplexy ND-PEI750000, které se vyskytují v přibližně 35 % buněk.



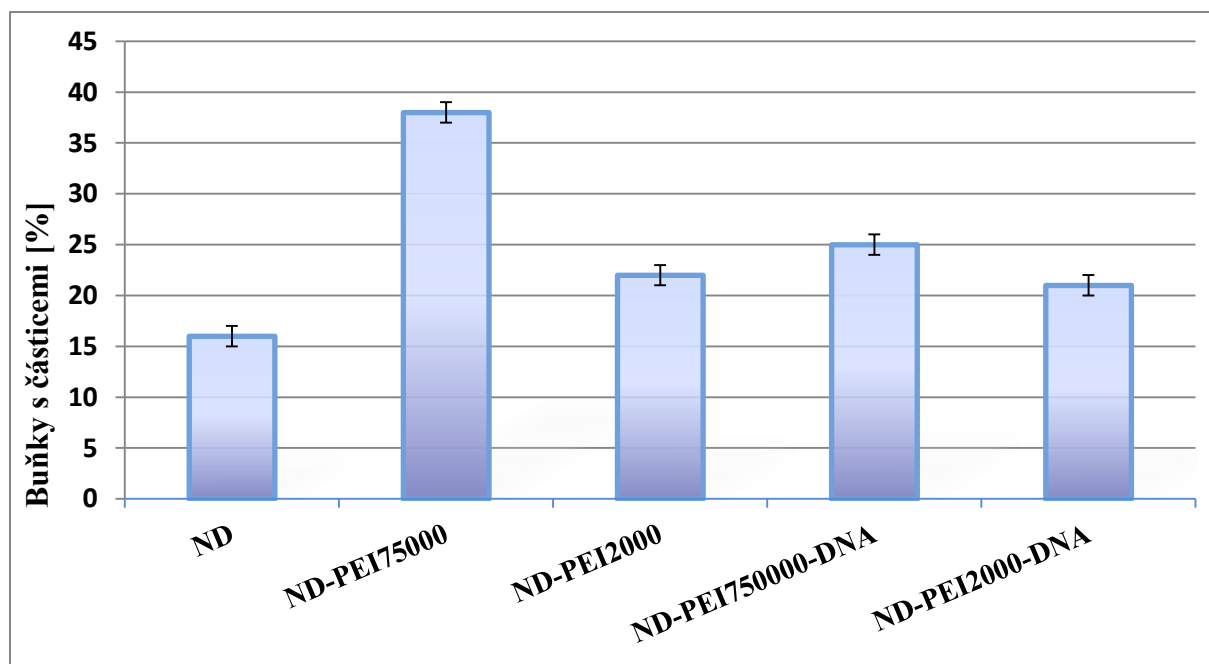
Obr.43: Procentuální zastoupení buněk s internalizovanými částicemi pro buněčnou linii CT26

### 3T3



Obr.44: snímky z fluorescenčního konfokálního mikroskopu: 3T3 buňky s NDP s různou povrchovou funkcionalizací

Interakci diamantových nanočástic s buněčnou linií 3T3 znázorňuje *obr.44*. V případě samotných NDP a komplexů s PEI je situace velmi obdobná jako u nádorových buněk CT26, i zde mají nejvyšší účinnost internalizace NDP s navázaným PEI7500000, jak ukazuje graf na *Obr.45*. Ve vzorcích s navázanou DNA dochází k tvorbě velkých shluků (zejména u ND-PEI750000-DNA), nacházejí se zde ale i malé agregáty, které jsou buňkami v malém množství přijímány. Celková účinnost transfekce je vyšší než u nádorových buněk, a to 25 % pro ND-PEI750000-DNA a 21 % pro ND-PEI2000-DNA.



*Obr.45: Procentuální zastoupení buněk s internalizovanými částicemi pro buněčnou linii 3T3*

### 6.3.3 Průtoková cytometrie (FACS)

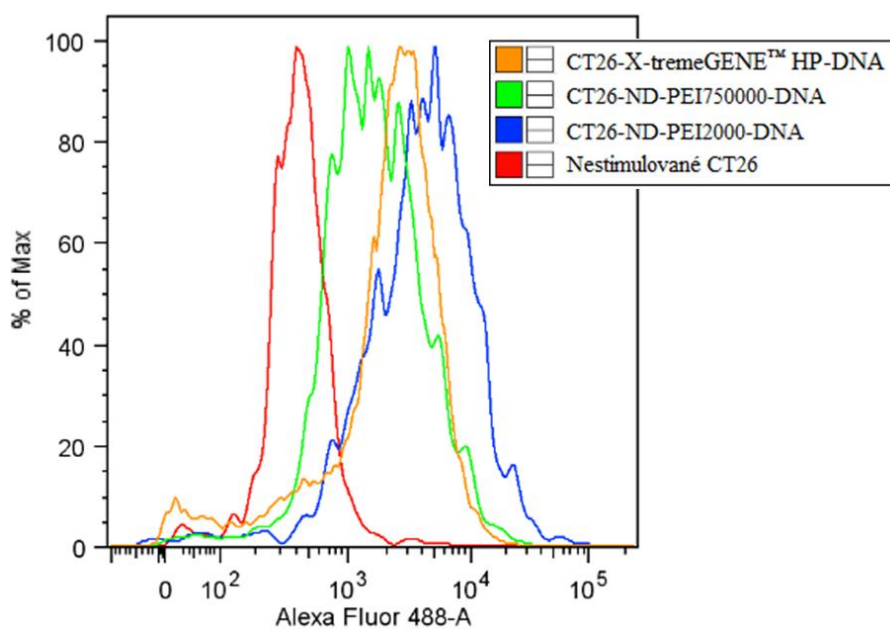
Analýza metodou průtokové cytometrie (FACS) byla provedena na přístroji BD LSR II. Hodnocena byla účinnost internalizace komplexů ND-PEI2k-DNA a ND-PEI750k-DNA do buněk CT26. Jako pozitivní kontrola bylo použito komerčně dostupné transfekční činidlo X-tremeGENE™ HP, za negativní kontrolu byla brána suspenze nestimulovaných buněk. DNA byla označena fluoroforem AlexaFluor 488 (excitace při 488 nm) a jádra buněk fluorescenčním barvivem Hoechst 33258 (405 nm). Stimulace buněk probíhala po dobu 120 min.

Výsledky analýzy účinnosti transfekce metodou průtokové cytometri jsou prezentovány grafem na *Obr.46*. Ve srovnání s kontrolním vzorkem nestimulovaných buněk je patrný posun intenzity fluorescence AlexaFluor 488 u všech použitých typů nosičů DNA. Nejvyšší intenzita byla zaznamenána pro komplex ND-PEI2000. Procentuální zastoupení buněk s pozitivní signálem z AlexaFluor 488 je uvedeno v *Tab.6*. U komplexů ND-PEI2000-DNA byl signál detekován u 66 % buněk, u komplexů ND-PEI750000-DNA to bylo o něco méně (55%).



Tab.6: procentuální zastoupení buněk CT26 s pozitivní signálem z AlexaFluor 488 pro použité typy DNA nosičů

Typ nosiče DNA	Buňky s pozitivním signálem (AlexaFluor 488) [%]
ND-PEI2000	66
ND-PEI750000	55
X-tremeGENE™ HP	70
-	0



Obr.46: Graf znázorňující intenzitu fluorescence AlexaFluor 488 pro vzorky: CT26-NDPEI750k-DNA (zelená), CT26-NDPEI2k-DNA (modrá), CT26- X-tremeGENE™ HP-DNA (oranžová) a nestimulované CT26 (červená)

## 7 Diskuze

Cílem této práce bylo najít vhodnou metodu vizualizace diamantových nanočástic vbuněčných vzorcích pomocí fluorescenční mikroskopie (konkrétně použitím techniky FLIM) a následně charakterizovat účinnost pronikání nanočástic s odlišnou povrchovou funkcionalizací do různých typů buněk. Použity byly samotné nanočástice s oxidovaným povrchem, částice s navázaným PEI2000/750000 a s navázaným PEI2000/750000-DNA. Jako buněčné vzorky byly vybrány tři typy linií: CT26 (karcinom tlustého střeva) jako zástupce nádorové buněčné line, 3T3 (embryonální fibroblasty) a IC-21(makrofágy) především díky své přirozené schopnosti fagocytovat látky z okolního prostředí.

- *Pro úspěšné zhodnocení vlivu funkcionalizace diamantových nanočástic (ND) na jejich schopnost pronikat do buňky, je nutné diskutovat následující parametry a vlastnosti metod použitých k zobrazování:*

### 1. Úspěšnost navázání polymeru PEI a DNA na ND

Po navázání kationického polymeru na povrch diamantové nanočástice lze předpokládat změnu zeta potenciálu do kladných hodnot, následným navázáním DNA dochází k částečné kompenzaci tohoto náboje a posunu zpět směrem k hodnotám záporným. Měřením ZP bylo u všech vzorků ověřeno úspěšné navázání PEI/DNA (Tab.5). V případě komplexu ND-PEI750000-DNA se naměřená hodnota hodnota ZP (-18,3 mV) nacházela hluboko pod hranicí stability. Množství DNA zřejmě nebylo dostačující pro kompenzaci kladného náboje polymeru o vysoké molekulové hmotnosti. Při použití dvojnásobné koncentrace DNA se hodnota ZP snížila jen nepatrně (-21,6 mV). Pro další experimenty je tedy nutné určit přesné množství DNA potřebné pro kompenzaci kladného náboje PEI.

### 2. Agregace ND a funkcionalizovaných ND ve vodě, v PBS a v buněčném médiu

Za koloidně stabilní je považována suspenze s hodnotou zeta potenciálu nižší než -30 mV nebo vyšší než +30 mV [53]. U analyzovaných vzorků byla naměřena hodnota ZP odpovídající stabilní suspenzi pouze v případě ND-PEI2000 (36 mV) a ND-PEI750k (38 mV). S tím korelují také jejich hydrodynamické průměry nepřesahující hodnotu 200 nm. Jak už bylo zmíněno výše, velmi nízký ZP (-18,3 mV) u komplexu ND-PEI750000-DNA vedl k vysoké míře agregace nanočástic s velikostí dosahující až 1,5  $\mu\text{m}$ . U ostatních vzorků byl naměřen ZP v rozmezí od -24 mV do -30 mV. Hodnoty nacházející se těsně pod hranicí stability mohou způsobit po určité době shlukování nanočástic. V některých publikacích jsou ovšem nanočástice vykazující takovou velikost ZP považovány za stabilní [68]. Po navázání PEI/DNA docházelo u komplexů analyzovaných v destilované vodě pouze k malému nárůstu hydrodynamického průměru. Výsledky prezentující velikost komplexů ND-PEI2000-DNA v ostatních roztocích odhalily podobně jako v [68], vysoký nárůst hydrodynamického průměru z 226 nm (voda) na 737 nm (PBS), 1250 nm (DMEM bez séra) a 1400 nm (DMEM se sérem) (Obr.22). Předpokládáme, že tato skutečnost je důsledkem vysoké iontové síly těchto roztoků. V konečném důsledku se zvyšuje mezičásticová interakce, která vede k jejich

zvýšené agregaci a sedimentaci.[70] V posledním případě mohou k nárůstu velikosti přispívat také sérové proteiny, které při pH 7,0 vykazují negativní náboj. DNA nemusí být na povrchu nanočástice s PEI distribuována rovnoměrně, mohou zde tedy stále existovat místa s pozitivním nábojem, které přitahují negativně nabitě proteiny. Některé studie uvádějí, že adsorpcí proteinů na povrch komplexů dochází k jejich stabilizaci a snadnější internalizaci [65]. Na základě našich experimentů nebyla tato skutečnost potvrzena. Názory na vliv proteinové korony na buněčné vychytávání nanočástic se v různých studiích liší. [71, 72] I přes prokazatelný vliv prostředí na shlukování částic mnohé studie uvádějí hodnoty ZP a hydrodynamického průměru nanočástic analyzovaných pouze ve vodě [3,27]. Z uvedených výsledků je ovšem patrné, že tato charakteristika je nedostačující.

### 3. Schopnost mikroskopu zobrazit jednotlivé nanočástice a odlišit je od jiných struktur v buňce

Maximum emisního spektra N-V center je přibližně v 680 nm, vlnové délky přirozeného fluorescenčního záření buňky nejsou jasně definovány, ale jejich maximum se nachází při nižších hodnotách (okolo 500 nm). Dá se tedy předpokládat, že použití emisních filtrů propouštějící záření nad 650 nm povede k snadnějšímu odlišení NDP od autofluorescence buňky. Z našich výsledků vyplývá, že zobrazování na základě emisního záření nepřináší dostatečně selektivní informaci a vede ke špatné interpretaci zobrazovaných skutečností. (Obr.23 a 24). Klasická fluorescenční konfokální mikroskopie je standardně používanou technikou pro zjištění účinnosti pronikání nanočástic do buněk. Nastavení parametrů pro měření touto metodou používaných v publikacích běžně zahrnuje snímání emisního záření od vlnových délek 500 nm [65,66,67]. To může vést ještě k výraznějšímu zkreslení výsledků způsobenému detekcí i jiných struktur než jsou fluorescenční NDP (autofluorescence některých buněčných složek či nečistot přítomných ve vzorku). Přesnější zhodnocení buněčné internalizace částic umožňuje metoda FLIM, díky které lze odlišit jednotlivé struktury ve vzorku na základě rozdílné doby dohasínání fluorescence prezentované barevnou škálou. Pro N-V centra diamantových částic se tato hodnota pohybuje v rozmezí od 10 do přibližně 20 ns, v porovnání s buňkami (1-4 ns) je tedy výrazně delší. (Obr.24)

Zobrazování v širším rozsahu (1x1mm) s rozlišením 1024x1024 px pomocí klasické fluorescenční konfokální mikroskopie, použité v této práci pro kvantitativní posouzení internalizace nanočástic, přináší řadu nepřesností. Kromě nevýhod uvedených výše je to především možnost zobrazovat pouze agregáty. Pro stanovené parametry rozsahu a rozlišení odpovídá jednomu obrazovému bodu plocha 950 nm<sup>2</sup>, při tomto nastavení tedy teoreticky nelze detekovat jednotlivé diamantové nanočástice.

### 4. Schopnost metody rozlišit nanočástice, které jsou v buňce a které pouze přilnuly na membránu

Druhým důležitým aspektem pro posouzení účinnosti internalizace nanočástic je jejich přesná lokalizace. Teoreticky vypočtená hodnota axiálního rozlišení objektivu použitého pro měření metodou FLIM je 689 nm (vztah (10)). Na základě tohoto zjištění by použité rozmezí (1-2 μm) mezi jednotlivými snímky mělo zamezit detekci nanočástic ve více fokálních

rovinách. Ve skutečnosti je signál z NDP nacházející se na povrchu buňky detekován i v nižším řezu, vzdáleném 2  $\mu\text{m}$  (Obr.26) Vlastnosti optických řezů z konfokálního mikroskopu vychází z charakteristického rozložení intenzity daného rozptylovou funkcí bodu, která je maximální v centru a směrem k okrajům klesá. Slabší signál z větších klastrů tak může být detekován i pod/nad rovinou, kde se nanočástice nachází. Mimoto může být axiální rozlišení ovlivněno aberacemi způsobenými prostředím buňky a použitím větší šterbiny (50  $\mu\text{m}$ ). Z uvedených důvodů je pro posouzení zda se částice nachází uvnitř nebo na povrchu buňky nutné snímání ve více fokálních rovinách. Pak lze považovat tuto metodu za vhodnou při kvalitativním hodnocení průniku nanočástic.

$$D_z = \frac{1,4n\lambda}{N.A.^2} = \frac{1,4 \cdot 1,33 \cdot 532}{1,2^2} = 689 \text{ nm} \quad (10)$$

Kde,  $D_z$  je axiální rozlišení a N.A. numerická aperture objektivu,  $n$  je index lomu imerzní tekutiny a  $\lambda$  je vlnová délka excitačního záření.

Hodnocení přítomnosti nanočástice uvnitř buňky u experimentu na klasickém konfokálním mikroskopu bylo založeno na zaostření na buněčné jádro (Obr.42 a 44). Snímek byl skenován v rovině s nejsilnějším signálem z jader (fluorofor Hoechst 33342). Rozložení buněk na sklíčku a jejich rozdílná tloušťka neumožňují přesné zaostření v celém rozsahu vzorku. Další nepřesnosti jsou způsobeny subjektivním posuzováním síly signálu. Tato metoda nám tak dává možnost získat obecnější přehled o chování nanočástic v buněčném vzorku, ale není zcela spolehlivá pro kvalitativní analýzu internalizace.

Zcela objektivní výsledky založené na analýze velkého počtu buněk poskytuje průtoková cytometrie (FACS). Průtoková cytometrie je ve studiích často využívanou technikou pro posouzení internalizace nanočástic [68,69]. Její velkou nevýhodou je, že do pozitivních výsledků jsou zahrnuty i signály z povrchu plazmatické membrány. Nelze tak rozlišit, zda se jedná o buňku s nanočásticemi přítomnými uvnitř cytoplazmy nebo pouze adherovanými na povrchu buňky. V našem experimentu nebyl fluorescenční signál detekován přímo z nanočástic, ale z DNA značené fluoroforem. Zbytky volného polymeru mohou vázat volné molekuly DNA, která tak pronikne do buňky i bez přítomnosti NDP. Během přípravy komplexů byly volné molekuly PEI důkladně odmyty, tato úvaha je tedy velmi nepravděpodobná.

Žádná z uvedených metod tak neumožňuje přesné kvalitativní posouzení internalizace. FLIM se sice zdá být vhodnou metodou pro kvalitativní posouzení, ale nelze jej aplikovat na větší počet buněk ze stejných důvodů jako je tomu u klasické konfokální mikroskopie. Nanočástice jsou internalizovány prostřednictvím endocytózy, bezprostředně po průniku do buňky se tedy nachází uvnitř endozomatických váček (*kapitola 4*). Spolehlivé určení počtu buněk s pohlcenými NDP tak může poskytnout metoda založená právě na kolokalizaci NDP s fluoroforem označenými endozomy [44, 45]. V dalších experimentech by tato metoda mohla

být užita jako referenční a její výsledky by tak bylo možné porovnat s výsledky klasické fluorescenční konfokální mikroskopie a průtokové cytometrie.

- *Pro samotnou účinnost průniku nanodiamantů do buněk jsme identifikovali vliv následujících faktorů:*

1. Velikost molekulové hmotnosti kationického polymeru a míra agregace nanočástic v buněčném médiu

Diamantové nanočástice byly funkcionalizovány kationickým polymerem polyethyleniminem s molekulovou hmotností 2000 Da a 750 000 Da, který by měl díky svému kladnému náboji umožnit navázání záporně nabitě sekvence DNA a zvýšit účinnost jejich průniku do buněk. Přičemž platí, že tato účinnost by se měla zvyšovat spolu s velikostí molekulové hmotností polymeru [3,59]. Na základě výsledků z klasické konfokální mikroskopie bylo zjištěno, že u buněk CT26 a 3T3 dochází k mírnému zvýšení efektivity internalizace u komplexů ND-PEI750000 (méně potom u komplexů ND-PEI2000) v porovnání s oxidovanými NDP. Pozorována byla změna procentuální zastoupení buněk s NDP z 25 % (ND) na 37 % (ND-PEI750000) a 34 % (ND-PEI2000) u CT26, u 3T3 potom z 16 % (ND) na 38 % (ND-PEI750000) a 22 % (ND-PEI2000) (*Obr.43 a 45*). Tyto hodnoty částečně korelují se stanovenou hypotézou. U komplexů s navázanou DNA byl pozorován dominantní výskyt velkých agregátů, který vedl zejména u CT26 k velmi nízké internalizaci. Z důvodů uvedených výše jsou ovšem tato zjištění brána pouze jako orientační. Opakovaná kontaminace při kultivaci kultury na MBÚ AV ČR neumožnila do experimentu zahrnout buňky IC-21.

Snímky získané metodou FLIM poukazují u buněk 3T3 a CT26 na mírné zvýšení pohlcených NDP u komplexů ND-PEI750000 (*Obr. 29 a 34*) v porovnání s oxidovanými ND a ND-PEI2000. Po navázání DNA dochází k agregaci. Výskyt těchto komplexů v buňkách CT26 (*Obr.30 a 31*) je velmi nízký, u 3T3 (*Obr.35 a 36*) a IC-21 (*Obr.40 a 41*) dochází k jejich shlukování na povrchu membrány a zvýšeném výskytu malých NDP v cytoplasmě. U buněk IC-21 byl naopak detekován nejnižší počet pohlcených nanočástic v případě ND-PEI75000 (*Obr.39*).

Metodou průtokové cytometrie byla provedena analýza transfekce ND-PEI2000/750000-DNA u buněk CT26 (*Obr.46*). Vyšší procento buněk (66%) s pozitivním výsledkem p bylo zjištěno u ND-PEI2000 (66%) v porovnání s komplexem ND-PEI750000 (55%). To ovšem může vypovídat spíše o zvýšené tendenci těchto komplexů k adsorbci na membránu.

Vliv navázaného polymeru na efektivitu internalizace nelze jednoznačně prokázat v důsledku zvýšené agregace těchto komplexů projevující se v prostředí buněčného média. Pro další experimenty je nutné metodu optimalizovat, tak aby k shlukování nanočástic nedocházelo. Příkladem může být použití jiné metody odmyváání volných molekul PEI

(odstředivá síla při centrifugaci podporuje agregaci). Nebo delší doba ultrazvukové sonikace při vyšším výkonu.

## 2. Typ buněčné linie

Nádorové buňky mají ve srovnání s buňkami zdravými rozdílné lipidové a proteinové složení plazmatické membrány [72]. Studie zabývající se internalizací NDP do nádorových a nenádorových buněk prokázala vyšší účinnost pronikání u buněk nádorových [43]. V této práci nebyl u buněk 3T3 a CT26 pozorován významný rozdíl v internalizaci oxidovaných NDP a NDP s navázaným polymerem. Viditelný rozdíl je ovšem v chování částic v buněčných vzorcích 3T3, které se ve velké míře koncentrují v těsné blízkosti buněčné membrány a to především u komplexů ND-PEI2000/750000-DNA (*Obr. 33 a 34*), kde zároveň dochází k vyšší internalizaci malých NDP. Nejvyšší účinnost průniku nanočástic byla dle očekávání pozorována u buněk IC-21, což je zřejmě dáno jejich přirozenou schopností fagocytovat. Zajímavé je chování komplexů ND-PEI2000-DNA (*Obr.38*), u kterých dochází k významnému shlukování v blízkosti buňky i přesto, že okolní částice zvýšenou agregací nevykazují.

## 8 Závěr

Tato práce byla věnována studiu interakce fluorescečních diamantových nanočástic s buňkami. Cílem práce bylo zhodnotit metody, které jsou nejčastěji využívány k vyhodnocování průniku nanočástic do buněk a tyto metody využít k vyhodnocení vlivu chemické funkcionalizace na schopnost nanočástic pronikat do buněk. Připraveny byly nanočástic s různou povrchovou funkcionalizací (oxidované NDP, s navázaným PEI2k/750k, s navázaným PEI2k/750k a DNA) a tři typy buněčných vzorků (CT26, 3T3, IC-21). Navázání PEI/DNA bylo ověřeno měřením zeta potenciálu. Účinnost internalizace byla analyzována pomocí fluorescenční konfokální mikroskopie (FLIM-fluorescence lifetime imaging, standardní měření). Pro porovnání byla hodnocena efektivita transfekce komplexů ND-PEI-DNA u buněčné linie CT26 metodou průtokové cytometrie (FACS).

Při porovnání vyjmenovaných metod měření, má každá technika své přednosti a své limity. Jedním ze závěrů práce je, že žádná z vyjmenovaných technik nám neposkytuje /nebo poskytuje pouze v limitované míře/ přesnou a kvantitativní informaci o tom, kolik nanočástic se dostalo do buňky nebo do kolika procent buněk se nanočástice internalizovaly. Technika FLIM založená na měření doby dohasínání fluorescence je metoda, která poskytuje jasný a dostačující kontrast mezi fluorescenčním pozadím způsobeným autofluorescencí buňky a fluorescence diamantových nanočástic. Při dostatečně jemném kroku skenování (který odpovídá dostatečnému rozlišení – reálné velikosti jednoho pixelu) je možné detekovat a odlišit jednotlivé nanočástice. Pro určení přesné lokalizace NDP je důležité snímání vzorku ve více fokálních rovinách vzdálených několik  $\mu\text{m}$  od sebe, abychom eliminovali falešně pozitivní signály z agregátů částic, které jsou mimo fokální rovinu. Metoda FLIM na přístroji MicroTime je tak vhodná k přesným měřením jednotlivých buněk. Neposkytuje ale informaci o chování buněčné kultury jako celku. Měření vzorků s použitím klasického konfokálního mikroskopu se snímáním větší plochy umožňuje analyzovat kulturu (větší počet buněk), limity v rozlišení při tomto typu snímání (velký rozsah skenu) ale neumožňuje detekci jednotlivých částic a přesnou lokalizaci nanočástice a lze obtížně odlišit nanočástice, které pouze ulpěly na membráně od nanočástic, které jsou internalizované v buňce. Zároveň může dojít k záměně struktur s podobnou vlnovou délkou fluorescenčního záření. Výsledky získané touto metodou jsou tak zkreslené falešně pozitivními vzorky. Průtoková cytometrie poskytuje objektivní informaci vycházející z analýzy velkého počtu buněk. Její nevýhodou je zahrnutí signálu z nanočástic nacházejících se uvnitř i na povrchu buňky a tyto výsledky jsou také zatíženy chybou. V práci je navržena metoda, která by tuto chybu kvantifikovala a mohla sloužit jako referenční.

Druhým cílem práce bylo vyhodnocení vlivu chemické funkcionalizace nanočástic na jejich internalizaci v buňkách. U buněk CT26 a 3T3 byla pozorována v porovnání s oxidovanými NDP nepatrně vyšší účinnost internalizace pro komplexy ND-PEI75000, méně pak pro ND-PEI2000. Po navázání DNA docházelo u všech buněk k agregaci a shlukování nanočástic v těsné blízkosti plazmatické membrány. Menší NDP byly lokalizovány uvnitř cytoplazmy. Výsledky z průtokové cytometrie ukazují vyšší míru transfekce u buněk CT26

pro ND-PEI2000-DNA (66%) oproti ND-PEI750000 (55%). To je zřejmě dáno tím, že komplexy ND-PEI2000-DNA se více koncentrují na povrchu buňky. Nejvyšší účinnost průniku u většiny tyoů NDP byla dle očekávání pozorována u fagocytujících buněk IC-21.

Obecně lze říci, že schopnost navázaného polymeru významně zvyšovat účinnost internalizace nebyla jednoznačně prokázána. To může být způsobeno například vysokou tendencí těchto komplexů agregovat v buněčném médiu. Jednou z možností, jak tento problém vyřešit, je optimalizovat přípravu komplexů tak, aby k shlukování částic nedocházelo.



# Reference

- [1] MOCHALIN, Vadym N., Olga SHENDEROVA, Dean HO a Yury GOGOTSI. The properties and applications of nanodiamonds. *Nature Nanotechnology*. 2011, **7**(1): 11-23. DOI: 10.1038/nnano.2011.209. ISSN 1748-3387. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nnano.2011.209>
- [2] SCHRAND, Amanda, Suzanne A. Ciftan HENS a Olga SHENDEROVA. *Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications*. DOI: 10.1080/10408430902831987. ISBN 10.1080/10408430902831987. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408430902831987>
- [3] ZHANG, Xue-Qing, Mark CHEN, Robert LAM, Xiaoyang XU, Eiji OSAWA a Dean HO. Polymer-Functionalized Nanodiamond Platforms as Vehicles for Gene Delivery. *ACS Nano* [online]. 2009, **3**(9), 2609-2616 DOI: 10.1021/nn900865g. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn900865g>
- [4] ANKE KRÜGER. *Carbon Materials and Nanotechnology*. 1. Aufl. Weinheim, Bergstr: WILEY-VCH, 2008. ISBN 9783527318032
- [5] BRADAC, Carlo. *The properties of notroge-vacancy center in nanodiamond*. Australia, 2012. Doctoral Thesis. Macquarie university.
- [6] Diamonds: How Do Diamonds Form? *Geology.com* [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: <http://geology.com/articles/diamonds-from-coal/>
- [7] CHOUDHARY, Devashish a Jayesh BELLARE. Manufacture of gem quality diamonds: a review. *Ceramics International*. 2000, **26**(1): 73-85. DOI: 10.1016/S0272-8842(99)00022-X. ISSN 02728842. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027288429900022X>
- [8] PETRÁKOVÁ, Vladimíra. *Interactions of nitrogen-vacancy centers with charged surfaces of functionalized nanodiamond particles for the detection of cellular processes*. Kladno, 2012. Disertační práce. ČVUT, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky
- [9] Synthetic diamonds. *International Diamond Laboratories diamond* [online]. Dostupné z: <http://www.diamondlab.org/>
- [10] WTOCD - Fundamenteel Onderzoek [online]. [vid. 2012-02-02]. Dostupné z: [http://www.hrdresearch.be/nl/Fundamental/fundamental\\_research.html](http://www.hrdresearch.be/nl/Fundamental/fundamental_research.html)
- [11] BADEA, Ildiko a Randeep KAUR. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems. *International Journal of Nanomedicine*. : 203-. DOI: 10.2147/IJN.S37348. ISSN 1178-2013. Dostupné také z:

<http://www.dovepress.com/nanodiamonds-as-novel-nanomaterials-for-biomedical-applications-drug-d-peer-reviewed-article-IJN>

[12] WILLIAMS, Oliver. *Nanodiamond*. Royal Society of Chemistry, 2014. ISBN 1849736391

[13] VAIJAYANTHIMALA, V a H-C CHANG. *Functionalized fluorescent nanodiamonds for biomedical applications*. DOI: 10.2217/17435889.4.1.47. ISBN 10.2217/17435889.4.1.47. Dostupné také z: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/17435889.4.1.47>

[14] CÍGLER, Petr a Jitka ŠLEGEROVÁ. Nanodiamanty- fluorescenční a zobrazovací nanosondy. *Chemické listy*. 2014.

[15] ZHU, Ying, Jing LI, Wenxin LI, Yu ZHANG, Xiaofeng YANG, Nan CHEN, Yanhong SUN, Yun ZHAO, Chunhai FAN, et al. *The Biocompatibility of Nanodiamonds and Their Application in Drug Delivery Systems*. DOI: 10.7150/thno.3627. ISBN 10.7150/thno.3627. Dostupné také z: <http://www.thno.org/v02p0302.htm>

[16] PUZYR, A.P., A.V. BARON, K.V. PURTOV, E.V. BORTNIKOV, N.N. SKOBELEV, O.A. MOGILNAYA a V.S. BONDAR. *Nanodiamonds with novel properties: A biological study*. DOI: 10.1016/j.diamond.2007.07.025. ISBN 10.1016/j.diamond.2007.07.025. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925963507003160>

[17] PETRÁKOVÁ, Vladimíra, Andrew TAYLOR, Irena KRATOCHVÍLOVÁ, et al. Luminescence of Nanodiamond Driven by Atomic Functionalization: Towards Novel Detection Principles. *Advanced Functional Materials*[online]. 2012, **22**(4), 812-819. DOI: 10.1002/adfm.201101936. ISSN 1616301x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adfm.201101936>

[18] SHENDEROVA, Olga A. *Fluorescent nanodiamond particles containing color centers: Properties and Applications* [online]. Adámas Nanotechnologies . Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/technology-spotlights/fluorescent-nanodiamond-particles.html>

[19] BAR-GILL, N., L.M. PHAM, C. BELTHANGADY, D. LE SAGE, P. CAPPELLARO, J.R. MAZE, M.D. LUKIN, A. YACOBY a R. WALSWORTH. *Suppression of spin-bath dynamics for improved coherence of multi-spin-qubit systems*. DOI: 10.1038/ncomms1856. ISBN 10.1038/ncomms1856. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms1856>

[20] HAVLIK, Jan, Vladimira PETRAKOVA, Ivan REHOR, et al. Boosting nanodiamond fluorescence: towards development of brighter probes. *Nanoscale* [online]. 2013, **5**(8), DOI: 10.1039/c2nr32778c. ISSN 2040-3364. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2nr32778c>

- [21] BARNARD, Amanda S., L.M. PHAM, C. BELTHANGADY, D. LE SAGE, P. CAPPELLARO, J.R. MAZE, M.D. LUKIN, A. YACOBY a R. WALSWORTH. *Diamond standard in diagnostics: nanodiamond biolabels make their mark*. DOI: 10.1039/b908532g. ISBN 10.1039/b908532g. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b908532g>
- [22] HUANG, Houjin, Erik PIERSTORFF, Eiji OSAWA, Dean HO, Robin L. GARRELL, Shabnam TORBATI, Siobhan S. F. FREITAS, Gan-Moog CHOW a R. WALSWORTH. *Active Nanodiamond Hydrogels for Chemotherapeutic Delivery: nanodiamond biolabels make their mark*. DOI: 10.1021/nl071521o. ISBN 10.1021/nl071521o. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl071521o>
- [23] EL-SAY, Khalid Mohamed. *Nanodiamond as a drug delivery system: Applications and prospective*[online]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2011. ISSN 2231-3354. Dostupné také z: [http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/120\\_pdf.pdf](http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/120_pdf.pdf)
- [24] MANSOORI, Behzad, Siamak Sandoghchian SHOTORBANI a Behzad BARADARAN. *RNA Interference and its Role in Cancer Therapy* [online]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2014 [cit. 2016-04-08]. DOI: 10.5681/apb.2014.046.
- [25] ALHADDAD, Anna, Marie-Pierre ADAM, Jacques BOTSOA, et al. Nanodiamond as a Vector for siRNA Delivery to Ewing Sarcoma Cells. *Small* [online]. 2011, **7**(21), 3087-3095. DOI: 10.1002/sml.201101193. ISSN 16136810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.201101193>
- [26] LI, Ying, Wylie STROBERG, Tae-Rin LEE, Han Sung KIM, Han MAN, Dean HO, Paolo DECUZZI a Wing Kam LIU. Multiscale modeling and uncertainty quantification in nanoparticle-mediated drug/gene delivery. *Computational Mechanics* [online]. 2014, **53**(3), 511-537. DOI: 10.1007/s00466-013-0953-5. ISSN 0178-7675. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00466-013-0953-5>
- [27] CHEN, Mark, Xue-Qing ZHANG, Han B. MAN, Robert LAM, Edward K. CHOW a Dean HO. *Nanodiamond Vectors Functionalized with Polyethylenimine for siRNA Delivery* [online]. 2010. DOI: 10.1021/jz1013278.
- [28] JOSEPH R. LAKOWICZ. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 9780387463124.
- [29] BEREZIN, Mikhail Y. a Samuel ACHILEFU. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews* [online]. 2010, **110**(5), 2641-2684. DOI: 10.1021/cr900343z. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr900343z>
- [30] BORST, Jan Willem a Antonie J W G VISSER. Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences. *Measurement Science and Technology* [online]. 2010, **21**(10), 102002-. DOI: 10.1088/0957-0233/21/10/102002. ISSN 0957-0233. Dostupné z:

<http://stacks.iop.org/0957-0233/21/i=10/a=102002?key=crossref.ec7427511a63a7d4629b41599a2815b4>

- [31] WAHL, Michael a Sandra ORTHAUS-MÜLLER. *Time Tagged Time-Resolved Fluorescence Data Collection in Life Sciences*. PicoQuant GmbH, 2014.
- [32] KRÄMER, B., F. KOBERLING, U. ORTMANN, M. WAHL, P. KAPUSTA, A. BÜLTER a R. ERDMANN. *Time-resolved Laser Scanning Microscopy with FLIM and advancedFCS capability* [online]. Německo: PicoQuant GmbH, 2014
- [33] FESTY, Frederic, Simon M. AMEER-BEG, Tony NG a Klaus SUHLING. Imaging proteins in vivo using fluorescence lifetime microscopy. *Molecular BioSystems* [online]. 2007, **3**(6), 381- .DOI: 10.1039/b617204k. ISSN 1742-206x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b617204k>
- [34] PELANT, Ivan a Jan VALENTA. *Luminiscenční spektroskopie*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1447-0.
- [35] *MicroTime 200*. Germany: PicoQuant GmbH, 2015. Dostupné také z: [https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/microtime200\\_brochure.pdf](https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/microtime200_brochure.pdf)
- [36] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2004. ISBN 80-902906-2-0.
- [37] NEČAS, Oldřich. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., V nakl. H & H 1. vyd. Jinočany: H & H, 2000. ISBN 80-86022-46-3.
- [38] GEOFFREY M. COOPER. *The cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington (DC): ASM Press, 2000. ISBN 0878931066.
- [39] LODISH, Harvey F. *Molecular cell biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1999. ISBN 0-7167-3136-3.
- [40] NABI, Ivan R. a Phuong U. LE. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2003, **161**(4), 673-677 . DOI: 10.1083/jcb.200302028. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200302028>
- [41] CONNER, Sean D. a Sandra L. SCHMID. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* [online]. 2003-3-6, **422**(6927), 37-44 . DOI: 10.1038/nature01451. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature01451>
- [42] Alhaddad A, Durieu C, Dantelle G, Le Cam E, Malvy C, et al. (2012) *Influence of the Internalization Pathway on the Efficacy of siRNA Delivery by Cationic Fluorescent Nanodiamonds in the Ewing Sarcoma Cell Model*. PLoS ONE 7(12): e52207. doi:10.1371/journal.pone.0052207
- [43] PEREVEDENTSEVA, E., S.-F. HONG, K.-J. HUANG, I.-T. CHIANG, C.-Y. LEE, Y.-T. TSENG a C.-L. CHENG. Nanodiamond internalization in cells and the cell uptake mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2013, **15**(8), DOI: 10.1007/s11051-

013-1834-8. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-013-1834-8>

[44] FAKLARIS, Orestis, Vandana JOSHI, Theano IRINOPOULOU, et al. Photoluminescent Diamond Nanoparticles for Cell Labeling: Study of the Uptake Mechanism in Mammalian Cells. *ACS Nano* [online]. 2009,3(12), 3955-3962 . DOI: 10.1021/nn901014j. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn901014j>

[45] CHU, Zhiqin, Kaikei MIU, Pingsai LUNG, Silu ZHANG, Saisai ZHAO, Huan-Cheng CHANG, Ge LIN a Quan LI. Rapid endosomal escape of prickly nanodiamonds: implications for gene delivery. *Scientific Reports* [online]. 2015-6-30, 5, 11661. DOI: 10.1038/srep11661. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep11661>

[46] CHU, Zhiqin, Silu ZHANG, Bokai ZHANG, et al. Unambiguous observation of shape effects on cellular fate of nanoparticles. *Scientific Reports* [online]. 2014-3-28, 4, DOI: 10.1038/srep04495. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep04495>

[47] LIANG, Wanling a Jenny K. W. LAM. Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems. *Molecular Regulation of Endocytosis* [online]. InTech, 2012 DOI: 10.5772/46006. ISBN 978-953-51-0662-3. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/molecular-regulation-of-endocytosis/endosomal-escape-pathways-for-non-viral-nucleic-acid-delivery-systems>

[48] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ a Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. In: *Chemické listy* [online]. 2014, s. 479-482. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_05\\_479-482.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf)

[49] KULIKOV, K. G. a T. V. KOSHLAN. Measurement of sizes of colloid particles using dynamic light scattering. *Technical Physics* [online]. 2015, 60(12), 1758-1764 DOI: 10.1134/S1063784215120099. ISSN 1063-7842. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1063784215120099>

[50] THE TATON GROUP. *Size Theory: Chapter 14: Zetasizer nano series* [online]. In: . University of Minnesota . Dostupné z: <http://www.chem.umn.edu/groups/taton/chem4223/Labs/Zetasizer%20Intro.pdf>

[51] FERRARI, Mauro. *BioMEMS and biomedical nanotechnology*. New York: Springer, c2006. ISBN 0387255664

[52] Olson, E. (2012). Zeta potential and colloid chemistry. *Journal of GXP Compliance*,16(1), 81-96. Retrieved from <http://ezproxy.techlib.cz/login?url=http://search.proquest.com/docview/926821160?accountid=119841>

[53] Zeta potenciál zeta [online]. Dostupné z WWW:<http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>

[55] KASZUBA, M., J. CORBETT, F. M. WATSON a A. JONES. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the*

*Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 2010,**368**(1927), 4439-4451. DOI: 10.1098/rsta.2010.0175. ISSN 1364-503x. Dostupné z: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2010.0175>

[56] TUCKER, I.M., J.C.W. CORBETT, J. FATKIN, R.O. JACK, M. KASZUBA, B. MACCREATH a F. MCNEIL-WATSON. Laser Doppler Electrophoresis applied to colloids and surfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2015, **20**(4), 215-226. DOI: 10.1016/j.cocis.2015.07.001. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029415000369>

[57] *ZETASIZER NANO Series*. UK: Malvern. Dostupné také z: <http://www.malvern.com/Assets/MRK1839.pdf>

[59] BEANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLIČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. In: *Chemické listy* [online]. Asociace českých chemických společností, 2009 ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_02\\_125-129.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf)

[58] ADAN, Aysun, Günel ALIZADA, Yağmur KIRAZ, Yusuf BARAN a Ayten NALBANT. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2016, , 1-14 . DOI: 10.3109/07388551.2015.1128876. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2015.1128876>

[59] FISCHER, Dagmar, Thorsten BIEBER, Youxin LI, Hans-Peter ELSÄSSER a Thomas KISSEL. A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity *Pharmaceutical Research* [online]. 16(8), 1273-1279. DOI: 10.1023/A:1014861900478. ISSN 07248741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1014861900478>

[60] HIELSCHER, Thomas. *ULTRASONIC PRODUCTION OF NANO-SIZE DISPERSIONS AND EMULSIONS* [online]. Paris, France: Dr. Hielscher GmbH, 2005 [cit. 2016-04-17]

[61] NEUHÖFEROVÁ, Eva. *Monitoring of RNA interference by luminiscent nanoparticles*. Kladno, 2015. Diplomová práce. ČVUT. Vedoucí práce RNDr. Veronika Benson, Ph.D.

[62] A trend towards automated cell counting. *Public Health England* [online]. Dostupné z: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/>

[63] KUO, Yung, Tsung-Yuan HSU, Yi-Chun WU a Huan-Cheng CHANG. Fluorescent nanodiamond as a probe for the intercellular transport of proteins in vivo. *Biomaterials* [online]. 2013, **34**(33),. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.043. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213008417>

[64] KUO, Yung, Tsung-Yuan HSU, Yi-Chun WU, et al. *Fluorescence lifetime imaging microscopy of nanodiamonds in vivo* [online]. In: . s. 863503. DOI: 10.1117/12.2004494. Dostupné z: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2004494>

- [65] BADEA, Ildiko, Saniya ALWANI, Randeep KAUR, Deborah MICHEL, Jackson M CHITANDA, Ronald VERRALL a Chithra KARUNAKARAN. Lysine-functionalized nanodiamonds as gene carriers: development of stable colloidal dispersion for in vitro cellular uptake studies and siRNA delivery application. *International Journal of Nanomedicine*[online], DOI: 10.2147/IJN.S92218. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/lysine-functionalized-nanodiamonds-as-gene-carriers-development-of-sta-peer-reviewed-article-IJN>
- [66] LIU, Kuang-Kai, Chi-Ching WANG, Chia-Liang CHENG a Jui-I. CHAO. Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells. *Biomaterials*[online]. 2009, **30**(26), DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.056. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209004682>
- [67] RYU, Tae-Kyung, Gyoung-Ja LEE, Chang-Kyu RHEE a Sung-Wook CHOI. Cellular Uptake Behavior of Doxorubicin-Conjugated Nanodiamond Clusters for Efficient Cancer Therapy. *Macromolecular Bioscience*[online]. 2015, **15**(10), 1469-1475 DOI: 10.1002/mabi.201500176. ISSN 16165187. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.201500176>
- [68] VAIJAYANTHIMALA, Vairakkannu, Yan-Kai TZENG, Huan-Cheng CHANG a Chung-Leung LI. The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake. *Nanotechnology* [online]. 2009, **20**(42), 425103]. DOI: 10.1088/0957-4484/20/42/425103. ISSN 0957-4484. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0957-4484/20/i=42/a=425103?key=crossref.cc2a8195fc1154056e7cc784d5cb80cb>
- [69] LI, Ying-qi a Xue-ping ZHOU. Transferrin-coupled fluorescence nanodiamonds as targeting intracellular transporters: An investigation of the uptake mechanism. *Diamond and Related Materials* [online]. 2010, **19**(10), 1163-1167 DOI: 10.1016/j.diamond.2010.05.003. ISSN 09259635. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925963510001792>
- [70] VESARATCHANON, Sudaporn, Alex NIKOLOV a Darsh T. WASAN. Sedimentation in nano-colloidal dispersions: Effects of collective interactions and particle charge. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2007, **134-135**, 268-278 [cit. 2016-05-16]. DOI: 10.1016/j.cis.2007.04.026. ISSN 00018686. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000186860700084X>
- [71] TREUEL, Lennart, Stefan BRANDHOLT, Pauline MAFFRE, Sarah WIEGELE, Li SHANG a G. Ulrich NIENHAUS. Impact of Protein Modification on the Protein Corona on Nanoparticles and Nanoparticle–Cell Interactions. *ACS Nano* [online]. 2014, **8**(1), 503-513 [cit. 2016-05-16]. DOI: 10.1021/nn405019v. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn405019v>
- [72] LU, Naihao, Jiayu LI, Rong TIAN a Yi-Yuan PENG. Binding of Human Serum Albumin to Single-Walled Carbon Nanotubes Activated Neutrophils to Increase Production of Hypochlorous Acid, the Oxidant Capable of Degrading Nanotubes. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2014, **27**(6), 1070-1077 [cit. 2016-05-16]. DOI: 10.1021/tx5001317. ISSN 0893-228x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx5001317>

[73] KOJIMA, Kiyohide. *Molecular aspects of the plasma membrane in tumor cells* [online]. Japan: Nagoya University School of Medicine, 1993, , 1-18. Dostupné z: [http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya\\_j\\_med\\_sci/5614/NJ560101001.pdf](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/5614/NJ560101001.pdf)