



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská



Vliv nanočástic na živé buňky

Bakalářská práce

Autor: **Michaela Crhánová**
Vedoucí práce: **Ing. Barbora Nežilová**
Konzultant: **doc. Ing. Václav Čuba Ph.D.**
Akademický rok: 2020/2021

- Zadání práce -

- Zadání práce (zadní strana) -

Poděkování:

Chtěla bych zde poděkovat především své vedoucí Ing. Barboře Nežilové, za pečlivost, ochotu a vstřícnost při vedení mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. Ing. Václavu Čubovi Ph.D. za poskytnutou pomoc s vypracováním této práce.

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechnu použitou literaturu.

V Praze dne 30. července 2021

Michaela Crhánová

Název práce:

Vliv nanočástic na živé buňky

Autor: Michaela Crhánová

Obor: Jaderná chemie

Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Barbora Neužilová

Konzultant: doc. Ing. Václav Čuba, Ph.D.

Abstrakt: Cílem této studie bylo zkoumat toxicitu nanočástic ZnO:Ga vůči bakterii *Escherichia coli* DBM 3125 a její závislost na velikosti nanočástic. V této studii byly použity nanočástice s velikostí krystalitů 7, 15, 33, 74 a 290 nm. (Velikost jejich krystalitů byla měřena pomocí rentgenové difrakce.) Bakterie byly vystaveny nanočásticím po dobu 0,5; 1; 2; 3 a 4 h. Toxicita nanočástic byla vyhodnocena na základě poklesu frakce přeživších buněk v čase v porovnání s poklesem frakce přeživších buněk nevystavených nanočásticím. Frakce přeživších buněk byla vypočítána jako poměr počtu buněk v čase t ku počtu buněk v čase 0,5 h. Frakce přeživších buněk vystavených nanočásticím klesala s časem. Na druhou stranu frakce přeživších buněk nevystavených nanočásticím se v čase téměř neměnila. To naznačuje, že nanočástice ZnO:Ga jsou toxické vůči *Escherichia coli* DBM 3125. Toxicita nanočástic ZnO:Ga mírně rostla s rostoucí velikostí krystalitů nanočástic.

Klíčová slova: bakterie, nanočástice, velikost nanočástic, toxicita

Title:

Influence of nanoparticles on living cells

Author: Michaela Crhánová

Abstract: The aim of this paper was to research toxicity of nanoparticles ZnO:Ga against *Escherichia coli* DBM 3125 and its dependency on size of those nanoparticles. Nanoparticles with crystallites sizes 7, 15, 33, 74 and 290 nm were used. Size of those crystallites was measured by X-ray diffraction. Bacteria were exposed to nanoparticles for durations of 0.5; 1; 2; 3 and 4h. Fraction of surviving cells was calculated as ratio of cell count in time t since exposure to nanoparticles to cell count at 0,5h. Toxicity of the nanoparticles was rated on basis of surviving cells in time t compared to the fraction of surviving cells not exposed to the nanoparticles. Fraction of surviving cells exposed to nanoparticles decreased with time. Fraction of cells not exposed to nanoparticles remained largely unchanged with time. This implies that nanoparticles of ZnO:Ga are toxic to *Escherichia coli* DBM 3125. Toxicity of nanoparticles ZnO:Ga slightly increased with the increase of crystallite nanoparticle size.

Key words: bacteria, nanoparticles, size of nanoparticles, toxicity

Obsah

Úvod	10
1 Teoretická část	12
1.1 Nanočástice	12
1.1.1 Vlastnosti nanočástic	12
1.1.2 Využití nanočástic	14
1.2 Buňky	15
1.2.1 Struktura eukaryotické buňky	16
1.2.2 Buněčný cyklus	18
1.2.3 Buněčná smrt	18
1.2.4 Měření cytotoxicity u eukaryotických buněk	18
1.2.5 Bakterie	19
1.3 Vliv nanočástic na buňky	22
1.3.1 Kvantové tečky	22
1.3.2 Zlaté nanočástice	24
1.3.3 Nanočástice ZnO	26
1.3.4 Nanočástice kovových oxidů	29
2 Praktická část	32
2.1 Použité mikroorganismy a chemikálie	32
2.2 Sterilizace	32
2.3 Příprava vzorků, provedení experimentu a kultivace	33
2.4 Vyhodnocení experimentálních dat	36
2.5 Rentgenová difrakce (XRD)	38
3 Výsledky a diskuze	41
3.1 Rentgenová difrakční analýza XRD	41
3.2 Toxicita	43
4 Závěr	51
Literatura	52

Seznam použitého značení

Veličiny

c_n	koncentrace nanočástic
$n_{c_n, T, t}$	počet buněk vystavených nanočásticím ZnO:Ga žíhaných při teplotě T , o koncentraci c_n po dobu t
S	frakce přeživších buněk vystavených nanočásticím ZnO:Ga žíhaných při teplotě T , o koncentraci c_n po dobu t
T	teplota při které byly nanočástice žíhány
t	čas po který byly buňky vystaveny nanočásticím

Zkratky

CdSe/ZnS	CdSe uzavřené v 1-2 monovrstvách ZnS
CTAB	cetylmonium bromid
ECM	extracelulární matrice
HUVEC	epitelové buňky z pupeční žíly
MDA	malondialdehyd
MPA	kyselina 3- merkaptopropionová
PEG-silan	křemičitan s polyetylenovými skupinami
phos-silan	křemičitan s fosfanátovými skupinami
ROS	reaktivní kyslíkové spíše
TPPMS	trifenyfosfin monosulfonát
TPPTS	trifenyfosfan-3,3',3''-trisulfonát

Úvod

Nanočástice jsou částice, které jsou menší než 100 nm. Nanočástice vykazují odlišné vlastnosti od objemového materiálu. Nanočástice díky tomu našly v poslední době uplatnění v široké oblasti lidské činnosti, například v elektrotechnice, kosmetice a stavebních materiálech. Nanočástice se též začínají stále více uplatňovat v medicíně. Zde se využívají k diagnostickým účelům, například nahrazení fluorofosforů v kvalitativních analýzách různých biologických sloučenin jako DNA nebo peptidy, ke značení buněk a jejich studiu. Nanočástice se též mohou využít k léčebným účelům (například léčbě rakoviny). Nanočástice mohou být použity jako nosiče účinné látky do zasažené tkáně. Superparamagnetické nanočástice mohou být použity k léčbě rakoviny pomocí hypertermie. U fulerenu, TiO_2 a ZnO nanočástic se uvažuje o jejich použití pro fotodynamickou terapii (PDT) jako fotosenzibilizátory (PS). Jedná se o látky, které po ozáření viditelným světlem nebo UV zářením produkují singletový kyslík, který je vysoce reaktivní a zabíjí nádorové buňky. Bohužel viditelné světlo neproniká hluboko do tkáně, a tak se uvažuje o využití scintilačních nebo luminiscenčních nanočástic (například ZnO) jako zdroje světla pro organické fotosenzibilizátory. Díky jejich širokému rozsahu využití v mnoha oblastech lidské činnosti včetně medicíny je důležité zjistit, zda jsou nanočástice toxické a nepředstavují zdravotní riziko pro lidi a prostředí.

V této práci byla zkoumána toxicita oxidu zinečnatého dopovaného galiem ZnO:Ga . Jako modelový organismus byla zvolena bakterie *Escherichia coli*. U ZnO byla pozorována toxicita jak vůči bakteriím, tak různým organickým buňkám. Studie se rozcházejí v tom, zda toxicita ZnO nanočástic závisí na jejich velikosti či nikoliv. Z tohoto důvodu v této práci byly přezkoumány nanočástice ZnO:Ga o různých velikostech. Jednalo se o nanočástice při výrobě žíhané při teplotě 200, 400, 600, 800 a 1000 °C. Jejich velikost byla změřena pomocí rentgenové difrakce (XRD).

1 Teoretická část

1.1 Nanočástice

Nanočásticemi se rozumí částice o velikosti menší 100 nm. U těchto částic se vyskytují jiné vlastnosti než v makroskopických objektech ze stejného materiálu. Existuje velké množství různých druhů nanočástic o různém chemickém složení, a o různých morfologiích (např. sférické nanočástice, nanotyčinky). Nanočástice lze rozdělit na anorganické a organické. Mezi anorganické nanočástice patří např.:

- kovové nanočástice např. ze zlata nebo stříbra.
- uhlíkové nanočástice, jako např. fulereny a uhlíkové nanotrubičky. Fulereny mají tvar duté globulární klece skládající se z pentagonálních a hexagonálních uhlíkových jednotek. Uhlíkové nanotrubičky si lze představit jako srolovaný grafitový plát. Uhlíkové nanotrubičky se mohou dále rozdělit dle počtu grafitových vrstev (jednotěnné, dvoustěnné a mnohostěnné). [1]
- nanočástice z kovových oxidů. Jedná se například o superparamagnetické nanočástice oxidu železa SPION, CuO, MgO, ZnO₂, TiO₂ a nanočástice na bázi oxidu křemičitého. Ty zahrnují mezopórní nanočástice oxidu křemičitého, ORMOSILOvé (Organically Modified Silica) nanočástice.[2]
- kvantové tečky (quantum dots- Qd). Nazývají se tak krystalické polovodičové nanočástice o průměru menším než 10 nm. Kvantové tečky jsou nejčastěji vyrobeny z CdSe nebo CdTe. Jádro z tohoto materiálu může být dále obaleno ZnS slupkou.[3]
- nanokrystaly dopované ionty vzácných zemin, příklad LaF₃:Tb³⁺ nebo NaYF₄. [2]

Organické nanočástice mohou být vyrobeny z polymerů, například poly(mléčná-co-glykolová kyselina) (PLGA), nebo se může jednat o liposomy. To jsou nanočástice tvořené lipidovými dvojvrstvami, které obklopují vodný vnitřek. [4]

Povrch anorganických nanočástic dále může být modifikován například pomocí navázání polymerů nebo povrchově aktivních látek obsahující thiolovou skupinu, adsorpcí nabitých povrchově aktivních látek nebo ligandů nebo připojením biologických molekul, např. DNA, peptidy, proteiny, antigeny. Modifikace povrchu slouží ke změně vlastností nanočástic, například k zamezení agregace, změně biokompatibility atd.[6]

1.1.1 Vlastnosti nanočástic

Nanočástice vykazují unikátní vlastnosti, které se nevyskytují u makroskopických částic stejného materiálu. U nanočástic je též často pozorována závislost jejich vlastností na velikosti. Tyto vlastnosti

pramení z toho že značná část atomů se vyskytuje na povrchu nanočástic. Vlastnosti nanočástic jsou tedy více závislé na vlastnostech jejich povrchu. Povrch pevné látky vykazuje jiné vlastnosti, než její vnitřní struktura. Atomy v pevné látce jsou vázány vazbami s okolními atomy. Atomům na povrchu pevné látky chybí sousedící atomy, s kterými by byly schopny vytvořit vazbu. To má za následek zvýšení vazebné energie a zkrácení vazby mezi povrchovými atomy. Kohezní energie atomů na povrchu (rozdíl energie atomů v pevné a plynné fázi) je nižší než u atomů v objemu pevné látky. Tudíž energie objektů, které mají velký počet atomů na povrchu (nanočástice), je větší než energie objemového materiálu skládajícího se ze stejného počtu atomů, jako tyto objekty.[7]

Kromě povrchu mají na vlastnosti nanočástic vliv také kvantové jevy. Ty mají vliv zejména na optické vlastnosti polovodičových materiálů. K porozumění kvantových jevů je nutné nejdříve popsat elektronovou strukturu nekonečného krystalu. To lze učinit pomocí energetických pásů, vzniklých kombinací orbitalů jednotlivých atomů, ze kterých se krystal skládá. U polovodičů se jedná o valenční, vodivostní a zakázaný pás, který tvoří mezeru mezi předešlými dvěma pásy. Tento model lze použít pro finitní krystaly díky použití matematického triku periodických okrajových podmínek. To značí, že vlnová funkce na okrajích krystalu má vždy stejné hodnoty. Tím pádem se elektron na povrchu chová, jako by byl uvnitř krystalu a může se v krystalu volně pohybovat. Pokud elektron opustí krystal na jedné straně, tak se vrátí z druhé strany. Pokud je však velikost krystalu ve všech směrech menší než vlnová délka elektronu (tzv. kvantová tečka), dochází k porušení těchto podmínek a elektron se začíná chovat, jako kdyby byl uvězněn ve 3D potenciálové jámě. To má za následek rozložení energetických pásů na jednotlivé energetické hladiny a u polovodičů zvětšení zakázaného pásu. Šířka zakázaného pásu závisí na velikosti částice. Toto je podstata kvantových jevů.[9]

1.1.1.1 Mechanické vlastnosti a morfologické vlastnosti

V některých případech dochází ke změně krystalové struktury se změnou velikosti nanočástice. Například u BaTiO_3 nanočástic menších než 200 nm, byla pozorovaná s klesající velikostí změna v poměru krystalografických os.[8] Chování modulu pružnosti u nanočástic závisí na jejich materiálu. U kovových nanočástic byl pozorován vzrůst modulu pružnosti (veličina charakterizující pružnost materiálu) díky přítomnosti chyb v krystalické mřížce. Ten samý jev byl pozorován i u nanočástic z oxidu křemičitého. U nanočástic z polystyrenu byl zase pozorován pokles modulu pružnosti díky přítomnosti hydratovaných iontových funkčních skupin. U nanovláken stříbra a olova byl pozorován pokles modulu pružnosti s rostoucím průměrem nanovláken. Toto může být důsledek povrchového stresu a drsnosti povrchu.[10]

1.1.1.2 Termální a elektrické vlastnosti

S klesající velikostí nanočástic dochází k poklesu jejich teploty tání. Například u zlatých nanočástic začíná teplota tání klesat, pokud je jejich velikost menší než 20 nm. Při velikosti menší než 10 nm začíná klesat dramaticky. Při velikosti kolem 2 nm je teplota tání nižší už o více jak 500°C než u makroskopického zlata. [8].

I dielektrická konstanta nanočástic vykazuje závislost na jejich velikosti. U PbTiO_3 byl pozorován vzrůst dielektrické konstanty při velikosti nanočástic menší 20 nm. Na velikosti nanočástic též závisí Curieova teplota, teplota nad níž se feroelektrické materiály (materiály, které vykazují spontánní polarizaci) mění na paraelektrické (v přítomnosti vnějšího elektrického pole dochází k nelineární polarizaci v zá-

vislosti na intenzitě elektrického pole). U PbTiO_3 byl pozorován pokles Curieovi teploty při velikostech menších než 20- 30 nm.[8]

1.1.1.3 Magnetické vlastnosti

Jako většina vlastností i magnetické vlastnosti nanočástic závisí na velikosti. S klesající velikostí feromagnetických nanočástic (feromagnetické materiály jsou schopné být trvale magnetizované po vystavení magnetickému poli) dochází prvně k růstu jejich koercivity (intenzita vnějšího magnetického pole, která je nutná k demagnetizaci materiálu). Po dosažení určité kritické hodnoty se feromagnetické částice skládají pouze z jedné magnetické domény, tzn. že všechny magnetické momenty jsou uspořádány v jednom směru a částice vykazují permanentní magnetizaci. Při této velikosti je koercivita částice největší. Koercivita nanočástic s jejich klesající velikostí dále klesá k nule. Poté se nanočástice stanou superparamagnetické. U těchto nanočástic jsou termální fluktuace dost silné na to, aby demagnetizovaly předem saturované uspořádání, takže u nich není přítomna trvalá magnetizace. Tyto nanočástice vykazují silné paramagnetické vlastnosti - pokud jsou vystaveny vnějšímu elektrickému poli, dochází u nich k magnetické indukci.[12]

1.1.1.4 Optické vlastnosti

U polovodičů (kvantových teček) dochází vlivem absorpce světla k excitaci elektronu z valenčního pásu do vodivostního pásu za vzniku páru elektron-díra. Polovodiče tudíž nejsou schopny absorbovat světlo o energii menší, než odpovídá zakázanému pásmu. Jsou ale schopny absorbovat široké spektrum záření o vyšší energii než je energie zakázaného pásu. Jak již bylo výše zmíněno, velikost zakázaného pásu je závislá na velikosti kvantové tečky, takže i jejich absorpční spektrum je závislé na její velikosti. Relaxace excitovaného stavu u kvantových teček probíhá ve formě emise fotonu, jehož energie je závislá na velikosti nanočástice. Tudíž i emisní spektrum kvantových teček je závislé na jejich velikosti a má podobu úzkých Gaussových píků.[9]

Díky kvantovým jevům jsou nanočástice z křemíku a germania schopny emitovat světlo, i když větší částice křemíku toho schopné nejsou.[8]

U kovových částic se vyskytuje jen valenčně vodivostní pás, ve kterém se elektrony mohou volně pohybovat a tvoří tak elektronový plyn. Kolektivní oscilace těchto elektronů se nazývá povrchový plazmon. Vlivem absorpce světla dochází k excitaci plazmonu. V absorpčním spektru kovových nanočástic se vyskytuje pík odpovídající rezonanční frekvenci excitace povrchových plazmonů. Maximum tohoto píku není závislé na velikosti sférických částic, ale na dielektrické konstantě prostředí.[9, 13]

U nanočástic menších než vlnová délka světla lze zanedbat rozptyl světlem, a tudíž lze dosáhnout větší průhlednosti.[8]

1.1.2 Využití nanočástic

Nanočástice díky svým jedinečným mechanickým, optickým, magnetickým a elektronickým vlastnostem našly široké využití v mnoha oblastech, například medicína, elektronika a kosmetika.

Optické vlastnosti kvantových teček lze využít při výrobě LED a laserů. Optických vlastností ZnO a TiO_2 se též využívá při výrobě malířských barev.

Mechanické vlastnosti nanočástic lze využít například k výrobě lubrikantů a tvorbě nanokompozitů jejich zabudováním do kovové nebo polymerové matrice.[10]

V kosmetice jsou mnohé nanočástice součástí např. hydratačních přípravků, přípravků proti stárnutí a proti vráskám. Nanočástice v těchto přípravcích slouží k doručení aktivní látky do kůže. ZnO a TiO₂ se také využívají v opalovacích krémech jako ochrana proti UV záření.[14].

Nanočástice lze též použít pro environmentální účely. TiO₂ lze použít jako fotokatalyzátor pro degradaci organických znečišťujících látek a dezinfekci vody. Dále může být také sloužit k odstranění iontů těžkých kovů z vody díky jejich depozici na TiO₂ katalyzované UV zářením.[15].

1.1.2.1 Využití nanočástic v medicíně

V medicíně lze využít nanočástice jak k diagnostickým, tak léčebným (terapeutickým) účelům. Mohou být použity i k oběma účelům najednou.[4]

V terapii lze nanočástice využít pro cílený transport léčiv do rakovinové tkáně. Toho lze docílit pomocí navázání speciálního antigenu na povrch nanočástic. Ten je schopen vázat se na příslušný receptor. Cílí se takový receptor, který se vyskytuje v rakovinové tkáni ve větší míře než ve zdravé tkáni.[4]. Dále lze využít EPR (enhanced permeability a retention) efektu. Při něm jsou použity nanočástice o takové velikosti, kdy nejsou schopny projít cévní stěnou zdravé tkáně, ale stěnou v cévách rakovinové tkáně ano. K transportu léků se používají magnetické Fe₂O₃ nanočástice, liposomy a nanočástice z polymerů[4, 12]. Superparamagnetické nanočástice lze též využít k léčbě pomocí hypertermie. Tyto částice jsou vystaveny oscilujícímu magnetickému poli. V něm dochází ke střídavé změně magnetizace nanočástic z paralelní na antiparalelní a naopak. Kvůli tomu dochází k přenosu magnetické energie v podobě tepla na nanočástice. Zvýšení teploty vede ke smrti rakovinných buněk. [12]. U nanočástic, jako jsou fulereny, TiO₂ nebo ZnO, se uvažuje o jejich využití ve fotodynamické terapii. Tyto nanočástice lze použít jako fotosenzibilizátory. To jsou látky, které jsou schopné absorbovat světelné záření (nejčastěji v UV oblasti) a přenést energii tohoto záření na kyslík za vzniku singletového kyslíku. Ten je vysoce reaktivní a jeho přítomnost vede k poškození buňky. Nanočástice lze též použít jako zdroj záření k excitaci organických fotosenzibilizátorů. Nanočástice jsou excitovány pomocí rentgenového záření a následně emitují světlo v UV oblasti, které excituje organické fotosenzibilizátory.

K diagnostickým účelům se využívá magnetických a optických vlastností nanočástic. Superparamagnetické nanočástice mohou sloužit jako kontrastní látka pro magnetickou rezonanci a kvantové tečky lze použít k fluorescenčnímu zobrazování tkáně in vivo. Kvantové tečky lze taktéž použít pro zobrazování buněk in vitro a zkoumání buněčné motility (samovolného pohybu buněk). Dále jdou uplatnit při dlouhodobého zobrazování buněk, což umožňuje zkoumat jejich vývoj. Nanočástice je možné též použít k detekci DNA markerů, specifických pro patogeny různých nemocí a proteinů, jejichž nadměrná koncentrace může značit přítomnost infekce nebo rakoviny. Pro tyto účely lze použít zlaté nanočástice a kvantové tečky.[17, 18]

1.2 Buňky

V biologii se buňkou rozumí membránou obklopená jednotka, která obsahuje všechny láky potřebné k životu. Buňka může být samostatný organismus (bakterie, kvasinky) nebo být specializována na určitou funkci a být součástí většího organismu. Soubor buněk se stejnou funkcí tvoří tkáň. Čím je organismus složitější s tím z většího počtu druhů buněk se skládá. Savci se skládají až z 200 různých typů buněk.

Buňky můžeme rozdělit na eukaryotické a prokaryotické. Prokaryotické buňky neobsahují membránové organely, jako je mitochondrie, chloroplast, endoplazmatické retikulum, lysozom. U prokaryotických buněk není genetická informace uložena v jaderné membráně a vyskytuje se volně v cytoplazmě. Prokaryotické a eukaryotické buňky se dále liší strukturou lipidů, mechanismem exprese genetické informace (proces, kterým je v genu uložená informace převedena v reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci) a odpovědí na toxiny a antibiotika.[19]

1.2.1 Struktura eukaryotické buňky

Na povrchu eukaryotické buňky je cytoplazmatická membrána (rostlinné buňky mají ještě buněčnou stěnu). Vnitřek buňky je organizovaný do specializovaných kompartmentů - organel, obklopených membránou. Organely zahrnují jádro, mitochondrii, lysozom, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a u rostlinných buněk též chloroplast, ve kterém probíhá fotosyntéza - proces, při němž z CO_2 a vody vzniká glukóza za využití sluneční energie. Prostor mezi organelami se nazývá cytosol a obsahuje cytoskelet-soustavu vláknitých molekul zodpovědných za udržování tvaru buňky.

Cytoplazmatická membrána odděluje buňku od okolního prostředí. Jejím úkolem je transport živin do buňky a má zajistit, že se dovnitř buňky nedostanou nevyžádané látky. Membrána se skládá z lipidové dvojvrstvy tvořené fosfolipidy a steroly (např. cholesterol). Membrána kromě lipidů dále obsahuje proteiny. Ty mohou být volně asociované s membránou - periferní proteiny - nebo pevně zabudované do lipidové dvojvrstvy - integrální proteiny. Některé integrální proteiny slouží jako transportní kanály pro ionty a organické molekuly. Membrána má strukturu tekutého krystalu, kdy se lipidy mohou difuzí pohybovat v rámci lipidové dvojvrstvy. V rámci dvojvrstvy se též může pohybovat hodně proteinů, ale některé jsou pevně uchycené v membráně díky interakci s cytoskeletem.

Endoplazmatické retikulum je systém membránových cisteren (plochých váčků), které prostupují celou cytoplazmou. Retikulum tvoří víc jak polovinu buněčné membrány. Existují dva typy endoplazmatického retikula - hladké a hrubé. Hladké endoplazmatické retikulum je složené ze sítě tubulárních membránových vezikul. Jeho funkce se liší od buňky k buňce. Jednou z jeho funkcí je syntéza fosfolipidů a cholesterolů. V jaterních buňkách též hladké retikulum slouží k detoxifikaci velkého množství odpadních látek metabolických procesů. Hrubé endoplazmatické retikulum se skládá z propojených plochých váčků. Na ně jsou navázané ribozomy. Ribozomy jsou buněčné útvary, které slouží k syntéze proteinů. Skládají se z molekul RNA a proteinů. Ribozomy jsou složeny z velké a malé podjednotky. Na ribozomech navázaných na membránu endoplazmatického retikula probíhá syntéza lysozomálních enzymů, proteinů pro Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum, proteinů buněčné membrány a proteinů určených k sekreci. Ribozomy mohou být též volně v cytoplazmě. Tyto ribozomy slouží k syntéze proteinů zůstávajících v cytosolu, inkorporovaných v jádře, mitochondrii a chloroplastu.

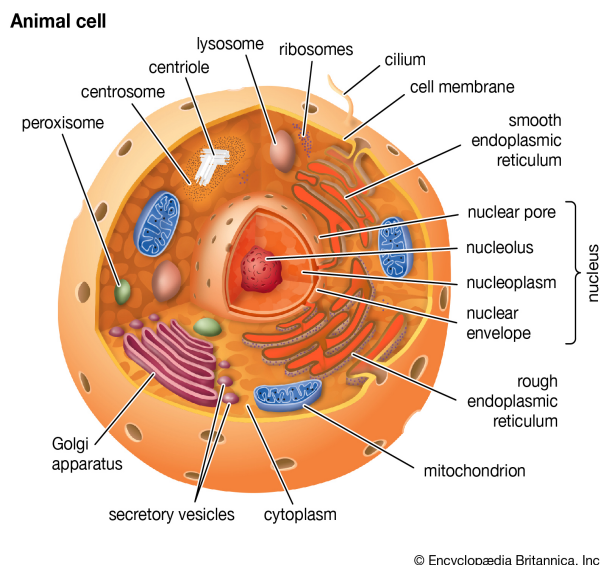
Golgiho aparát se skládá z 5 až 8 zploštělých cisteren ve tvaru disku, uspořádaných ve sloupcích. Slouží k modifikaci a exportu proteinů určených pro sekreci a glykoproteinů.

Lysozom obsahuje enzymy určené k degradaci proteinů, nukleových kyselin, lipidů, glykolipidů a glykoproteinů. Lysozomy jsou tvořené jednou fosfolipidovou dvojvrstvou. Lysozomy vznikají splnutím vezikula z Golgiho aparátu s endozomem (vezikula z cytoplazmatické membrány, vzniklé pohlcením částice).

V jádře je uložena genetická informace buňky v podobě DNA. DNA je asociovaná s proteiny (histony) a je složena do 46 chromozomů. Jaderná obálka se skládá ze dvou membrán. Tyto membrány tvoří

lipidová dvojrstva. Vnější dvojrstva je prodloužením endoplazmatického retikula. Buněčná obálka je protkána jadernými póry. Póry jsou obklopeny složitou proteinovou strukturou tvořící jaderný pórový komplex, který vybírá jaké molekuly se dostanou do jádra.

Mitochondrie slouží k generaci adenosintrifosfátu (ATP), tedy jsou zdrojem energie. Mitochondrie se skládá ze dvou membrán. Vnitřní membrána je složená do útvarů nazývajících se křisty. Prostor uvnitř vnitřní membrány se nazývá matrix.[19]



Obrázek 1.1: Struktura živočišné eukaryotické buňky.[19]

1.2.1.1 Cytoskelet

Cytoskelet je vláknitá síť tvořená proteinovými filamenti. Je zodpovědný za udržování buněčného tvaru, koherentní polohy buněk a organel a organizaci komponent buňky. Skládá se z aktinových vláken - protofilamentu, mikrotubulů a intermediálních filamentů.

Aktin je globulární protein, který je zpolymerizován do dlouhých vláken (filament). V nesvalových buňkách tvoří aktin síť filamentů zodpovědnou za pohyb buňky. Tyto vlákna mají pouze přechodnou existenci a kontrolovaně se polymerizují a depolymerizují k vytvoření pohybu.

Mikrotubuly jsou filamenti složené z 13-15 mikrofilamentů skládajících se z globulárních podjednotek tubulinu. Mikrotubuly často slouží k transportu membránových vezikul, nošených motorovými proteiny kinesin a dynein.

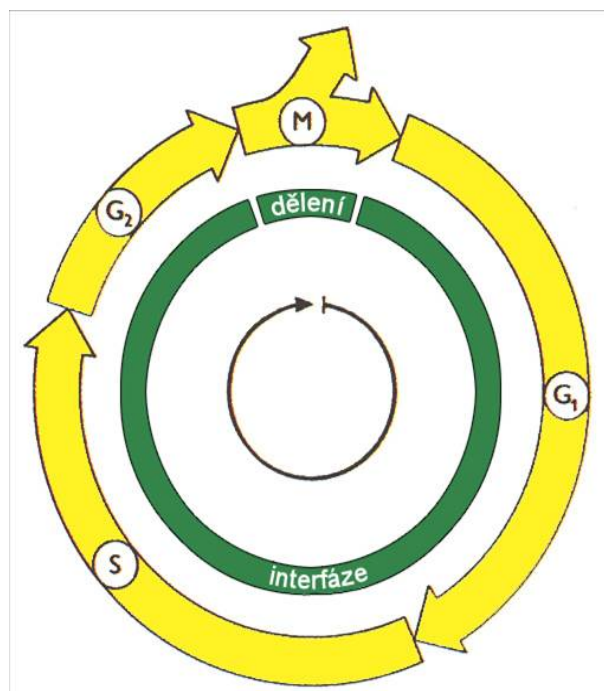
Intermediální filamenti jsou tlustší než aktinové filamenti, ale tenčí než mikrotubuly. Intermediální filamenti pomáhají buňce udržet si svůj tvar a integritu.[19]

1.2.1.2 Extracelulární matrice

Jedná se o kompozitní materiál, který vyplňuje mezibuněčný prostor. Skládá se z gelu, ve kterém jsou rozptýlené různé proteiny. Gel se skládá z polysacharidů ve vodném roztoku anorganických solí, živin a odpadních produktů. Dominantními proteiny v matrici jsou kolagen a elastin. Buňky jsou schopny s matricí komunikovat pomocí receptorů.

1.2.2 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je uspořádaná sekvenci dějů, které se odehrávají v buňce při přípravě k dělení. Se-stává ze čtyř fází. V první fázi se zvětšuje objem buňky (G₁), v druhé fázi se kopíruje DNA (S), ve třetí fázi se buňka připravuje na dělení (G₂) a v poslední dochází k samotnému dělení buňky- mitóze (M).[19]



Obrázek 1.2: Buněčný cyklus.[20]

1.2.3 Buněčná smrt

Buněčnou smrtí se rozumí ztráta schopnosti se reprodukovat. Existují dva typy buněčné smrti, nekróza a apoptóza. K nekróze dochází pokud dojde k narušení buněčné membrány pomocí rychle účinných metabolických jedů nebo extrémního fyzického stresu (vaření, mrznutí, deformace). Buněčný obsah, co unikl z nekrotických buněk, způsobuje v těle zánět.

Apoptóza je programovaná buněčná smrt. Nedochozí při ní k poškození membrány a zánětu. Během apoptózy buňka prodělá řadu dějů, které vedou k fragmentaci jádra do apoptických tělísek. Ty jsou pak fagocytované makrofágy. Známkou apoptózy je tvorba blebů - váčkovitých výrůstků z membrány. Ty jsou způsobeny rozkladem kortikálního cytoskeletu. Při něm dojde k rozvlnění cytoskeletu, k jeho odpojení od membrány a tvorbě vezikul. Apoptóza je výchozí cesta k odstranění mrtvých buněk a buněk označených k destrukci.[31]

1.2.4 Měření cytotoxicity u eukaryotických buněk

Existuje několik metod na měření cytotoxicity určité látky vůči eukaryotickým buňkám. Běžně používané metody zahrnují:

1. adenosin-trifosfát (ATP) test,

2. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) test;
3. laktát dehydrogenáza (LDH) test,
4. metoda neutrální červení.

Při ATP testu se měří koncentrace ATP v buňkách. Ta rapidně klesne pokud dojde u buňky k apoptóze či nekróze. Koncentrace ATP se měří pomocí D-luciferinu. Ten je k buňkám přidán spolu s luciferázou a reaguje s ATP (reakce katalyzována luciferázou) za vzniku oxyluciferinu a emise světla. Intenzita emitovaného světla je závislá na koncentraci ATP a měří se pomocí luminometru.

Při MTT testu se měří aktivita mitochondrie. K buňkám je přidáno MTT žluté barvivo, které je v mitochondrii živých buněk redukováno na tmavě fialový formazan. Koncentrace formazanu extrahovaného z buněk, je měřena fotometricky při vlnové délce 490 nm.

Při LDH metodě, je měřen únik LDH do kultivačního média vlivem poškození membrány. Při této metodě je do kulturního média přidán nikotinamidadenin dinukleotid (NAD^+) a 2-(4-iodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-fenyl-2H-tetrazolium chlorid (tetrazoliová sůl INT). NAD^+ je prvně redukováno v přítomnosti NADH. Ten následně redukuje tetrazoliovou sůl INT na červený formazan. Koncentrace formazanu se měří spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm.

Neutrální červeně je přijata pouze živými buňkami a inkorporována do lysozomů. Množství barviva přijatého buňkami se měří spektrofotometricky.[21]

1.2.5 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotický jednobuněčný organismus. Jedná se o nejmenší živé organismy na zemi obývajících skoro všechna prostředí.

Jednotlivé bakterie mohou mít jeden ze tří základních tvarů: kulovitý (koky), tyčinkovitý (bacily), nebo zahnutý (spiruly, vibria, spirochety). Vibria mají tvar zahnuté tyčinky, spiralia mají tvar dvakrát zahnuté tyčinky a spirochety mají tvar spirály. Bakterie se skládají z buněčné obálky, která obklopuje cytoplazmu. Bakterie, jakožto *Prokaryota*, nemají membránové organely.

Buněčná obálka se zásadně liší podle druhu bakterie. Skládá se z cytoplazmatické membrány a buněčné stěny. Cytoplazmatická membrána slouží ke generaci energie, segregaci chromozomů, separaci proteinů a efektivnímu aktivnímu transportu živin. Buněčná stěna se nachází na vnější straně cytoplazmatické membrány a definuje tvar bakterie. Podle druhu buněčné stěny lze bakterie rozdělit na grampozitivní a gramnegativní. Grampozitivní bakterie mají tlustou stěnu složenou z peptidoglykanové sítě protkané teichoovou kyselinou (peptidoglykan a teichoová kyselina jsou polysacharidy), proteiny a lipidy. U gramnegativních bakterií se buněčná stěna skládá ze dvou vrstev. Vnitřní vrstva je tenká a tvořena peptidoglykanem. Vnější vrstva je membrána složená z fosfolipidů a lipopolysacharidů. Některé bakterie jsou schopny sekretovat extracelulární materiál v podobě kapsule nebo vrstvy slizu.

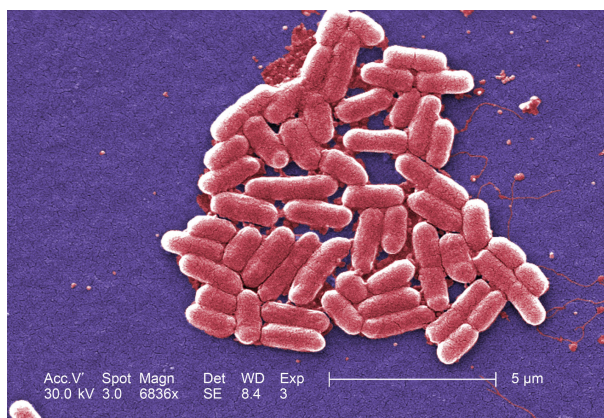
Uvnitř buněčné obálky je cytoplazma. Ta obsahuje DNA bakterie, ribozomy a buněčné inkluze, které plní zásobní funkci. Buněčné inkluze nejsou ohraničeny membránou. DNA u bakterií se nejčastěji vyskytuje ve formě jednoho kruhovitěho chromozomu. Některé bakterie ale mohou mít i dva chromozomy (např. *Rhodobacter sphaeroides*[23]) a v některých případech chromozom může mít lineární tvar na místo kruhového (např. *Agrobacterium tumefaciens* C58[23]). V cytoplazmě se dále vyskytují plazmidy - malé, nejčastěji kruhové molekuly DNA, které mohou nést genetickou informaci. Bakterie se rozmnožují nepohlavně, nejčastěji pomocí binárního dělení. Při něm roste objem bakterie do té

doby než se rozdělí na dvě identické dceřinné buňky. Buňky se dělí podél dělicího septa. Dělicí septum vzniká u grampozitivních bakterií růstem cytoplazmatické membrány dovnitř buňky podél jejího středu. U gramnegativních je septum produktem vštípení membrány dovnitř buňky, které vede k rozpůlení mateřské buňky.

Bakterie se též mohou rozmnožovat pučením. Při něm na mateřské buňce vzniká pupen, který roste tak dlouho, než je stejně velký jako mateřská buňka a poté se oddělí a vznikne z něj dceřinná buňka.[22]

1.2.5.1 Bakterie *Escherichia coli*

Escherichia coli je nesporulující, gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovitou bakterií. *E. coli* netvoří spóry. *E. coli* je 2 μm dlouhá a má průměr 0,25-1 μm . Některé kmeny mají i bičík. Množí se pomocí binárního dělení. Nachází se v distální části střev teplokrevných organismů. *E. coli* je často používána jako modelový organismus ve vědě. *E. coli* totiž rapidně roste a může přežít nerovnoměrné růstové podmínky, jako je teplota nebo obsah vzduchu a živin. *E. coli* je tudíž snadno kultivovatelná v laboratorních podmínkách. Taktéž její genetická informace je dobře prozkoumaná a lehce manipulovatelná, a proto se hojně využívá v genetickém inženýrství.



Obrázek 1.3:
Escherichia coli. [25]

1.2.5.2 Růstová křivka

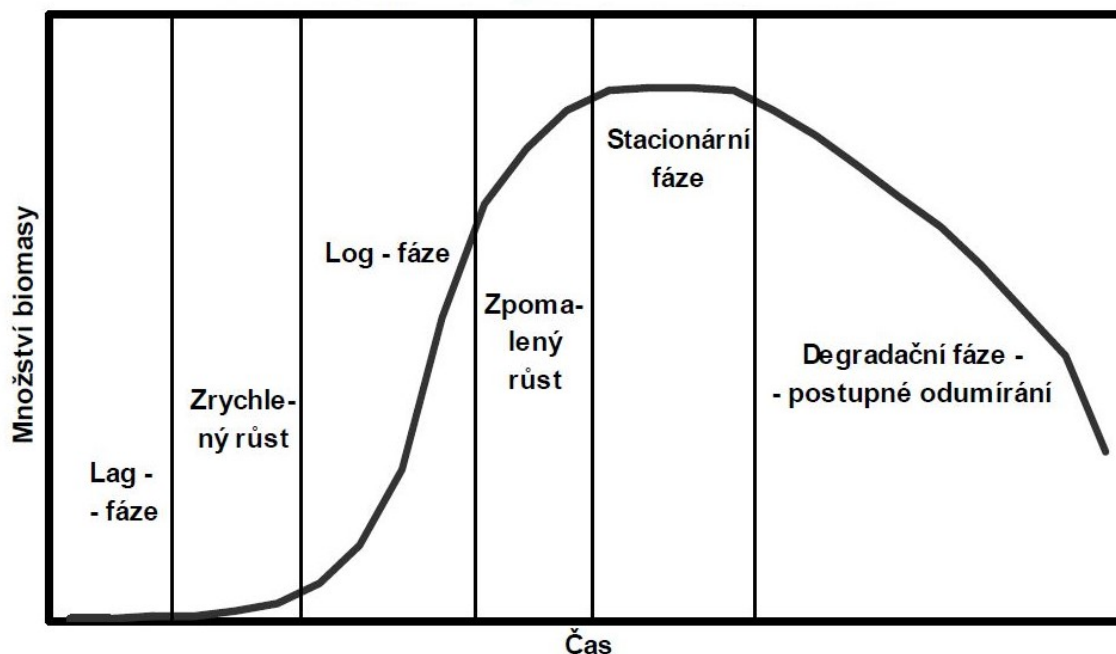
Růst bakteriální kultury je definován jako vzrůst počtu bakterií v populaci, nikoli, jako růst velikosti jedné buňky. Růst bakteriální kultury neprobíhá rovnoměrně v čase. Je závislý na množství a dostupnosti živin v kultivačním médiu, tvorbě metabolických zplodin a dostatečném provzdušnění v případě aerobních mikroorganismů. Růst bakteriální kultury lze rozčlenit na tyto fáze:

1. přípravnou fázi, neboli lag fázi, při níž se buňky nedělí a probíhá adaptace na nové prostředí.
2. fázi zrychleného růstu, kdy se začínají buňky postupně dělit se zvyšující se rychlostí a zkracující se generační dobou (čas nutný k zformování nové generace buněk)
3. exponenciální fázi neboli logaritmicou (log) fázi, při níž je přírůstek biomasy exponenciální a generační doba je nejkratší.

4. stacionární fázi, ve které je přírůstek a úbytek buněk v rovnováze

5. fázi postupného umírání, během níž počet buněk klesá a buňky se přestávají rozmnožovat

Grafickým znázorněním těchto procesů je růstová křivka.[26]



Obrázek 1.4: Růstová křivka.[26]

1.2.5.3 Počítání buněk

V mikrobiologických experimentech je důležité stanovení počtu buněk. Lze k němu použít celá řada metod. Jedná se o přímé nebo nepřímé počítání buněk, stanovení buněčné hmoty a metody sledující intenzitu biochemické činnosti přítomných organismů. Nejcitlivější a nejpresnější je přímé/nepřímé počítání buněk. To zahrnuje tyto metody:

1. přímé mikroskopické počítání buněk v různě upravených preparátech. Toho lze použít pokud je hustota buněk na ml aspoň 10^6 . Jedná se o rychlé stanovení počtů buněk, avšak u bakterií nelze rozlišit živé a mrtvé buňky. Přímé mikroskopické počítání se provádí v počítacích komůrkách nebo ve fixovaném nátěru na podložním sklíčku.
2. elektronické počítání buněk. To je založeno na nasávání přesně definovaného objemu elektrolytu, v němž jsou rozptýlené buňky, velmi malým otvorem do elektricky nevodivé trubice. Při průchodu otvorem dochází ke změně vodivosti, což je přístrojem zaregistrované jako impulz.
3. nefelometrické stanovení počtu mikroorganismů. Jedná se o stanovení počtu buněk v čiré kapalině na základě intenzity světla odraženého od jednotlivých buněk. Při této metodě je potřeba kalibrační křivka stanovená na základě přímého mikroskopického počítání.

4. kultivační stanovení mikroorganismů je založeno na přenášení mikroorganismů na vhodnou půdu, kde jsou se schopny rozmnožovat. Stanovuje se jím počet živých buněk. Kultivační metody lze použít pro jakkoliv hustou suspenzi mikroorganismů a ve směsích je často možno rozlišit jednotlivé skupiny nebo rody. Mezi tyto metody patří stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů a desková (plotnová) metoda. Desková metoda je založená na zjištění počtu kolonií vyrostlých na ztužených půdách za předpokladu že každá kolonie vznikla z jedné buňky. Základním postupem deskové metody je pipetování určitého objemu suspenze buněk na Petriho misku a jeho přelití rozehřátou živnou půdou, nebo roztírání suspenze na povrch ztuhlé půdy a zjišťování počtu kolonií po inkubaci při optimální teplotě. Výsledek deskové metody se uvádí jako počet kolonietvorných jednotek (CFU- colony forming unit).[26]

Stanovení buněčné hmoty lze provést přímými nebo nepřímými metodami. Mezi přímé metody patří navážkové/ gravimetrické stanovení sušiny buněk a stanovení jednotlivých složek protoplazmy, které se v buňkách vyskytují v poměrně stálé koncentraci (např. nukleonové kyseliny, dusík, bílkoviny). Mezi nepřímé metody patří například stanovení objemu buněčné hmoty nebo stanovení intenzity zákalu buněčné suspenze. U nepřímých metod je nutná kalibrační křivka připravená z výsledků přímých metod. Množství buněčné hmoty nemusí být v přímém poměru k počtu buněk.

Zjištění přibližného množství mikroorganismů na základě jejich biochemické činnosti lze provést radiometrickými metodami, měřením elektrické vodivosti, chemoluminiscenčními metodami nebo provedením Limulus - testu. Tyto metody poskytují ale pouze přibližné vyjádření počtů buněk, neboť jednotlivé buňky, i stejného druhu, se liší intenzitou sledované reakce. Výhodou těchto metod je rychlost a jednoduchost jejich provedení.

1.3 Vliv nanočástic na buňky

Vliv nanočástic na buňky závisí na mnoha faktorech, jako jsou např. typ nanočástic, jejich velikost a koncentrace a modifikace jejich povrchu. Z toho důvodu je složité vyvozovat obecné závěry o tomto vlivu. V této kapitole je popsána především toxicita nanočástic vybraných díky jejich možnému využití v medicíně (např. doručování léčiv do rakovinné tkáně, fotodynamická terapie, hypertermie, zobrazování tkání) a také jejich vliv na morfologii a funkci buněk. Toxicitou se v této práci rozumí schopnost nanočástic způsobit buněčnou smrt nebo zamezení buněčného dělení.

1.3.1 Kvantové tečky

U kvantových teček CdSe byla pozorována toxicita vůči fibroblastům, hepatocytům a krysím buňkám feochromocytomu (neuroendokrinní nádor)[27, 28, 29, 30]. Hlavní příčinou této toxicity je oxidace povrchu kvantových teček a následné uvolňování toxických iontů Cd^{2+} . Tato oxidace je způsobena kyslíkem ze vzduchu nebo UV zářením. Atomy selenu se na povrchu kvantové tečky oxidují za vzniku SeO_2 , který se společně s ionty Cd^{2+} desorbují z povrchu kvantových teček. Oxidace povrchu kvantových teček CdSe může být částečně omezena modifikací jejich povrchu. Toto omezení vede ke snížení jejich toxicity. Modifikací povrchu kvantových teček CdSe je např. jejich uzavření do ZnS obálky nebo jejich potažení organickými molekulami. Kvantové tečky CdSe uzavřené v 1-2 ZnS monovrstvách (CdSe/ZnS) a vystavené vzdušnému kyslíku nevykazovaly žádnou toxicitu vůči hepatocytům, narozdíl od nemodifikovaných kvantových teček CdSe. Kvantové tečky CdSe/ZnS, ozářené po dobu 8h UV zářením, začaly

být toxické vůči hepatocytům, ale stále se jednalo o nižší hodnoty toxicity než v případě nemodifikovaných kvantových teček CdSe. Ozáření kvantových teček CdSe/ZnS UV zářením totiž vede k oxidaci atomů síry na síranové ionty, degradaci ZnS vrstvy a následné oxidaci jádra kvantové tečky CdSe. Slabá oxidace kvantových teček CdSe/ZnS (projevující se jako modrý posun absorpčního spektra kvantových teček CdSe/ZnS, díky jejich zmenšující se velikosti) byla též pozorována, když kvantové tečky CdSe/ZnS byly ponechány 12 h na vzduchu. Kvantové tečky CdSe/ZnS tudíž mohou být z dlouhodobého hlediska toxické. Další modifikace povrchu kvantových teček CdSe/ZnS vede k jejich lepší ochraně proti oxidaci. U kvantových teček CdSe/ZnS, jejichž povrch byl modifikovaný pomocí hovězího sérového albuminu (bovine serum albumin BSA) a které byly vystaveny UV zářením po dobu 8h, byla pozorována redukce v toxicitě vůči hepatocytům oproti nemodifikovaným kvantovým tečkám CdSe/Zn, které byly vystaveny záření stejnou dobu. Množství životaschopných hepatocytů vystavených 0,25 mg/ml kvantových teček CdSe/ZnS, které byly vystaveny UV záření po dobu 8h, byla 66 %. Kdežto množství životaschopných hepatocytů vystavených kvantovým tečkám CdSe/Zn s povrchem modifikovaným pomocí BSA a vystavených UV záření po stejnou dobu byla 98 %. Dále byly hepatocyty označeny kvantovými tečkami CdSe/Zn potaženými polyethylenglykolem a s navázanými molekulami epidermálního růstového faktoru. Takto označené hepatocyty byly inkubovány po dobu 7 dní. Během těchto 7 dní nebyla pozorována změna v jejich morfologii a funkci.[27]

Uzavření kvantových teček CdSe do obálky ZnS však nemusí nutně vést k odstranění jejich toxicity. Ve studii provedené na fibroblastech byly kvantové tečky CdSe/ZnS toxické i v laboratorních podmínkách. V této studii byly fibroblasty vystaveny kvantovým tečkám CdSe a CdSe/ZnS potaženým kyselinou 3-merkaptopropionovou (MPA), amfifilními (látky s hydrofilním a lipofilním charakterem) polymery, obálkou z křemičitanu s fosfanátovými skupiny (phos-silan) a obálkou z křemičitanu s polyetylenovými skupinami (PEG-silan). Bylo pozorováno množství fibroblastů lnoucích k substrátu jako známka jejich životaschopnosti. S rostoucí koncentrací kvantových teček CdSe i CdSe/ZnS s povrchem potaženým MPA počet fibroblastů lnoucích k substrátu nejprve klesal; po dosažení minima začal počet lnoucích fibroblastů opět růst s tím rozdílem, že tyto lnoucí fibroblasty nebyly živé. Bylo pozorováno, že kvantové tečky CdSe/ZnS začaly být toxické při vyšší koncentraci povrchových atomů Cd ($c=5,9\pm 1,3\mu\text{M}$), určených výpočtem na základě morfologie kvantových teček, než kvantové tečky CdSe ($c=0,68\pm 0,12\mu\text{M}$). Podobný trend byl také pozorován u kvantových teček CdSe s povrchem potaženým obálkou phos-silan. Na druhou stranu kvantové tečky CdSe a CdSe/ZnS s povrchem potaženým obálkou PEG-silan nevykazovaly toxicitu v celém rozsahu zkoumané koncentrace povrchových atomů Cd ($c=14\mu\text{M}$). Kvantové tečky CdSe/ZnS s povrchem potaženým obálkou PEG-silan nebyly narozdíl od kvantových teček CdSe s povrchem potaženým obálkou phos-silan, přijaté fibroblasty, což ukazuje že toxicita kvantových teček CdSe závisí na tom, zda dojde k uvolnění iontů Cd^{2+} vně nebo uvnitř buňky. U kvantových teček CdSe a CdSe/ZnS potažených amfifilními polymery, byl narozdíl od ostatních kvantových teček pozorován pouze pokles počtu buněk přilnulých k substrátu a jeho následná stagnace. Podobný trend byl také pozorován u fibroblastů vystavených zlatým nanočásticím potažených kyselinou merkaptoundecylenovou. To může značit, že za toxicitu těchto kvantových CdSe/ZnS potažených amfifilními polymery může jiný mechanismus než uvolnění iontů Cd^{2+} . [28].

Fakt, že toxicitu kvantových CdSe lze výrazně snížit uzavřením kvantových teček CdSe do křemičitanové obálky, potvrzuje i další studie [29]. V ní byly kožní fibroblasty (HSF-42) a plicní fibroblasty (IMR-90) vystaveny kvantovým tečkám CdSe uzavřených v křemičitanové schránce a s povrchem modifikovaným pomocí PEG (kvantové tečky PEG-silan). Tyto kvantové tečky byly schopny způsobit

apoptózu pouze u 2 % HSF-42 buněk.[29]. Vystavení HSF-42 buněk kvantovým tečkám PEG-silan mělo též za následek menší vzrůst počtu buněk v G2/M fázi buněčného cyklu a signifikantně změněnou expresi 46 z 22 000 zkoumaných genů. U buněk vystavených kvantovým tečkám PEG-silan byla pozorována zvýšená exprese (proces převedení informace uložené v DNA na reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci) genů spojených s lokalizací vezikul uvnitř buňky a s membránovými proteiny zapojenými do buněčné reakce na stres. Snížená exprese byla pozorována u genů účastnících se kontroly progresu M-fáze buněčného cyklu, formování dělicího vřeténka a cytokineze. Toto vysvětluje zvýšený počet buněk v G2/M fázi buněčného cyklu.[29].

V další studii byla též pozorována závislost toxicity kvantových teček CdSe na jejich velikosti. Kvantové tečky, emitující červené světlo, o velikosti kolem 5,7 nm byly méně toxické než kvantové tečky CdSe, emitující zelené světlo, o velikosti kolem 2,3 nm. Kvantové tečky emitující zelené světlo byly schopny na rozdíl od kvantových teček emitujících červené světlo proniknout do jádra. To mohlo způsobit jejich větší toxicitu.[30]

Toxicitu kvantových teček CdSe lze též odstranit přidáním antioxidantu NACu (N-Acetyl-L-Cystein).[30]

1.3.2 Zlaté nanočástice

Toxicita zlatých nanočástic závisí také na jejich velikosti. Ve studii provedené týmem Yu Pen et. al. byly zkoumány zlaté nanočástice o velikosti 0,8 nm; 1,2 nm; 1,4 nm; 1,8 nm a 15 nm, jejichž povrch byl modifikován pomocí trifenyfosfin monosulfonátem (TPPMS) nebo trifenyfosfan-3,3',3''-trisulfonátem (TPPTS). Těmto nanočásticím byly vystaveny myši fibroblasty L929, buňky melanomu SK-MeL-28, myši makrofágy J774A1 a buňky rakoviny děložního čípku HeLa po dobu 48 h. Toxicita těchto zlatých nanočástic byla přibližně stejná vůči všem buněčným liniím a nebyla závislá na jejich povrchové modifikaci. Zlaté nanočástice o velikosti 1,4 nm vykazovaly mnohem větší toxicitu než zlaté nanočástice o zbylých velikostech. Hodnota IC_{50} (koncentrace nutná k inhibici růstu buněk o 50 %) zlatých nanočástic o velikosti 1,4 nm s povrchem modifikovaným pomocí TPPMS činila 36 μM . Kdežto hodnoty IC_{50} zlatých nanočástic o velikosti 0,8; 1,2 a 1,8 nm o stejné povrchové modifikaci činily 250; 140 a 230 μM . U zlatých nanočástic o velikosti 15 nm nebyla pozorována žádná toxicita až do koncentrace 6300 μM . Zlaté nanočástice o velikosti 1,4 nm a koncentraci 110 μM byly též ve svém cytotoxickém účinku rychlejší a efektivnější než zlaté nanočástice o velikosti 1,2 nm. Zlaté nanočástice o velikosti 1,4 nm byly schopny způsobit buněčnou smrt u 70 % buněk vystavených těmto nanočásticím po dobu 12h a až u 90 % buněk vystavených těmto nanočásticím po dobu 24h. Většina mrtvých buněk byla navíc nekrotická. Na druhou stranu zlaté nanočástice o velikosti 1,2 nm byly schopny způsobit buněčnou smrt jen u 50 % HeLa buněk poté, co byly vystaveny těmto nanočásticím po dobu 24h. Počet apoptických a nekrotických buněk byl přitom stejný. Toxicita těchto zlatých nanočástic mohla být způsobena jejich interakcí s DNA.[31]. Ve studii [32] byla pozorována interakce zlatých nanočástic o velikosti 1,4 nm s DNA. Ty byly nejspíš navázány ve velkých žlábcích DNA (prohlubně ve dvoušrobovici DNA, tyto prohlubně nejsou vždy stejně velké díky asymetrickému uspořádání párů bází na cukr-fosfátových kostrách řetězce DNA). Toto dokazují obrázky pořízené pomocí AFM (mikroskopie atomárních sil) a TEM (transmisní elektronová mikroskopie) i simulace provedené autory zmiňované studie. Ze simulací též vyplývá, že zlaté nanočástice právě o velikosti 1,4 nm perfektně pasují do velkého žlábků B DNA. Tento fakt by mohl vysvětlit vyšší toxicitu těchto zlatých nanočástic oproti ostatním.[32]

Sférické zlaté nanočástice o velikosti 5 až 70 nm nevykazovaly toxicitu vůči HaCaT keranocytům, které jim byly vystaveny po dobu 24h.[33]. Taktéž u zlatých nanočástic o velikosti 18 nm a o koncentraci až 250 μM nebyla pozorována toxicita vůči buňkám K 562 (zvěčněná buněčná linie z myelogenní leukémie). [34]. Zlaté nanočástice o velikosti 3 nm a o koncentraci 100 μM byly schopny způsobit malý pokles počtu životaschopných RAW264.7 makrofágů, které jim byly vystaveny po dobu 72h. Tento pokles ale mohl být způsoben vyčerpáním nutrientů v médiu a nikoli přítomností zlatých nanočástic. Vystavení RAW264.7 makrofágů zlatým nanočásticím o velikosti 3 nm vedlo k poklesu koncentrace reaktivních kyslíkových specií (reactive oxygen species ROS) uvnitř těchto buněk a k poklesu reaktivních dusíkových forem (RNS) v jejich supernatantech.[35]

Ve studii provedené kolektivem autorů Pernodet et. al. [36] byl zkoumán efekt zlatých nanočástic o velikosti $13,1 \pm 1,4$ nm na lidské dermální fibroblasty. Ty byly vystaveny těmto nanočásticím po dobu 2, 4 a 6 dnů. Použitá koncentrace těchto nanočástic byla 0,4; 0,6; 0,2; 0,8 mg/ml. U fibroblastů vystavených těmto nanočásticím po dobu 2 dnů nebyla pozorována žádná změna v jejich počtu oproti počtu kontrolních fibroblastů (fibroblasty nevystavené nanočásticím). U fibroblastů, které byly vystaveny nanočásticím po dobu 4 a 6 dní, byl pozorován úbytek jejich počtu s rostoucí koncentrací zlatých nanočástic oproti počtu kontrolních fibroblastů. Tento úbytek byl výraznější u fibroblastů vystavených nanočásticím po dobu 6 dní. Zlaté nanočástice o velikosti 13 nm měly také vliv na morfologii a funkci fibroblastů. Změny v morfologii se projeví už po dvou dnech. Fibroblasty, které byly vystaveny zlatým nanočásticím o velikosti 13 nm, měly menší povrch než kontrolní fibroblasty a jejich povrch se zmenšoval s rostoucí koncentrací těchto nanočástic. Vystavení fibroblastů zlatým nanočásticím o velikosti 13 nm mělo také vliv na jejich aktinová vlákna a extracelulární matici (ECM). Aktinová vlákna ve fibroblastech vystavených zlatým nanočásticím o velikosti 13 nm, byla méně natažená oproti aktinovým vláknům v kontrolních fibroblastech. Hustota těchto aktinových vláken byla též menší než hustota aktinových vláken v kontrolních fibroblastech. Ve fibroblastech vystavených zlatým nanočásticím o velikosti 13 nm byl také pozorován vznik kruhových aktinových útvarů, které nebyly přítomny v kontrolních fibroblastech. Hustota a dimenze ECM vláken byla menší u fibroblastů vystavených zlatým nanočásticím. Na druhou stranu modul pružnosti (veličina charakterizující pružnost materiálu) vláken ECM fibroblastů vystavených zlatým nanočásticím o velikosti 13 nm, rostl úměrně koncentraci nanočástic. Zlaté nanočástice o velikosti 13 nm také negativně ovlivnily motilitu buněk. Ve zmiňované studii byl dále zkoumán příjem těchto nanočástic fibroblasty. Zlaté nanočástice o velikosti 13 nm byly přijaty fibroblasty už po třech hodinách. Tyto nanočástice byly lokalizované v lysozomu. Fibroblasty vystavené zlatým nanočásticím o velikosti 13 nm po dobu 6 dnů byly přeplněné vakuolami obsahujícími různé koncentrace těchto nanočástic. Zlaté nanočástice o velikosti 13 nm nebyly schopny proniknout do jádra fibroblastů. Změna morfologie fibroblastů a úbytek jejich počtu nemusel být způsoben samotnými nanočásticemi (vzhledem k tomu, že nanočástice byly fibroblasty přijaté už po 3 h, ale negativní jevy se projeví až po několik dnech), ale vznikem nadměrného počtu vakuol.

Toxicita zlatých nanočástic dále závisí na jejich povrchové modifikaci. Z výsledků studie [37] vyplývá, že tato toxicita závisí také na hydrofobicitě jejich povrchu. V uvedené studii byly použity zlaté nanočástice, jejichž jádro mělo velikost 2 nm a jejichž povrch byl modifikován kvartérními aminy s různě dlouhými alkylovými zbytky. S rostoucí hydrofobicitou těchto nanočástic rostla jejich toxicita a produkce ROS. Na druhou stranu příjem nanočástic buňkami klesal s jejich rostoucí hydrofobicitou a taktéž klesalo poškození DNA buněk.

Toxicitu dále může ovlivňovat náboj nanočástic. Ve studii provedené kolektivem autorů Goodman et.

al. [38] byla zkoumána toxicita nanočástic, jejichž povrch byl modifikován pomocí kvartérních amoniových solí (kladně nabitě nanočástice) a pomocí karboxylových kyselin (záporně nabitě nanočástice), vůči bakteriím *Escherichia coli*, červeným krvinkám a Cos-1 buňkám. Kladně nabitě nanočástice vykazovaly větší toxicitu vůči všem sledovaným buňkám než záporně nabitě nanočástice. Větší toxicita kladně nabitých nanočástic mohla být způsobena jejich interakcí se záporně nabitými buňkami. Toto bylo ověřeno zkoumáním interakce nanočástic s vezikuly složenými z fosfatidylcholinu a fosfatidylserinu (negativně nabitě) a s vezikuly složenými čistě z fosfatidylcholinu (bez náboje). Kladně nabitě nanočástice rozložily více vezikul složených z fosfatidylcholinu a fosfatidylserinu než záporně nabitě nanočástice. Na druhou stranu záporně nanočástice rozložily o něco více vezikul složených čistě z fosfatidylcholinu než kladně nabitě nanočástice. [38]

V některých případech nebyla pozorovaná toxicita způsobena samotnými nanočásticemi, ale cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB). [33, 39, 40, 41] CTAB je kationtová povrchově aktivní látka, která se používá při výrobě zlatých nanotyčinek. CTAB tvoří na povrchu zlatých nanotyčinek dvojvrstvu, která umožňuje jejich anizotropní růst. CTAB jde také použít ke stabilizaci sférických zlatých nanočástic. V případě roztoku sférických nanočástic lze použít k odstranění volného CTAB centrifugací. To vede k odstranění toxicity. Avšak v případě zlatých nanotyčinek vede odstranění CTAB z jejich roztoku k agregaci zlatých nanotyčinek a následnému uvolnění CTAB z jejich povrchu do roztoku. [33, 39] Tomu lze zabránit potažením zlatých nanotyčinek, na jejichž povrchu je adsorbovaný CTAB, organickými molekulami, jako je např. polyakrylová kyselina, polyallylamin hydrochlorid, polystyrenesulfonát nebo nahrazením povrchového CTAB jinými organickými molekulami jako je např. fosfatidylchlorin. Toxicita zlatých nanotyčinek s adsorbovanými molekulami CTAB může též být výrazně snížena adsorbci proteinů z růstového média na jejich povrch. [33, 40, 41]

U většiny nanotyčinek nebyla pozorována významná významná toxicita. Pouze u nanotyčinek, na jejichž povrchu byl poly(diallyldimethylammonium) chlorid byla pozorována malá toxicita vůči HeLa buňkám. Tyto nanotyčinky však nebyly schopny způsobit výraznou změnu v expresi DNA HeLa buněk. Toto značí, že toxicita těchto nanotyčinek nebyla způsobena poškozením DNA. [41]

1.3.3 Nanočástice ZnO

Nanočástice ZnO vykazují antibakteriální aktivitu vůči širokému spektru mikroorganismů, například *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio fischeri*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis* [43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 52, 62, 61]. Při malých koncentracích nanočástic ZnO ($1 \cdot 10^{-3}$ - $1,5 \cdot 10^{-3}$ M) bylo pozorováno malé zvýšení růstu bakterií *E. coli* oproti kontrolnímu vzorku [44, 45, 52]. Z mnoha studií [44, 49, 62] vyplývá, že grampozitivní bakterie (např. *Staphylococcus aureus*) jsou citlivější vůči antibakteriálním účinkům nanočástic ZnO, než gramnegativní bakterie (např. *Escherichia coli*). V několika studiích [43, 45] byl ale pozorován opačný efekt a *S. aureus* byl citlivější k antibakteriálním účinkům nanočástic ZnO než *E. coli*.

Nanočástice ZnO též vykazují toxicitu vůči různým druhům eukaryotických buněk. A to jak vůči jednoduchým mikroorganismům, jako jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [53] nebo jednobuněčné řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* [54], tak k široké škále savčích buněčných linií. Toxicita nanočástic ZnO byla pozorována u buněk myšího neuroblastomu Neuro-2A, fagocytů RAW264.7, transformovaných bronchiálních buněk BEAS-2B, T-lymfocytů, MG-63 buněk osteosarkomu, buněk lidského plicního adenokarcinomu LTP-a-2, lidských buněk hepatokarcinomu (HpG2), primárních myších em-

bryonálních fibroblastů (PMEF), myších makrofágů ANA-1 a buněk lidského endotelu. Toxicita nanočástic ZnO byla menší vůči T-Lymfocytům než vůči bakteriím *E. coli* a *S. ureus*. Na druhou stranu buňky Mg-63 jsou citlivější k toxicitě nanočástic ZnO než *E. coli*. [44, 51, 59, 56, 57] U eukaryotických buněk dochází k apoptóze vlivem působení nanočástic ZnO.[55, 58, 59, 60]

Jak u prokaryotických tak u různých eukaryotických buněk vystavených nanočásticím ZnO bylo pozorováno poškození buněčné membrány. [45, 46, 47, 55, 56, 57, 58, 61] Buňky *E. coli* vystavené nanočásticím ZnO byly též prodloužené a některé obsahovaly dvě jádra. To může být následkem "SOS"odpovědi. Při ní v důsledku poškození DNA dochází k přerušení dělení, ale biomasa buňky stále roste. To vede k prodloužení buněk *E. coli* .[45]

U eukaryotických buněk, vystavených nanočásticím ZnO, byly pozorovány různé známky oxidativního stresu. U BEAS-2B buněk a fagocytů RAW264.7, byla pozorována exprese ochranného enzymu HO-1, aktivace signální kaskády JNK kináz, zvýšená produkce TNF- α a IL-8 (ukazatelé zánětu), depolarizace membrány mitochondrie a uvolnění iontů Ca^{2+} do vnitřního prostoru buňky [51]. Depolarizace membrány mitochondrie byla také pozorována u HpG2 buněk vystavených nanočásticím ZnO [55]. Dále bylo u HpG2 a PMEF buněk, vystavených těmito nanočásticím, pozorováno poškození jejich DNA[55, 56]. U buněk cévního endotelu vystavených nanočásticím ZnO byla pozorována zvýšená koncentrace ukazatelů zánětu, tj. proteinů ICAM-1, IL-8, MCP-1 a jejich m-RNA.[60] Také LTEP-a-2 buňky vystavené nanočásticím ZnO byly zmenšené a byla u nich pozorována pyknóza (kondenzace chromatinů v jádře). [58] Toxicita nanočástic ZnO může být způsobena několika faktory:

1. Generací reaktivních kyslíkových specií (reactive oxygen species- ROS) jako $OH\cdot$, H_2O_2 , O_2^- . A jejich další reakce s membránou nebo jinými organelami buňky.
2. Uvolňování iontů Zn^{2+} do roztoku (rozpuštění nanočástic) a jejich následná interakce s membránou nebo jinými organelami buňky.
3. Přímou interakcí nanočástic s buněčnými strukturami

Též může nastat kombinace vícero z výše uvedených faktorů[47].

Informace z mnoha studií [45, 47, 51, 55, 58, 63] naznačují, že generace ROS je nejvýznamnějším faktorem toxicity nanočástic ZnO.V roztoku nanočástic ZnO byla pozorována přítomnost H_2O_2 a $OH\cdot$ [45, 51, 63, 64]. Taktéž byla zaznamenána zvýšená koncentrace ROS uvnitř buněk vystavených nanočásticím ZnO [51, 55, 56, 57, 58]. Byla pozorována také zvýšená koncentrace malondialdehydu (MDA) - produktu peroxidace polyneenasycených lipidů membrány buněk[46, 55]. Tato peroxidace lipidů mohla zapříčinit pozorované poškození membrány. Přítomnost vychytávačů ROS, jako jsou histidin a vitamín C, byla schopna snížit toxicitu ZnO nanočástic.[46, 55]

Produkce ROS může být způsobena fotokatalýzou. Tomu nasvědčuje fakt, že pokud v průběhu experimentu nebyl roztok s nanočásticemi a buňkami vystaven slunečnímu záření, došlo k poklesu jeho toxicity.[48, 49]. Avšak i ve tmě byla u nanočástic ZnO pozorována toxicita. Příčinou této toxicity mohou být

1. tvorba ROS na povrchu nanočástic i bez přítomnosti světla
2. jiné faktory.

Prvnímu bodu nasvědčuje to, že nanočástice ZnO o velikosti 93 nm vykazovaly toxicitu vůči bakteriím *E. coli* i bez přítomnosti světla a ostatní možné příčiny toxicity byly vyloučeny. Těmito příčinami mohly

být: ionty Zn^{2+} ($ZnCl_2$ nebyl toxický vůči *E. coli* v koncentracích odpovídajících množství rozpuštěných iontů Zn^{2+}), interakce s membránou (přítomnost separační membrány neovlivnila toxicitu) nebo příjem nanočástic (nanočástice nebyly pozorované uvnitř *E. coli*).[47] ROS mohou vznikat na povrchu nanočástic reakcí hydroxylových aniontů s volnými elektrony a dírami, vznikly jako důsledek chyb v krystalové mřížce. Těmi jsou například intersticiální zinečnaté ionty a kyslíkové vakance[55].

Malé koncentrace ROS mohly také způsobit pozorované zvýšení růstu *E. coli* při malých koncentracích nanočástic ZnO. ROS v malých koncentracích totiž mohou sloužit jako posel, který aktivuje některé buněčné procesy (například uvolnění transkripčních faktorů, genová exprese a buněčný růst).[45] Pokud je hlavní příčinou toxicity nanočástic ZnO generace ROS, vysvětlovalo by to, proč je *E. coli* citlivější k antibakteriálním účinkům nanočástic ZnO než *S. aureus*. *S. aureus* totiž obsahuje zlaté karotenoidní pigmenty, které mu poskytují větší resistenci vůči oxidačním činidlům a též obsahuje antioxidační enzymy jako je například kataláza[47].

Dalším významným faktorem toxicity nanočástic ZnO mohou být ionty Zn^{2+} vznikající jejich rozpuštěním. Ionty Zn^{2+} jsou toxické vůči bakteriím *Vibrio fischeri*, řasám *Pseudokirchneriella subcapitata*, kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* a myším makrofágům. Toxicita nanočástic ZnO vůči řasám, kvasinkám a myším makrofágům byla stejná jako toxicita zinečnaté soli, pokud se množství uvolněných iontů Zn^{2+} shodovalo s koncentrací iontů Zn^{2+} v roztoku této soli. To naznačuje, že v těchto případech je uvolňování iontů Zn^{2+} hlavní příčinou toxicity nanočástic ZnO. [53, 54, 57]. Zajímavé je, že v případě bakterie *Vibrio fischeri*, fagocytů RAW264.7 a transformovaných bronchiálních buněk BEAS-2B byla toxicita nanočástic menší než toxicita $ZnSO_4$, pokud se koncentrace iontů Zn^{2+} v jejich roztocích shodovala.[50, 51] Tento jev naznačuje, že toxicita může také záviset na tom, jak se ionty Zn^{2+} dostanou do roztoku a jak rychle. Ionty Zn^{2+} mohou být též dalším faktorem zodpovědným za vzrůst počtu kolonií *E. coli* u malých koncentrací nanočástic ZnO. Vzhledem k tomu že pro *E. coli* je ideální koncentrace iontů Zn^{2+} v růstovém médiu 1 mM. Na druhou stranu ideální koncentrace iontů Zn^{2+} pro růst *S. aureus* je v rozmezí mikromolů. Jejich milimolární koncentrace může být pro *S. aureus* toxická. To by vysvětlovalo větší citlivost *S. aureus* vůči antibakteriální aktivitě ZnO nanočástic oproti *E. coli*. [44]

Toxicitu nanočástic ZnO též může způsobovat interakce těchto nanočástic s membránou buněk. Může se jednat o elektromagnetickou interakci kladně nabitých nanočástic ZnO se záporně nabitou membránou buněk. Tomuto naznačuje fakt, že nanočástice ZnO potažené PEG vykazovaly větší antibakteriální aktivitu než nanočástice ZnO potažené škrobem. OH skupiny ve škrobu totiž mohou stínit kladný náboj nanočástic ZnO, a tím mohou snižovat jejich interakci s bakteriemi, a tudíž jejich toxicitu. [43]. V další studii byl použit ke studiu interakce nanočástic ZnO s buněčnou membránou tříelektrodový systém. Ten se skládal z platinové, argenochloridové a kapající rtuťové elektrody. Jako modul buněčné membrány byla použita monovrstva z dioleoyl-fosfatidylcholinu. Ta se umístila na rtuťovou elektrodu a byl měřen proud v závislosti na vkládaném napětí na tříelektrodový systém (voltamogram), který byl ponořen v roztoku nanočástic ZnO nebo v roztoku bez nich. Přítomnost nanočástic ZnO vedla ke zformování nového píku na voltamogramu. Tento pík nebyl přítomný, pokud bylo měření provedeno s roztokem bez nanočástic. To značí, že docházelo k interakci nanočástic s monovrstvou. Rozdílná struktura membrány *E. coli* a *S. aureus*, může vést k jiné interakci, a tím přispívat k rozdílné toxicitě nanočástic ZnO vůči *E. coli* a *S. aureus*. [61]

Toxicita nanočástic ZnO může být závislá na jejich velikosti. Například ve studii [62] byl pozorován růst toxicity nanočástic ZnO vůči *E. coli* a *S. aureus* s jejich klesající velikostí z 800 nm na 100 nm. V další studii byl [43] také pozorován růst toxicity částic ZnO vůči *E. coli* a *S. aureus* s jejich klesající

velikostí z 1,2 μm na 40 nm. Taktéž částice ZnO o velikosti 230 a 249 nm byly toxičtější vůči *E. coli* než částice o velikosti 2417 nm [61], nanočástice ZnO o velikosti 8 nm byly toxičtější vůči *S. aureus* než nanočástice ZnO o velikosti 50-70 nm. [48]. V jiných studiích [49, 50, 53] nebyl zase pozorován vliv velikosti ZnO nanočástic na jejich toxicitu. To mohl být následek agregace ZnO nanočástic v roztoku.

Antibakteriální aktivita nanočástic ZnO též závisí na prostředí, v jakém byly bakterie nanočásticím ZnO vystaveny. Toxicita nanočástic ZnO vůči (*E. coli*) a (*S. aureus*) byla menší, pokud byly tyto bakterie vystaveny nanočásticím ZnO v nutričním médiu, než když jim byly vystaveny ve fyziologickém roztoku. Toto mohl být důsledek vychytávání ROS látkami přítomnými v nutričním médiu. Přítomnost PEG v roztoku má malý vliv na toxicitu nanočástic ZnO.[61].

1.3.4 Nanočástice kovových oxidů

1.3.4.1 TiO₂

Nanočástice TiO₂ za laboratorních podmínek nevykazují žádnou nebo jen malou toxicitu vůči různým druhům bakterií (např. *Staphylococcus aureus*, *Vibrio fischeri*), vůči kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* a různým druhům savčích buněčných linií, např. nesmrtelným krysím buňkám, myším fibroblastům 3T3, MSTO-211H buňkám mesoteliomu, Neuro-2A buňkám (tj. myším buňkám neoroblastomu), fagocytům RAW264.7, BEAS-2B bronchiálním epitelovým buňkám a lidským dermálním mikrovaskulárním endotelovým buňkám [48, 50, 51, 53, 59].

Ve studii [65] bylo za absence světla pozorované oxidativní poškození DNA a membrány u BRL 3A buněk (lidských bronchiálních epitelových buněk). Byl pozorován vzrůst koncentrace NO a H₂O₂ uvnitř těchto buněk po jejich vystavení nanočásticím TiO₂. Tyto jevy byly závislé na velikosti částic a na jejich krystalové struktuře, tj. zda se jednalo o anatas nebo rutil. Anatas o velikosti 10 nm a 20 nm a rutil o velikosti 200 nm byly schopny způsobit oxidativní poškození DNA a zvětšení koncentrace H₂O₂ uvnitř BRL 3A buněk. Ovšem pouze anatas o velikosti 10 a 20 nm byl schopen způsobit oxidaci membrány a vzrůst koncentrace NO uvnitř buněk BRL 3A buněk, zatímco anatas o velikosti větší nebo rovné 200 nm a rutil o velikosti 200 nm ne.

Ve studii [49] též nanočástice TiO₂ o velikosti 320 nm způsobily 72% inhibici růstu *Escherichia coli* (při koncentraci 5000 ppm) a 75% inhibici růstu *Bacillus subtilis* (při koncentraci 1000 ppm), pokud byly vystaveny slunečnímu světlu. Toxicita nanočástic TiO₂ vůči bakteriím byla menší, pokud jim byly bakterie vystaveny ve tmě.

Nanočástice TiO₂ slouží jako fotokatalyzátor a lze je tak použít k fotodezinfekci vody. Nanočástice TiO₂ se absorpcí UV-A záření excitují za vzniku páru elektron-díra. Adsorbované ionty OH⁻ na povrchu nanočástic TiO₂ reagují s dírami za vzniku OH radikálu OH[•], které jsou zodpovědné za destrukci mikroorganismů[15]. Účinnost dezinfekce závisí na koncentraci nanočástic TiO₂, koncentraci buněk a na pH roztoku. Účinnost sterilizace se zvyšující se koncentrací nanočástic prvně roste až do dosažení svého maxima. Poté začíná klesat. Pokles účinnosti sterilizace při vyšších koncentracích nanočástic TiO₂ je způsoben absorpcí a rozptylem UV záření na nanočásticích TiO₂ ve vnější vrstvě jejich roztoku. Díky tomu záření není schopno dostat se k nanočásticím uprostřed roztoku a účinnost sterilizace tím pádem klesá. Účinnost sterilizace nanočástic TiO₂ o velikosti 7 nm imobilizovaných na vrstevnaté kadmennaté hlíně byla největší při koncentraci 6 g/l. Účinnost sterilizace nanočástic TiO₂ o velikosti 21 nm byla největší při koncentraci 1 mg/ml. Účinnost sterilizace též klesá s rostoucí koncentrací bakterií díky tvorbě agregátů nanočástic TiO₂ s bakteriemi. Záření není schopno k nanočásticím uvnitř agregátů a sni-

žuje se tak účinnost sterilizace. Největší efektivita sterilizace byla pozorovaná při pH 4 díky adsorpci H⁺ iontů na nanočástice TiO₂ a jejich následné interakci se záporně nabitou membránou bakterií.[66]

1.3.4.2 CeO₂

U nanočástic CeO₂ o velikosti 7 nm byla pozorována toxicita vůči *Escherchia coli*. Ta mohla být způsobena oxidací bakterií díky redukcí Ce^{IV} na Ce^{III}. Toxicita nanočástic CeO₂ vůči *E. coli* byla pozorována pokud jim *E. coli* byly vystaveny v roztoku KNO₃, ale ne pokud jim byly vystaveny v růstovém médiu.[70]

Nanočástice CeO₂ jsou schopny ochránit buňky před oxidačním stresem. U fagocitů RAW264.7 a BEAS-2B bronchiálních epitelových buněk, které byly vystaveny prooxidativnímu organickému DEP extraktu a nanočásticím CeO₂, byl pozorován pokles koncentrace superperoxidu uvnitř buňky a pokles mrtvých buněk oproti buňkám, které byly vystaveny pouze extraktu bez nanočástic[51]. Stejný ochranný efekt nanočástic CeO₂ byl také pozorován u nervových buněk HT22, které byly vystaveny toxické koncentraci glutamátu a u prsních epitelových buněk CRL8798 ozářených UV zářením. Díky kyslíkovým vakancím obsahují nanočástice CeO₂ kromě Ce⁴⁺ také Ce³⁺. Ce³⁺ může reagovat s ROS za vzniku Ce⁴⁺ a tímto způsobem vychytávat ROS.[69, 71].

1.3.4.3 MgO

Nanočástice MgO vykazovaly toxicitu vůči bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* a *S. aureus*.

Toxicita nanočástic MgO závisí na jejich velikosti a na prostředí, ve kterém jim byly buňky vystaveny. Nanočástice MgO o velikosti 23 nm byly toxičtější než nanočástice o velikosti 18 nm. Toxicita nanočástic MgO vůči *E. coli*, *S. aureus* byla menší, pokud jim byly bakterie vystaveny v růstovém médiu, než když jim byly vystaveny ve fyziologickém roztoku.[73]

Toxicitu nanočástic MgO jde zvýšit adsorpcí halogenů na povrch těchto nanočástic. Tato toxicita může být způsobena jejich interakcí s membránou nebo generací ROS.[72, 73]

1.3.4.4 CuO

Nanočástice CuO vykazovaly toxicitu vůči *V. fisheri* a kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*. Tato toxicita byla s největší pravděpodobností způsobena ionty Cu²⁺, vzniklými rozpouštěním nanočástic CuO. Ionty Cu²⁺ byly totiž toxické vůči oběma těmito mikroorganismům. Nanočástice CuO jsou však vůči *V. fisheri* méně toxické než měďnatá sůl (koncentrace iontů Cu²⁺ v roztoku nanočástic a soli byla stejná). U kvasinek je tomu naopak. Nanočástice CuO jsou toxičtější než měďnatá sůl (koncentrace byla opět stejná). Toxicita nanočástic CuO vůči kvasinkám mohla být tedy způsobena i jinými faktory než ionty Cu²⁺. Toxicita nanočástic CuO vůči oběma těmito mikroorganismům byla větší než toxicita mikročástic CuO.[50, 53].

1.3.4.5 SiO₂

Nanočástice SiO₂ vykazují malou antibakteriální aktivitu vůči *E. coli* a *B. Subtilis* a malou toxicitu vůči primárním myším embryonálním fibroblastům (PMEF), epitelovým buňkám rakoviny prsu (MDA-MB-231) a epitelovým buňkám z pupeční žíly (HUVEC)[49, 56, 76]. Tato toxicita mohla být způsobena

tvorbou ROS. U PMEF buněk vystavených nanočásticím SiO₂ byla pozorovaná tvorba MDA a vzrůst koncentrace ROS uvnitř buněk. U PMEF buněk vystavených nanočásticím SiO₂ bylo pozorované poškození DNA[56]. Nanočástice SiO₂ jsou dále toxické vůči A549 buňkám (buňky získané z bronchioloalveolárního karcinomu). Vystavení A549 buněk nanočásticím SiO₂ vedlo k poškození jejich membrány, k tvorbě vnitro-buněčného ROS, poklesu koncentrace glutathionu (GSH tripeptidu, který slouží jako antioxidant) a tvorbě MDA.[74].

Toxicita nanočástic SiO₂ vůči HUVEC a MDA-MB-231 buňkám byla závislá na modifikaci jejich povrchu. Kladně nabitě nanočástice s povrchem modifikovaným aminosilanovými skupinami byly toxičtější než nanočástice SiO₂ s nemodifikovaným povrchem.[76]

Na druhou stranu nebyla zaregistrována toxicita nanočástic SiO₂ vůči lidským dermálním mikrovaskulárním endotelovým buňkám (HDEMEC), mezenchymálním kmenovým buňkám (hMSCs) a 3T3-L1 buňkám (buňkám z myšního embrya). I když nanočástice SiO₂ nebyly toxické vůči HDEMEC, byly u nich schopny vyvolat protizánětlivou reakci, jak naznačovala zvýšená koncentrace IL-8 proteinu.[75]

Ve studii [77] byl též pozorován průnik nanočástic SiO₂ o velikosti 40 a 70 nm do jádra HEp-2 buněk (buňky lidského epitelu). To mělo za následek vznik klastrů topoizomerázi-1 (enzym, který má na starost uvolnění helikální tenze při transkripci DNA). Tyto klastry kromě topoizomerázi-1 obsahují i další jaderné proteiny, například fibrillarín, histiny a p80 coilin. Klastry topoizomerázi-1 též byly lokalizované na stejném místě jako polyQ proteiny (proteiny obsahující sekvenci z glutaminu; prodloužení této glutaminové sekvence je příčinou polyQ chorob jako je např. Huntington). Vznik těchto klastrů má za následek pokles transkripce a replikace DNA a proliferace HEp-2 buněk.

1.3.4.6 Fe₂O₃

Nanočástice Fe₂O₃ byly toxické vůči fibroblastům [78]. Tyto nanočástice nevykazovaly toxicitu vůči buňkám cévního endotelu, BRL 3A nesmrtelným krysím buňkám, Neuro-2A myším buňkám neoroblastomu ani bakteriím *S. Aureus*[59, 48, 60]. U buněk cévního endotelu vystavených nanočásticím Fe₂O₃ nebyla pozorována protizánětlivá reakce.[60]

Pozorovaná toxicita nanočástic Fe₂O₃ vůči fibroblastům závisela na jejich povrchové modifikaci. Viabilita fibroblastů inkubovaných po dobu 24h s 2 mg/ml nanočástic Fe₂O₃ byla 60 %, kdežto viabilita fibroblastů vystavených po stejnou dobu nanočásticím Fe₂O₃, potažených pullulanem (druh polysacharidu) o stejné koncentraci, byla 92 %. Nanočástice Fe₂O₃ způsobily jinou změnu morfologie fibroblastů než nanočástice Fe₂O₃ s povrchem modifikovaným pullulanem. Fibroblasty vystavené nemodifikovaným nanočásticím Fe₂O₃ byly menší oproti kontrolním buňkám a bylo u nich pozorováno poškození aktinových vláken a struktur z mikrotubulů na okraji a uprostřed fibroblastů. Na druhou stranu vystavení fibroblastů nanočásticím Fe₂O₃ potažených pullulanem vedlo k difúzi tubulinu a vzniku buněčných výčnělků.[78]

2 Praktická část

2.1 Použité mikroorganismy a chemikálie

V této práci byla použita bakterie *Escherichia coli*. Kultura byla poskytnuta VŠCHT v Praze, fakultou potravinářské a biochemické technologie, Ústavem biochemie a mikrobiologie. Bakterie byly kultivovány na živné půdě Plate Count agar od společnosti HIMEDIA, 500 g. Použité nanočástice byl oxid zinečnatý dopovaný galiem ZnO:Ga. Jednalo se o bílý prášek. Tyto nanočástice, byly vyrobeny na ČVUT, Fakultě jaderné, fyzikálně inženýrské, katedře jaderné chemie. Nanočástice byly při výrobě žíhány při teplotě 200 °C, 400 °C, 600 °C, 800 °C a 1000 °C. Každá teplota žíhání odpovídá nanočásticím o jiné velikosti. Velikost nanočástic byla změřena pomocí elektronové rentgenové difrakce (XRD). Další použitou chemikálií byl chlorid sodný o čistotě p.a. od výrobce LACHEMA, 500 g.

2.2 Sterilizace

Při práci s buňkami je kladen důraz na sterilní prostředí a tím zabránění kontaminaci jinými organismy. Všechny nástroje použité k práci byly proto před použitím sterilizovány.

Špičky a fyziologický roztok (0,9 % roztok chloridu sodného) připravený v Erlenmayerově baňce rozpuštěním 2,7 g chloridu sodného v 300 ml destilované vody byly sterilizovány v autoklávu Tuttnauer 2540M s objemem komory 23 L (obr. 2.1). Sterilizace probíhala v přítomnosti vodní páry při teplotě 121 °C po dobu 35 min. Dosažení požadované teploty bylo indikováno změnou zbarvení indikační pásky umístěné na zásobníku špiček a baňkách.

Živné půdy (agary) připravené rozpuštěním 6,5 g agarového prášku v 250 ml destilované vody byly taktéž sterilizované v autoklávu. Agary byly sterilizované při teplotě 121 °C po dobu 40 min. Petriho misky a plastové zkumavky byly dodány již sterilní (radiační sterilizace zářením gama).

Se vzorky bylo manipulováno v laminárním boxu Aura Mini od firmy Bio Air (obr. 2.2) za účelem zvýšení sterility prostředí.

Zásobní suspenze bakterií byla připravena naočkováním bakterií (bakterie byly staré 2 dny) z živného agaru v Petriho misce do fyziologického roztoku. K očkování se použilo kovové očko, které bylo sterilizováno v plamenu lihového kahanu. Očko se před použitím nechalo v boxu vychladit, aby nedošlo k neúmyslnému zabití bakterií.



Obrázek 2.1: Autokláv Tuttnauer 2540M s objemem komory 23 L



Obrázek 2.2: Laminární boxu Aura Mini od firmy Bio Air.

Roztírání suspenze s bakteriemi na živný agar bylo provedeno pomocí skleněných tyčinek ve tvaru L tzv. hokejek. Tyto tyčinky byly sterilizované v autoklávu při teplotě 121 °C a po dobu 35 minut. K zajištění sterility se taktéž tyčinky před každým použitím namočily do ethanolu, který se následně zapálil v plameni lihového kahanu. Tyčinky se před použitím nechaly vychladit v boxu. Aby nedošlo k neúmyslnému zabití bakterií, tak se osvědčilo střídání těchto tyčinek při očkování suspenze buněk na. První tyčinka byla použita k očkování bakterií na agar a druhá mezitím chladla v boxu.

2.3 Příprava vzorků, provedení experimentu a kultivace

Sterilizovaný agar byl nalit na Petriho misky v laminárním boxu a nechal se ztuhnout. Po ztuhnutí byly misky umístěny dnem vzhůru do termostatu, kde se nechaly vyschnout. Tyto misky byly minimálně po dvou dnech (doba vyschnutí) využity k experimentu.

Byl připraven zásobní roztok nanočástic ZnO:Ga o koncentraci 1 mg/ml nanočástic. Zásobní roztok nanočástic byl těsně před provedením experimentu umístěn na ultrazvuk, aby se rozbily agregáty

nanočástic. Tento zásobní roztok s rozbitými částicemi byl využit k vytvoření roztoků o koncentraci 0,2 mg/ml; 0,5 mg/ml a 0,9 mg/ml nanočástic a finálnímu objemu 10 ml poté, co k nim byl přidán 1 ml zásobní suspenze bakterií.

Požadovaná koncentrace bakterií v zásobní suspenzi činila 10^6 - 10^7 bakterií/ml. Zda-li bylo dosaženo této koncentrace, se ověřilo pomocí UV-VIS spektrofotometru Genesys 20 od firmy Thermo scientific (obr. 2.3). Při této koncentraci byla hodnota absorbance 10krát zředěné suspenze měřené při vlnové délce 540 nm 0,04 - 0,06. Tato skutečnost vyplývá z práce J. Červenáka [79]. Ze zásobní suspenze byl odpipetován 1 ml a ten byl přidán k roztoku nanočástic. Před každou manipulací, aby byla zajištěna reprodukovatelnost výsledků, byla zásobní suspenze promíchána na orbitální třepačce MS3 basic od firmy IKA (obr. 2.4). Zkumavky s roztokem nanočástic a bakteriemi a jedna zkumavka (kontrolní) suspenze bakterií bez nanočástic byly umístěny na vodní lázeň Wisd od firmy Witeg (obr. 2.5). Na ní byly ponechány za stálého třepání (120 ot./min) po dobu 4 h. Po 0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h a 4 h, byla odebrána část kontrolní suspenze a část suspenzí bakterií s nanočásticemi a zředěná, tak aby v $100 \mu\text{l}$ z takto zředěných suspenzí bylo přibližně několik stovek buněk. $100 \mu\text{l}$ z takto zředěných suspenzí se odebralo a naočkovalo výše popsáním způsobem na Petriho misky.



Obrázek 2.3: UV/VIS spektrofotometr Genesys 0 od firmy Thermo scientific



Obrázek 2.4: Orbitální třepačka MS3 basic od firmy IKA.



Obrázek 2.5: Vodní lázeň Wisd od firmy Witeg.

Petriho misky s naočkovanými bakteriemi a otočené dnem vzhůru (v závěsu) se nechaly inkubovat 3-4 dny při teplotě 37 °C v termostatu Lovibond ET 618 od firmy Liebherr (obr. 2.6). Vyrostlé kolonie byly počítány pomocí speciální počítačky Schuett count od firmy Schuett biotec (obr.2.7). Jednotlivé kolonie byly označeny pomocí fixu na dno misky. Počítačka snímala dotyk fixem a zaznamenala počet dotyků. Experiment byl vždy opakován třikrát pro nanočástice žíhané na stejnou teplotu.



Obrázek 2.6: Termostatu Lovibond ET 618 od firmy Liebherr.



Obrázek 2.7: Speciální počítáčka Schuett count od firmy Schuett biotec.

2.4 Vyhodnocení experimentálních dat

Pro každou koncentraci nanočástic c_n (0; 0,2; 0,5 a 0,9 mg/ml) žíhaných při teplotě T a každý čas vystavení nanočástic bakteriím t (0,5; 1; 2 ;3 ;4 h) byly vyočkovány tři misky. Z počtů kolonií $N_{c_n,t}$ vyrostlých na příslušné trojici Petriho misek (tzn. Kolonie, které vyrostly z bakterií vystavených nanočásticím o stejné koncentraci nanočástic c_n žíhané při stejné teplotě T po stejnou dobu t) se vypočítal počet buněk v suspenzi před ředěním $n_{i,c_n,t,T}$ podle vzorce

$$n_{i,c_n,t,T} = N_{i,c_n,t,T} \cdot \text{redeni.} \quad (2.1)$$

Dále se vypočítala průměrná hodnota počtu buněk $\overline{n_{c_n,T,t}}$ vystavených nanočásticím o koncentraci c_n žíhaných při teplotě T po dobu t

$$\overline{n_{c_n,T,t}} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} n_{i,c_n,T,t}}{i}, \quad (2.2)$$

kde $n=2; 3$. Pokud $n=2$, tak byla nějaké hodnota $n_{i,c_n,T,t}$ odstraněna na základě Deanova a Dixonova testu na odlehle hodnoty. Tyto průměry se použily k vypočítání frakce přeživších buněk S_i vystavených

nanočásticím o koncentraci c_n vyžíhané při teplotě T podle vzorce

$$S_i = \frac{\overline{n_{c_n;T;t}}}{n_{c_n;T;0,5}}, \quad (2.3)$$

kde $\overline{n_{c_n;T;0,5}}$ je průměrný počet buněk vystavených nanočásticím o koncentraci c_n po dobu $t = 0,5$ h a $\overline{n_{c_n;T;t}}$ je průměrný počet buněk vystavených nanočásticím o koncentraci c_n po dobu t .

Z S_i získaných pro 3 experimenty, které byly provedeny pro nanočástice žíhané při stejné teplotě, byl vypočítán průměr \overline{S} podle vzorce

$$\overline{S} = \frac{\sum_{i=1}^3 S_i}{i}. \quad (2.4)$$

Hodnoty \overline{S} se vynesly do grafu v závislosti na čase. Tato závislost byla proložena lineární funkcí

$$y = a \cdot x + b. \quad (2.5)$$

Směrnice a a její odchylka σ_a byla získána v excelu za pomoci funkce Lingrese. Z hodnot směrnice a pro jednotlivé koncentrace nanočástic se vypočítala průměrná směrnice \overline{a} pro nanočástice žíhané při teplotě T . Na základě hodnot a a \overline{a} byla určena toxicita nanočástic.

Deanův a Dixonův test na odlehle hodnoty byl proveden následovně. Nejdříve byl vypočítán variační rozptyl R podle vzorce

$$R = n_{max,c_n,t,T} - n_{min,c_n,t,T}, \quad (2.6)$$

kde $n_{max,c_n,t,T}$ je maximální naměřená hodnota počtu buněk vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě T o koncentraci c_n po dobu t a $n_{min,c_n,t,T}$ je minimální naměřený počet buněk vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě T o koncentraci c_n po dobu t . Dále se vypočítaly koeficienty

$$Q_{max} = \frac{n_{max,c_n,t,T} - n_{2max,c_n,t,T}}{R} \quad (2.7)$$

$$Q_{min} = \frac{n_{2min,c_n,t,T} - n_{min,c_n,t,T}}{R}, \quad (2.8)$$

$n_{2max,c_n,t,T}$ a $n_{2min,c_n,t,T}$ je druhá největší a druhá nejmenší hodnota počtu buněk vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě T o koncentraci c_n po dobu t . Pokud hodnota Q_{max} nebo Q_{min} byla větší než hodnota $Q_{krit} = 0,941$, tak byla příslušná hodnota $n_{max,c_n,t,T}$ nebo $n_{min,c_n,t,T}$ odstraněna.

Dále byla též vypočítána směrodatná odchylka průměrného počtu buněk $\sigma_{\overline{n}}$ vystavených nanočásticím žíhaných na teplotu T o koncentraci c_n po dobu t podle vzorce

$$\sigma_{\overline{n}} = R \cdot k_3. \quad (2.9)$$

nebo

$$\sigma_{\overline{n}} = R \cdot k_2, \quad (2.10)$$

pokud byla odstraněna jedna hodnota $n_{i,c_n,t,t}$, $k_3 = 1,3$ a $k_2 = 6,3$ jsou konstanty.

Směrodatná odchylka \overline{S} $\sigma_{\overline{S}}$ se vypočítala podle vzorce

$$\sigma_{\overline{S}} = \sigma_{\overline{S},1} + R_S \cdot k_3, \quad (2.11)$$

kde R_S je variační odchylka hodnot S a $\sigma_{\bar{S},1}$ je směrodatná odchylka vypočítaná pomocí zákona o šíření chyb

$$\sigma_{\bar{S},1} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\delta \bar{S}}{\delta x_i} \right)^2 \cdot \sigma_{x_i}^2}, \quad (2.12)$$

kde x_i je proměnná, z které se použila k vypočítání \bar{S} a σ_{x_i} její odchylka.

Na základě zákona o šíření chyb byla též vypočítaná odchylka \bar{a} .

2.5 Rentgenová difrakce (XRD)

Ke změření velikosti krystalitů nanočástic a stanovení jejich fázové byla použita rentgenová difrakce. Při této metodě je vzorek ozařován rentgenovým zářením. Rentgenové paprsky se rozptylují (difraktují) na atomech krystalu. Difraktované paprsky pak spolu interferují. Ke konstruktivní interferenci dochází pokud je splněna Braggova podmínka

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta. \quad (2.13)$$

λ je v této rovnici vlnová délka rentgenového záření, n je celé číslo, d je vzdálenost mezi rovinami v krystalu s identickým rozložením atomů, θ je úhel, pod kterým dopadají rentgenové paprsky na strukturální roviny krystalu. Výsledkem měření je difraktogram tj. závislosti intenzity rentgenového záření na úhlu, který svírá primární svazek rentgenového záření s detektorem 2θ . Pokud při daném úhlu došlo ke splnění Braggovy podmínky a konstruktivní interferenci, na difraktogramu se objeví pík. [80]

K měření velikosti nanočástic, lze též použít dynamického rozptylu světla (DLS). DLS je založená na sledování fluktuací intenzity rozptýlené světla způsobených Brownovým pohybem částic.

Vzorky byly připraveny nanášením a přitlačením prášku ZnO:Ga na skleněnou destičku. Měření jednotlivých prášků se provedlo na difraktometru MiniFlex600 (obr. 2.8). Měření bylo provedeno v rozsahu 2θ úhlů $20-80^\circ$ u vzorků ZnO:Ga žíhaného při 400, 600, 800 a 1000 °C. U vzorku ZnO:Ga žíhaného při 200 ° bylo měření provedeno v rozsahu úhlů 2θ $10-80^\circ$. Rychlost měření byla $2^\circ/\text{min}$. Napětí na měděné rentgence bylo 40 kV a proud na rentgence byl 15 mA.



Obrázek 2.8: Difraktometr MiniFlex100.

K vyhodnocení naměřených dat byl použit program Rigaku PDXL2. Naměřené difraktogramy byly porovnány s databází k ověření čistoty fáze ZnO. Pomocí tohoto programu se též odečetly integrální šířky píky β (šířka, kterou by měl obdélník se stejnou výškou a plochou jako difrakční pík) a úhlu 2θ , při kterém byl příslušný pík zaregistrován. Tento program také poskytl jejich nejistoty.

Velikost krystalitů byla určena pomocí Halder-Wagnerovy rovnice z rozšíření difrakčních linií, vyjádřeném integrální pološířkou β . Halder-Wagnerova rovnice má tvar

$$y = a \cdot x + b \quad (2.14)$$

$$x = \frac{\beta_{\text{sample}}}{\tan\theta \cdot \sin\theta} \quad (2.15)$$

$$y = \frac{\beta_{\text{sample}}^2}{\tan^2\theta} \quad (2.16)$$

$$a = \frac{K \cdot \lambda}{l} \quad (2.17)$$

$$b = \eta^2, \quad (2.18)$$

kde $\lambda = 0,154059$ nm je vlnová délka rentgenového záření, $K = 1,0747$ je Scherrerova konstanta, η je mikrostrukturální napětí, l je velikost krystalitů, β_{sample} je integrální šířka píky, θ je polovina úhlu, který svírá primární svazek rentgenového záření z detektorem, při kterém byl zaregistrován pík. β_{sample} je vypočítané odečtením naměřené integrální šířky píky β a přístrojové šířky $\beta_{\text{ins}} = 0,177$. Pro každý pík s daným úhlem 2θ a integrální šířkou píky β byla vypočítána dvojice x a y podle rovnic (2.15)(2.16), která byla vynesena do grafu a proložena funkcí (2.14) v analyzační tabulce v MS Excel metodou vážené lineární regrese. Touto regresí byl stanoven parametr a a jeho nejistot σ_a . Z parametru a byla vypočítána

velikost krystalitů podle vzorce

$$l = \frac{K\lambda}{a}. \quad (2.19)$$

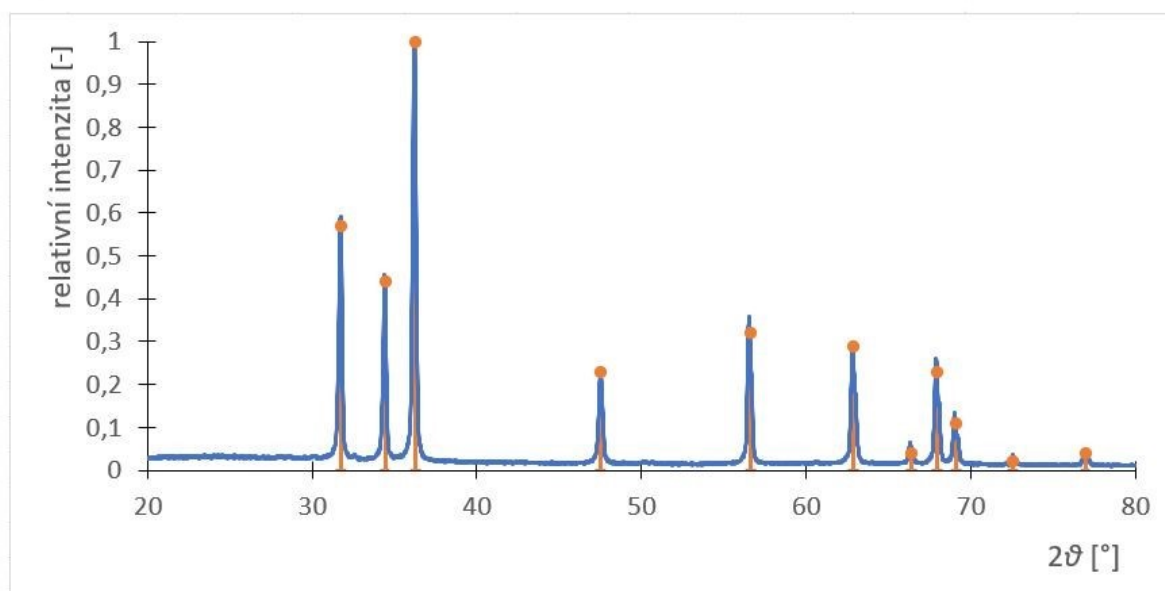
Nejistota velikosti krystalitů σ_l byla vypočítána ze σ_a podle zákona o šíření chyb

$$\sigma_l = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\delta l}{\delta a}\right)^2} \cdot \sigma_a. \quad (2.20)$$

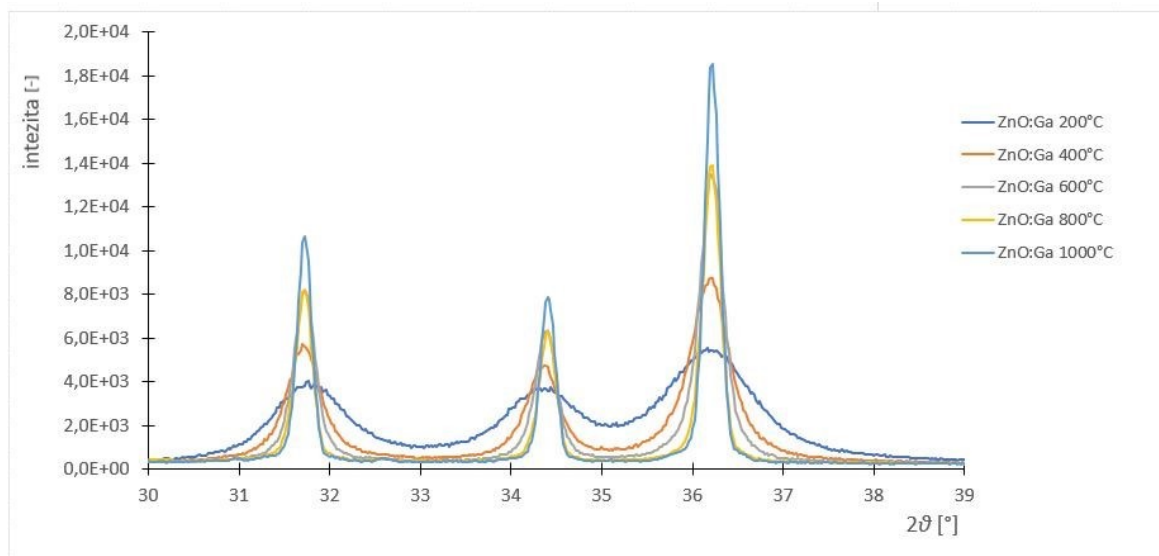
3 Výsledky a diskuze

3.1 Rentgenová difrakční analýza XRD

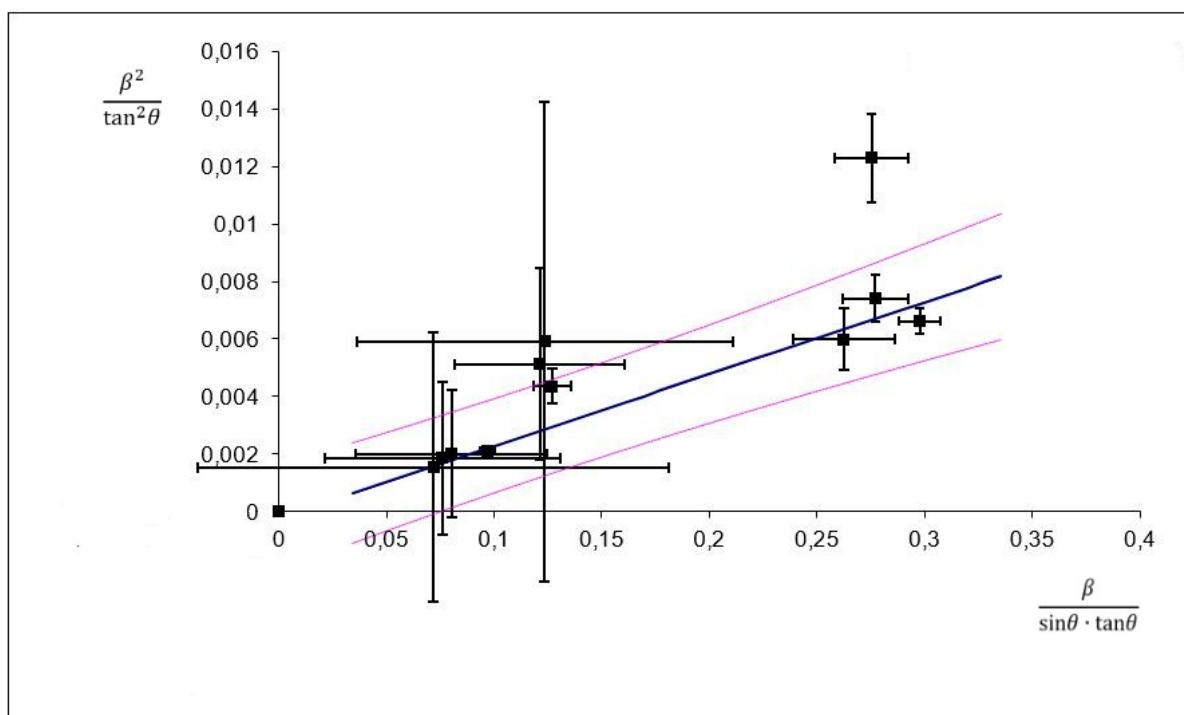
Naměřené difraktogramy vzorků ZnO:Ga (Graf 1, 2) vykazují difrakční píky perfektně odpovídající databázovým záznamům ZnO a tak prokázaly, že ve vzorcích byla přítomna pouze čistá fáze ZnO.



Graf 1: Difraktogram ZnO:Ga žíhaného na 800 °C.



Graf 2: Výšeč z difraktogramů ZnO:Ga žíhaných při 200, 400, 600, 800 a 1000 °C.



Graf 3: Halder-Wagnerova linearizace - proložení bodů x a y lineární funkcí $y = a \cdot x + b$. Hodnoty x a y byly vypočítány z hodnot β a θ píků odečtených z difraktogramu ZnO:Ga žíhaného na 200 °C.

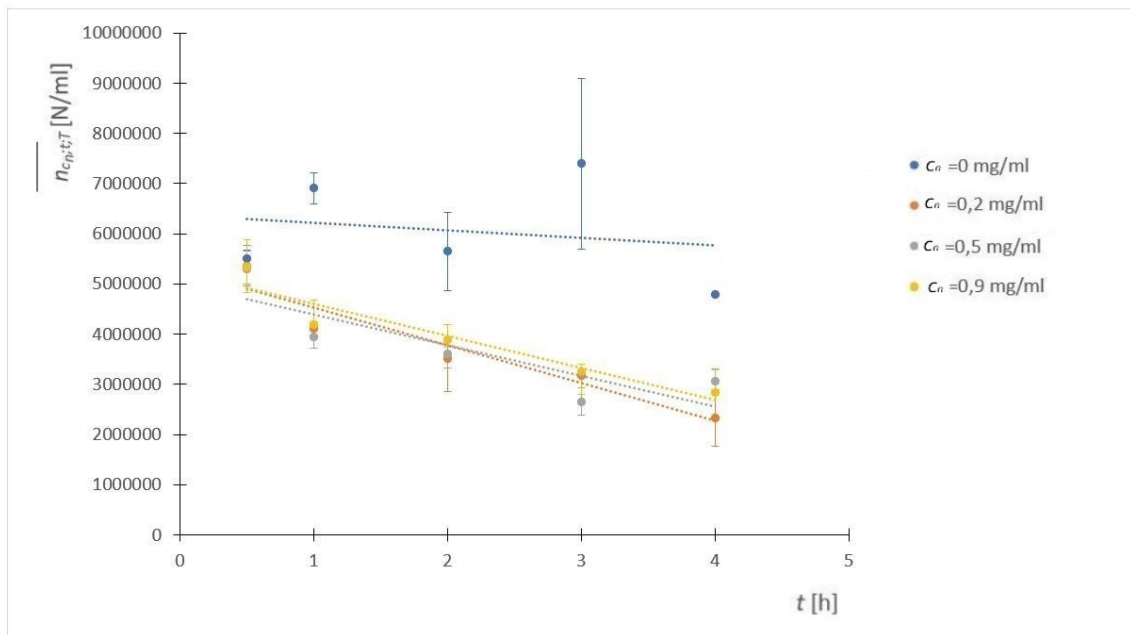
Tabulka 3.1: Hodnoty velikosti krystalitu l a jejich odchyly σ_l ZnO:Ga žíhaných při teplotě T a tvar Halder-Wagnerovy rovnice pro ZnO:Ga žíhaných při teplotě T .

T [°C]	rovnice	l [nm]	σ_l
200	$y=0,0250 \cdot x+0$	7	2
400	$y=0,0107 \cdot x+0$	15	4
600	$y=0,00508 \cdot x+0$	33	6
800	$y=0,00223 \cdot x+0$	74	10
1000	$y=0,000565 \cdot x+0$	290	70

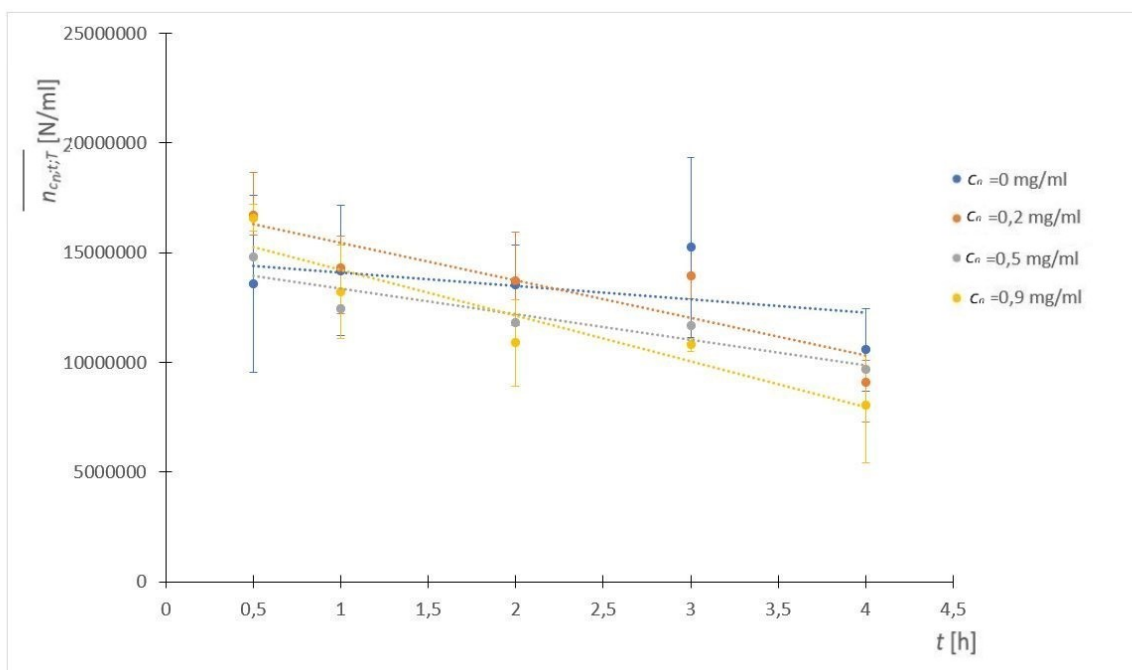
S rostoucí teplotou žíhání nanočástic, rostla velikost jejich krystalitů. To se projevilo na difrakto-gramu zužujícími se píky (Graf 2).

3.2 Toxicita

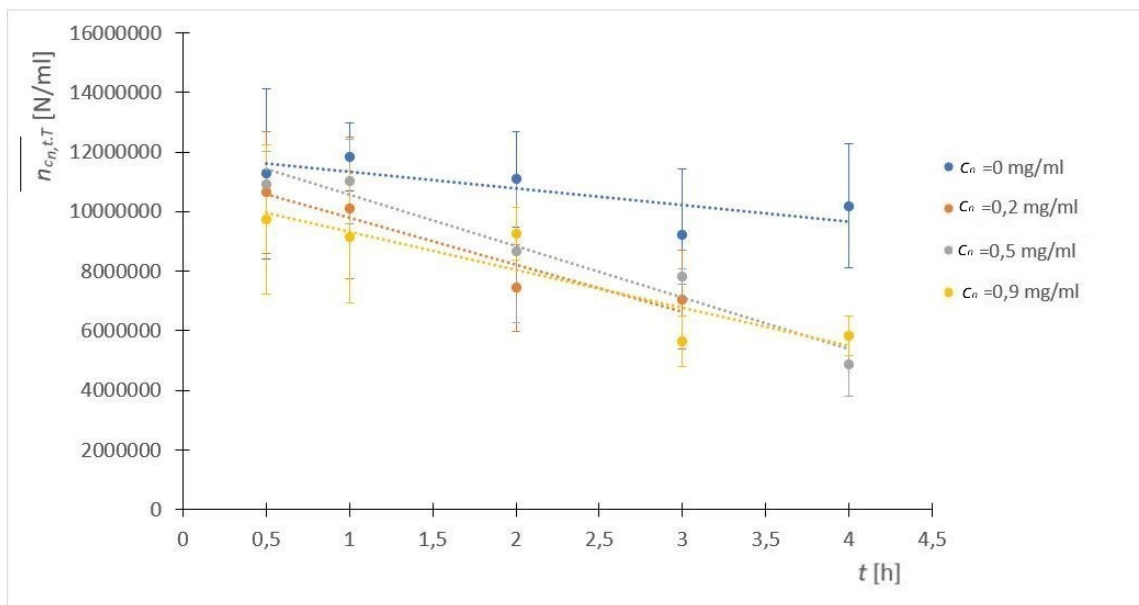
Na grafech 4, 5, 6, 7 a 8 lze vidět závislost průměrného počtu buněk $\overline{n_{c_n;T,t}}$ vystavených nanočásticím ZnO:Ga, žíhaných při teplotě T o koncentraci c_n , na čase t . (Jedná se o výsledky jednoho experimentu ze série tří, vybraného jako vzor). Na grafech 9, 10, 11, 12 a 13 lze vidět závislost průměrné frakce přeživších buněk \overline{S} vystavených nanočásticím ZnO:Ga žíhaných při teplotě T o koncentraci c_n na čase t (jedná se o průměrnou hodnotu ze tří provedených za stejných podmínek). V Tab. 3.2 jsou uvedeny hodnoty a , jedná se o směrnici závislosti frakce přeživších buněk \overline{S} na čase. Z grafu 2.17 lze vyčíst závislost průměrné směrnice \overline{a} poklesu hodnot frakce přeživších buněk \overline{S} vystavených nanočásticím ZnO:Ga na teplotě žíhání nanočástic T . Průměrná směrnice \overline{a} byla vypočítána z hodnot směrnice a získané pro různé koncentrace nanočástic žíhaných při stejné teplotě.



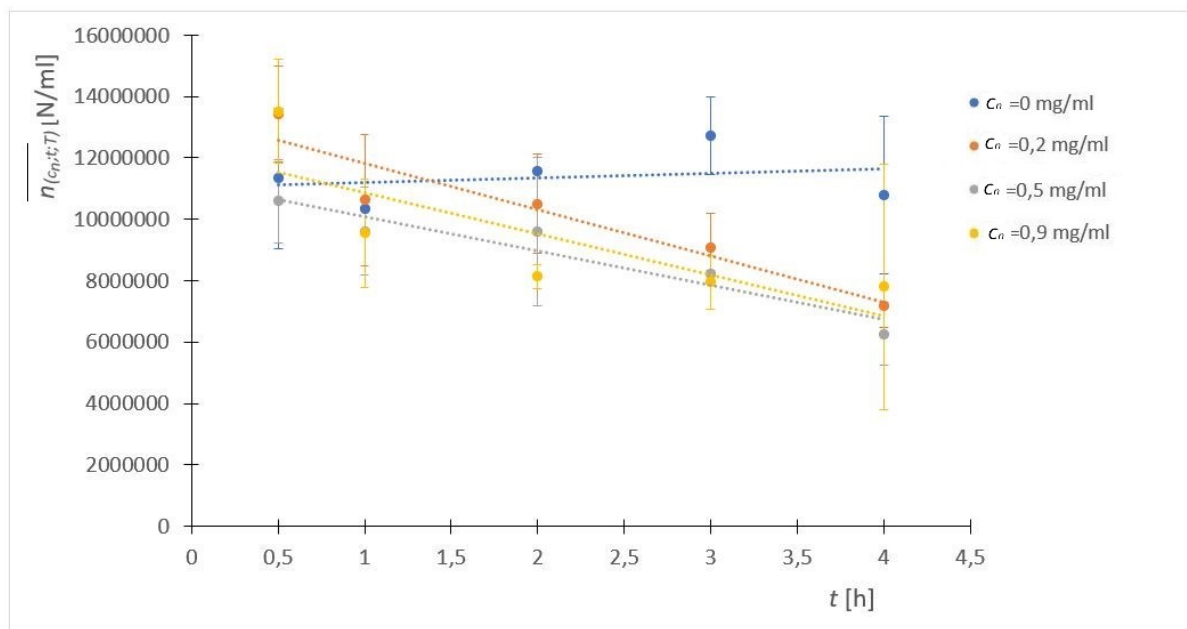
Graf 4: Závislost průměrného počtu buněk $\overline{n_{c_n;T,t}}$ vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 200 °C o koncentraci c_n na čase t



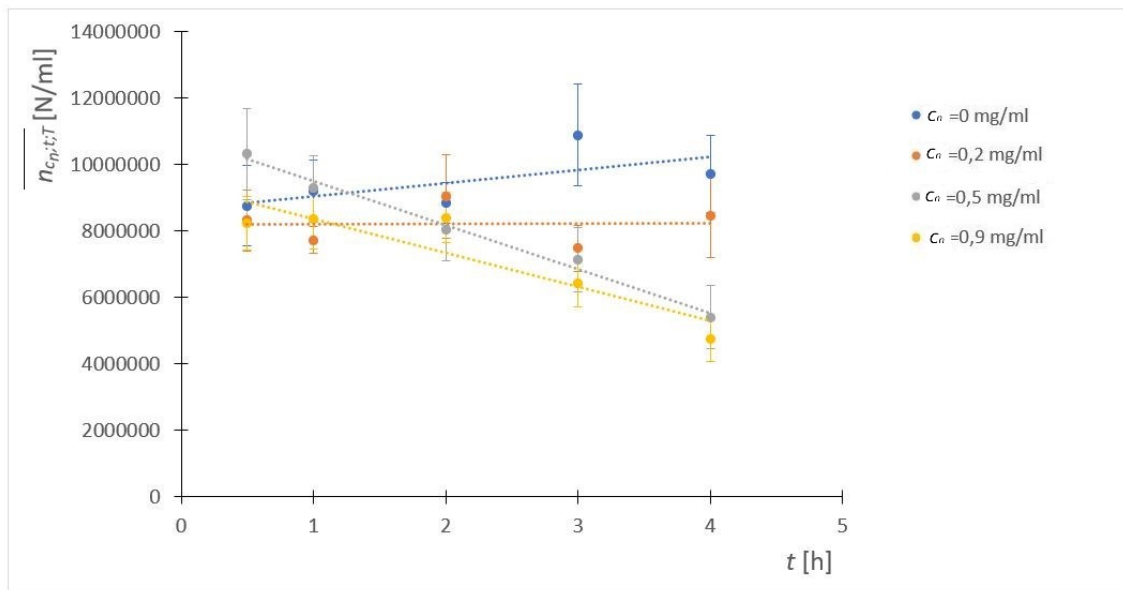
Graf 5: Závislost průměrného počtu buněk $\overline{n_{c_n;T,t}}$ vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 400 °C o koncentraci c_n na čase t



Graf 6: Závislost průměrného počtu buněk $\overline{n_{c_n;T}}$ vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 600 °C o koncentraci c_n na čase t

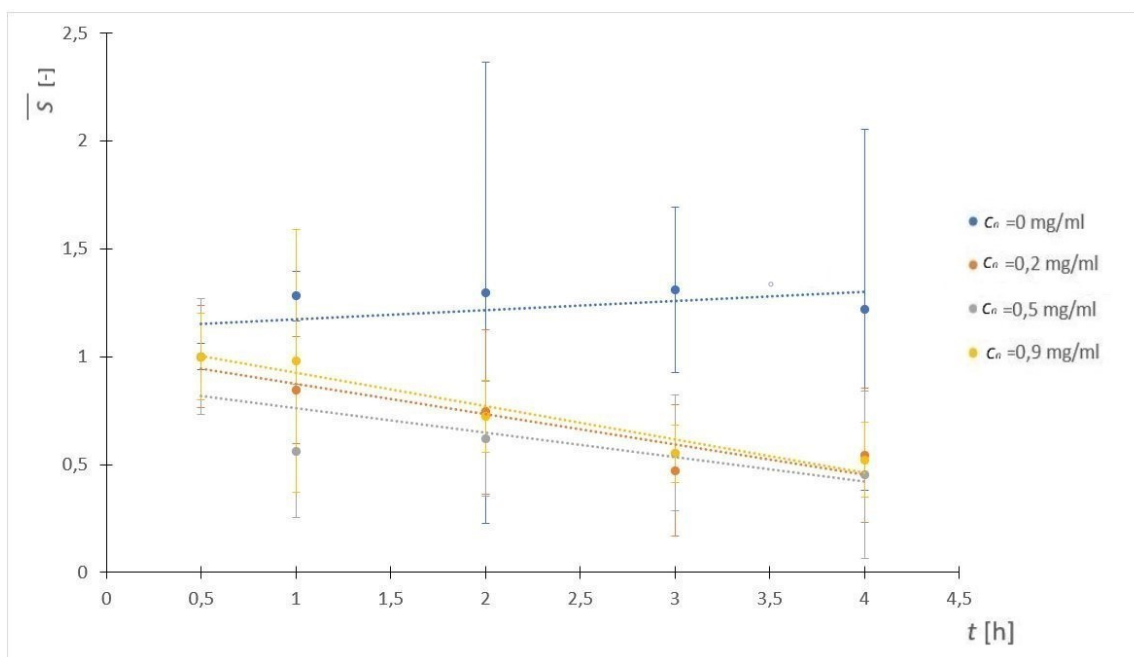


Graf 7: Závislost průměrného počtu buněk $\overline{n_{c_n;T}}$ vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 800 °C o koncentraci c_n na čase t

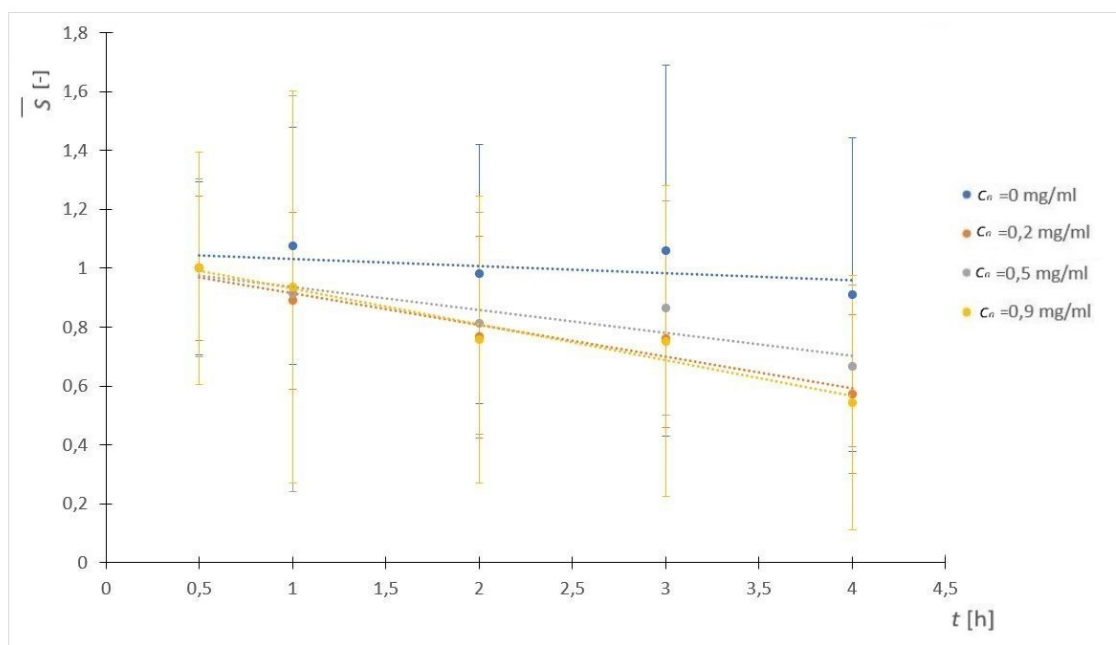


Graf 8: Závislost průměrného počtu buněk $\overline{n_{c_n;T,t}}$ vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 1000 °C o koncentraci c_n na čase t

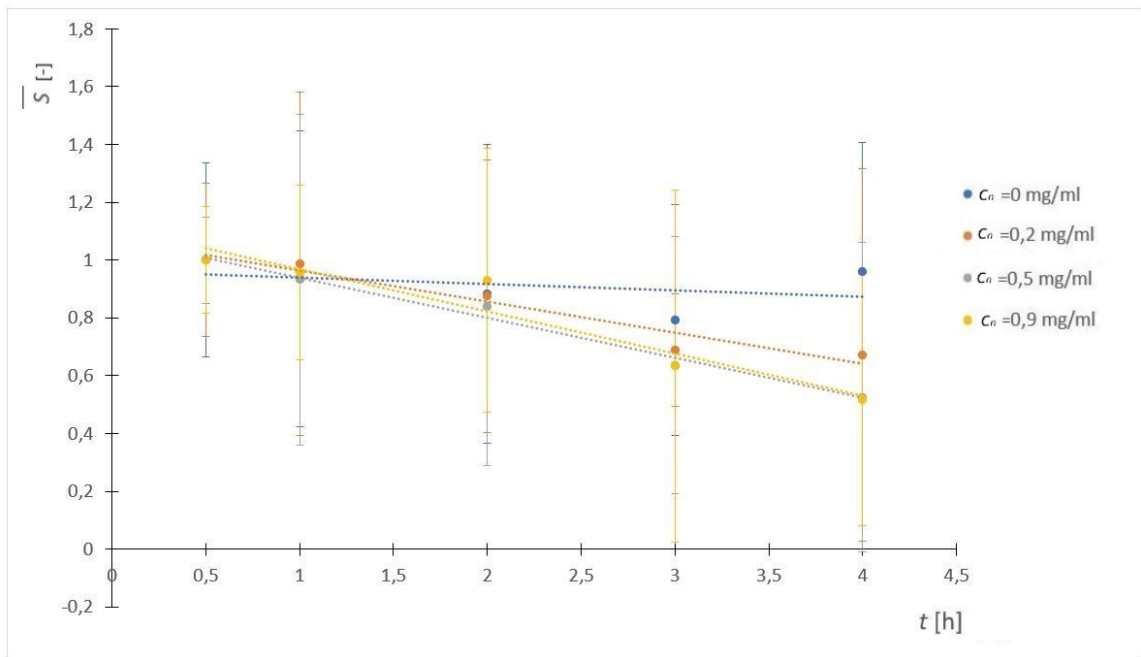
Na grafech 4, 5, 6, 7 a 8 lze vidět, že počet buněk vystavených nanočásticím klesá s časem. Počet buněk nevystavených nanočásticím se v čase téměř nemění, případně klesá, ale pomaleji než počet buněk vystavených nanočásticím. Toto naznačuje, že nanočástice ZnO:Ga jsou toxické vůči *E.coli* BDM 3125. V případě buněk vystavených 0,2 mg/ml nanočásticím žíhaných při teplotě 1000 °C byl také pozorován mírný růst jejich průměrného počtu s teplotou. Tento růst nebyl zaznamenán u dalších dvou experimentů provedených s těmito nanočásticemi. To naznačuje, že může jít o statistickou odchylku.



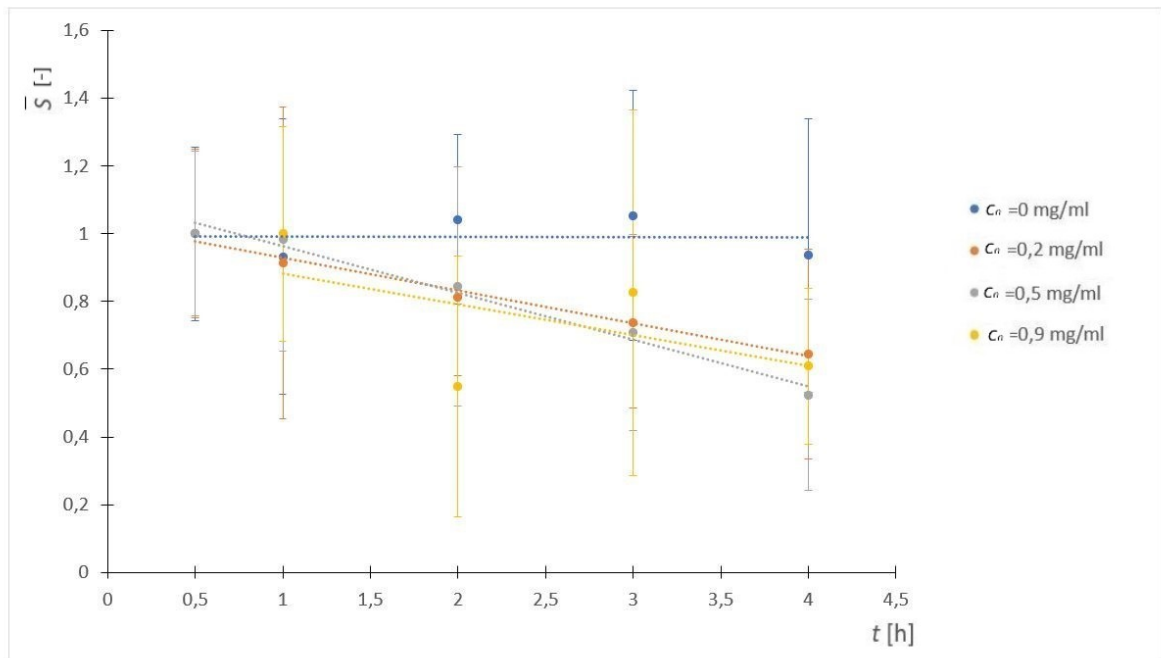
Graf 9: Závislost průměrné frakce přeživších buněk \bar{S} , vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 200 °C o koncentraci c_n ží, na čase t



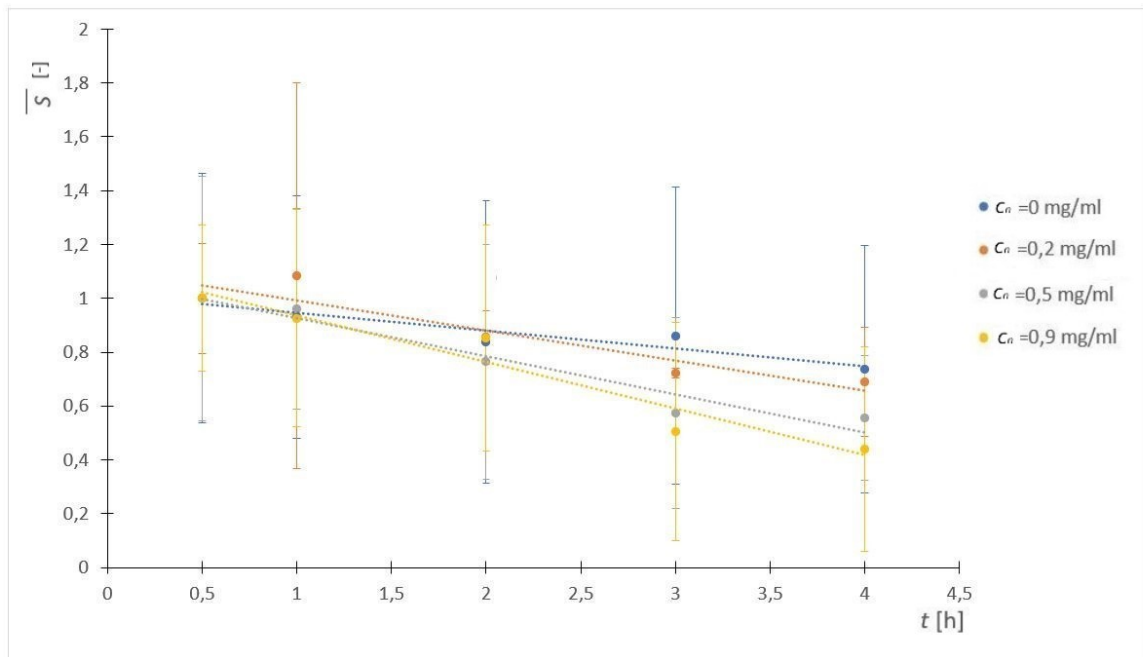
Graf 10: Závislost průměrné frakce přeživších buněk \bar{S} , vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 400 °C o koncentraci c_n , na čase t .



Graf 11: Závislost průměrné frakce přeživších buněk \bar{S} vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 600 °C o koncentraci c_n na čase t .



Graf 12: Závislost průměrné frakce přeživších buněk \bar{S} , vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 800 °C o koncentraci c_n na čase t .



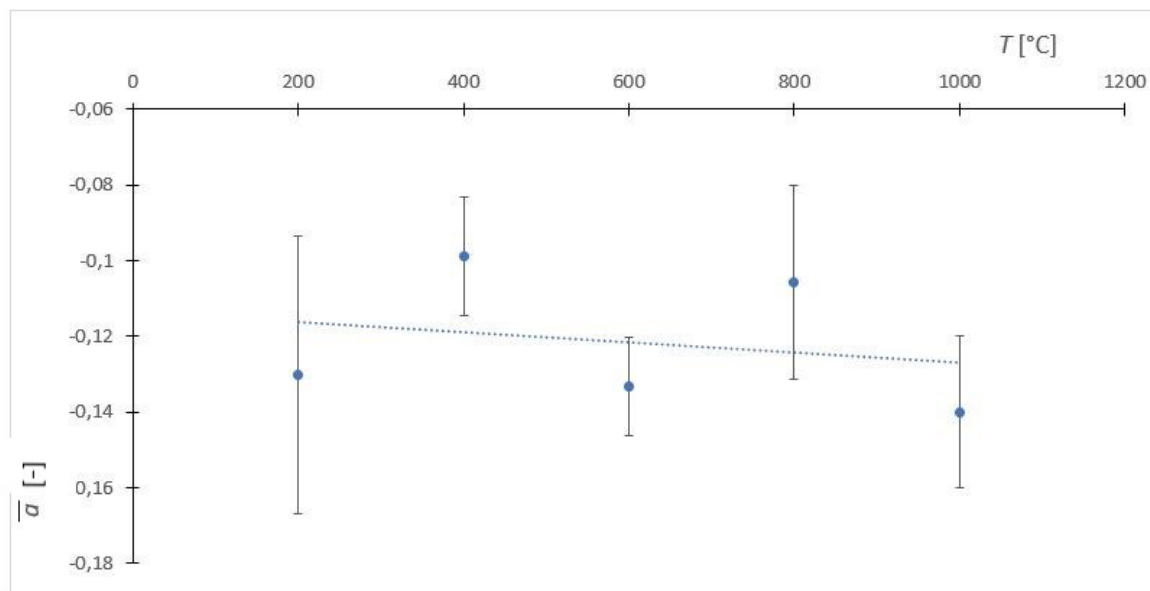
Graf 13: Závislost průměrné frakce přeživších buněk, \bar{S} vystavených nanočásticím žíhaných při teplotě 1000 °C o koncentraci c_n , na čase t .

Na grafech zobrazujících závislost průměrné frakce přeživších buněk \bar{S} na čase t (grafy 9, 10, 11, 12 a 13) lze vidět podobný trend jako na grafech zobrazující časovou závislost průměrného počtu $\overline{n_{c_n;T,t}}$. Průměrné frakce přeživších buněk \bar{S} vystavených nanočásticím klesá s časem podobně jako $\overline{n_{c_n;T,t}}$. Také, podobně jako u průměrného počtu buněk $\overline{n_{c_n;T,t}}$ nevystavených nanočásticím, průměrná frakce přeživších buněk \bar{S} nevystavených nanočásticím s časem se buď skoro nemění nebo mírně roste. Tento rozdíl v chování buněk vystavených a nevystavených nanočásticím je na těchto grafech lépe vidět než na grafech zobrazujících závislost $\overline{n_{c_n;T,t}}$ na čase. (Na těchto grafech se závislosti pro jednotlivé koncentrace nepřekrývají díky rozdílnému počátečnímu počtu buněk naměřenému pro jednotlivé koncentrace nanočástic.) Výjimku tvoří graf 13, kde jde vidět závislost průměrné frakce přeživších buněk \bar{S} vystavených nanočásticím žíhaných při teplotu 1000 °C. Na tomto grafu viditelně klesá i průměrná frakce přeživších buněk \bar{S} nevystavených nanočásticím, i když méně než průměrná frakce přeživších buněk \bar{S} vystavených nanočásticím. To je důsledkem toho, že ve dvou experimentech provedených s těmito nanočásticemi, jejichž výsledky zde nejsou uvedeny, taktéž frakce přeživších buněk S nevystavených nanočásticím klesala s časem. Vzhledem k tomu, že v třetím experimentu tento pokles nebyl pozorován, může se jednat pouze o statistickou odchylku. Data na grafech 9, 10, 11, 12 a 13, výrazněji naznačují že ZnO nanočástice jsou toxické.

Tabulka 3.2: Směrnice a změny průměrné frakce přeživších buněk \bar{S} vytavených nanočásticím žíhaných při teplotě T o koncentraci c_n čase t a její odchylka σ_a

ZnO:Ga 200°C			ZnO:Ga 400 °C			ZnO:Ga 600 °C			ZnO:Ga 800 °C			ZnO:Ga 1000 °C		
c_n	a	s_a	c_n	a	s_a	c_n	a	s_a	c_n	a	s_a	c_n	a	s_a
0	0,04	0,04	0	-0,02	0,02	0	-0,02	0,02	0	0	0,02	0	-0,06	0,01
0,2	-0,13	0,03	0,2	-0,107	0,017	0,2	-0,11	0,01	0	-0,097	0,007	0,2	-0,11	0,02
0,5	-0,11	0,06	0,5	-0,07	0,02	0,5	-0,14	0,009	0,2	-0,14	0,01	0,5	-0,14	0,02
0,9	-0,15	0,02	0,9	-0,12	0,01	0,9	-0,15	0,02	0,9	-0,08	0,06	0,9	-0,17	0,02

V Tab. 3.2 je uvedeno kvantitativní vyjádření závislosti \bar{S} na čase viditelných na grafech na grafech 9, 10, 11, 12 a 13 v podobě jejich směrnice a . Z dat v tab. 3.2 lze vyčíst, že hodnota směrnice a klesá s rostoucí koncentrací nanočástic. Tento pokles ale není ve většině případů statisticky významný.



Graf 14: Závislost průměrné směrnice poklesu hodnot frakce přeživších buněk \bar{S} vystavených nanočásticím žíhaných na teplotu T a na teplotě žíhání nanočástic T .

Na grafu 14 je možné vidět, že směrnice \bar{a} klesá s rostoucí teplotou T , při níž byly nanočástice žíhány a tím pádem s jejich velikostí. To naznačuje, že toxicita nanočástic ZnO:Ga mírně roste s rostoucí velikostí nanočástic. Z tohoto grafu lze vidět, že \bar{a} mírně klesá s rostoucí velikostí nanočástic. Tento výsledek nemusí být přesný vzhledem k agregaci nanočástic ZnO:Ga a komplikované reprodukovatelnosti mikrobiologických experimentů.

4 Závěr

- Experimenty byly provedeny s nanočásticemi ZnO:Ga o velikosti 7, 15, 33, 74 a 290 nm.
- Průměrný počet buněk bakterií *E. coli* $\overline{n_{c_i;T,t}}$ vystavených nanočásticím ZnO:Ga klesal s časem.
- Průměrná frakce přeživších buněk bakterií *E. coli* \overline{S} vystavených nanočásticím ZnO:Ga také klesala s časem.
- Tyto výsledky naznačují že nanočástice ZnO:Ga jsou pravděpodobně toxické vůči bakteriím *Escherichia coli* DBM 3125.
- Námi naměřená toxicita vůči *Escherichia coli* DBM 3125 mírně rostla s rostoucí velikostí nanočástic ZnO:Ga.

V rámci dalšího studia vlivu nanočástic na buňky je nutné upřesnit závislost toxicity nanočástic na jejich velikosti. Za tímto účelem by bylo dobré změřit velikost nanočástic v roztoku pomocí metody DLS. K prohloubení znalostí o vlivu nanočástic na živé buňky by bylo vhodné prozkoumat toxicitu vůči eukaryotickým buňkám. Pokud mají nanočástice ZnO:Ga najít využití v metodě PDT, je také nutné sledovat toxicitu nanočástic ZnO:Ga po ozáření UV nebo rentgenovým zářením.

Literatura

- [1] Khan, Ibrahim, Khalid Saeed, and Idrees Khan. *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Arabian journal of chemistry 12.7 (2019): 908-931.
- [2] Cheng, Shih-Hsun, and Leu-Wei Lo. *Inorganic nanoparticles for enhanced photodynamic cancer therapy*. Current drug discovery technologies 8.3 (2011): 269-276.
- [3] Cooper, Oren, and Joe Tiralongo. *Profiling Carbohydrate-Protein Interaction Using Nanotechnology*. (2020).
- [4] Mitragotri, Samir, and Patrick Stayton. *Organic nanoparticles for drug delivery and imaging*. Mrs Bulletin 39.3 (2014): 219-223.
- [5] C Thomas, Shindu, Pawan Kumar Mishra, and Sushama Talegaonkar. *Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery*. Current pharmaceutical design 21.42 (2015): 6165-6188.
- [6] Nagarajan, Ramanathan. *Nanoparticles: building blocks for nanotechnology*. 2008. 2-14.
- [7] Jindřich Leitner *Struktura nanomateriálů*, Ústav inženýrství pevných látek VŠCHT Praha, 6.1.2016
- [8] Yokoyama, Toyokazu, et al. *Basic properties and measuring methods of nanoparticles*. Nanoparticle technology handbook. Elsevier, 2008. 3-48.
- [9] Schmid, Günter, ed. *Nanoparticles: from theory to application*. John Wiley & Sons, 2011.
- [10] Guo, Dan, Guoxin Xie, and Jianbin Luo. *Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications*. Journal of physics D: applied physics 47.1 (2013): 013001.
- [11] Wronski, C. R. M. *The size dependence of the melting point of small particles of tin*. British Journal of Applied Physics 18.12 (1967): 1731.
- [12] Akbarzadeh, Abolfazl, Mohammad Samiei, and Soodabeh Davaran. *"Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine"*. Nanoscale research letters 7.1 (2012): 1-13.
- [13] Eustis, Susie, and Mostafa A. El-Sayed. *Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes*. Chemical society reviews 35.3 (2006): 209-217.

- [14] Khezri, Khadijeh, Majid Saeedi, and Solmaz Maleki Dizaj. *Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations*. Biomedicine & Pharmacotherapy 106 (2018): 1499-1505
- [15] Herrmann, Jean-Marie. *Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants*. Catalysis today 53.1 (1999): 115-129.
- [16] Chen, Wei, and Jun Zhang. *Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment*. Journal of nanoscience and nanotechnology 6.4 (2006): 1159-1166.
- [17] Parak, Wolfgang J., et al. *Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks*. Advanced Materials 14.12 (2002): 882-885.
- [18] Sharma, Parvesh, et al. *Nanoparticles for bioimaging*. Advances in colloid and interface science 123 (2006): 471-485.
- [19] Bernfield, Merton R. , Stein, Wilfred D. , Cuffe, Michael , Cooper, John A. , Slack, Jonathan M.W. , Alberts, Bruce M. , Staehelin, L. Andrew , Chow, Christopher , Lodish, Harvey F. and Laskey, Ronald A.. *cell*. Encyclopedia Britannica, <https://www.britannica.com/science/cell-biology>. Accessed 30 June 2021
- [20] Online: https://cs.wikipedia.org/wiki/Buněčný_cyklus[cit. 15. 7. 2021]
- [21] Lee, Gang Ho, and Jeong-Tae Kim. *Ultrasmall Lanthanide Oxide Nanoparticles for Biomedical Imaging and Therapy*. Woodhead Publishing, 201
- [22] Rogers, Kara and Kadner, Robert J.. *bacteria*. Encyclopedia Britannica, <https://www.britannica.com/science/bacteria>. Accessed 30 June 2021.
- [23] Choudhary, Madhusudan, et al. *Multiple chromosomes in bacteria: structure and function of chromosome II of Rhodobacter sphaeroides 2.4. 1T*. Journal of bacteriology 176.24 (1994): 7694-7702.
- [24] Taj, Muhammad Kamran, et al. *Escherichia coli as a model organism*. International Journal of Engineering Research and Science and Technology 3.2 (2014): 1-8.
- [25] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. *E. coli*. Encyclopedia Britannica, <https://www.britannica.com/science/E-coli>. Accessed 15 July 2021.
- [26] DEMNEROVÁ, K. a kol. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*, Vydavatelství VŠCHT Praha, 2001, 227 s., ISBN 80-7080-184-0
- [27] Derfus, Austin M., Warren CW Chan, and Sangeeta N. Bhatia.: *he cytotoxicity of semiconductor quantum dots*. Nano letters 4.1 (2004): 11-18.
- [28] Kirchner, Christian et al.: *Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles*. Small, 2007, 3.11: 1941-1949.

- [29] Zhang, Tingting, et al.: *Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements.* Nano letters 6.4 (2006): 800-808.
- [30] Lovrić, Jasmina, et al.: *Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots.* Journal of Molecular Medicine 83.5 (2005): 377-385.
- [31] Yu Pan, Sabine Neuss, Annika Leifert, Monika Fischler, Fei Wen, Ulrich Simon, Günter Schmid, Wolfgang Brandau, and Willi Jahnen-Dechent: *Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles.* Small, 2007, 3.11: 1941-1949.
- [32] Liu, Yunping, et al. : *Gold-Cluster Degradation by the Transition of B-DNA into A-DNA and the Formation of Nanowires.* Angewandte Chemie International Edition 42.25 (2003): 2853-2857.
- [33] Wang, Shuguang, et al.: *Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes.* Chemical physics letters 463.1-3 (2008): 145-149.
- [34] Connor, Ellen E., et al.: *Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity.* Small 1.3 (2005): 325-327.
- [35] Shukla, Ravi, et al.: *Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview.* Langmuir 21.23 (2005): 10644-10654.
- [36] Pernodet, Nadine, et al.: *Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts.* Small 2.6 (2006): 766-773.
- [37] Chompoosor, Apiwat, et al: *The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles.* Small 6.20 (2010): 2246-2249.
- [38] Goodman, Catherine M., et al.: *Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains.* Bioconjugate chemistry 15.4 (2004): 897-900.
- [39] Takahashi, Hironobu, et al.: *Modification of gold nanorods using phosphatidylcholine to reduce cytotoxicity.* Langmuir 22.1 (2006): 2-5
- [40] Alkilany, Alaaldin M., et al.: *Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects.* small 5.6 (2009): 701-708.
- [41] Hauck, Tanya S., Arezou A. Ghazani, and Warren CW Chan. *Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells.* Small 4.1 (2008): 153-159.
- [42] Reddy, Kongara M., et al.: *Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems.* Applied physics letters 90.21 (2007): 213902.
- [43] Nair, Shantikumar, et al.: *Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine 20.1 (2009): 235.

- [44] Reddy, Kongara M., et al: *Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems*. Applied physics letters 90.21 (2007): 213902.
- [45] Applerot, Guy, et al.: Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury. Advanced Functional Materials 19.6 (2009): 842-852.
- [46] Dutta, R. K., et al.: *Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 94 (2012): 143-150.
- [47] Zhang, Lingling, et al.: *Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli*. Journal of Nanoparticle Research 12.5 (2010): 1625-1636.
- [48] Jones, Nicole, et al.: Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. FEMS microbiology letters 279.1 (2008): 71-76.
- [49] Adams, Laura K., Delina Y. Lyon, and Pedro JJ Alvarez. *Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions*. Water research 40.19 (2006): 3527-3532.
- [50] Heinlaan, Margit, et al.: *Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus*. Chemosphere 71.7 (2008): 1308-1316.
- [51] Xia, Tian, et al.: *Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties*. ACS nano 2.10 (2008): 2121-2134.
- [52] Brayner, Roberta, et al. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. Nano letters 6.4 (2006): 866-870.
- [53] Kasemets, Kaja, et al.: *Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast Saccharomyces cerevisiae*. Toxicology in vitro 23.6 (2009): 1116-1122.
- [54] Franklin, Natasha M., et al.: *Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (Pseudokirchneriella subcapitata): the importance of particle solubility*. Environmental science & technology 41.24 (2007): 8484-8490.
- [55] Sharma, Vyom, Diana Anderson, and Alok Dhawan.: *Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2)*. Apoptosis 17.8 (2012): 852-870.
- [56] Yang, Hui, et al: *Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition*. Journal of applied Toxicology 29.1 (2009): 69-78
- [57] Song, Wenhua, et al.: *Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles*. Toxicology letters 199.3 (2010): 389-397.
- [58] Wang, Caixia, et al.: *ZnO nanoparticles treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in LTP-a-2 cells*. BioMed research international 2015 (2015).

- [59] Jeng, Hueiwang Anna, and James Swanson.: *Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells*. Journal of Environmental Science and Health Part A 41.12 (2006): 2699-2711.
- [60] Gojova, Andrea, et al.: *Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition*. Environmental health perspectives 115.3 (2007): 403-409.
- [61] Zhang, Lingling, et al.: *Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)*. Journal of Nanoparticle Research 9.3 (2007): 479-489.
- [62] Yamamoto, Osamu.: *Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide*. International Journal of Inorganic Materials 3.7 (2001): 643-646.
- [63] Sawai, Jun, et al.: *Hydrogen peroxide as an antibacteril factor in zinc oxide powder slurry*. Journal of fermentation and bioengineering 86.5 (1998): 521-522.
- [64] Sawai, Jun, et al.: *Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity*. Journal of Chemical Engineering of Japan 29.4 (1996): 627-633.
- [65] Gurr, Jia-Ran, et al.: *Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells*. Toxicology 213.1-2 (2005): 66-73.
- [66] Chong, Meng Nan, Bo Jin, and Christopher P. Saint.: *Bacterial inactivation kinetics of a photo-disinfection system using novel titania-impregnated kaolinite photocatalyst*. Chemical Engineering Journal 171.1 (2011): 16-23.
- [67] Saito, T., et al. *Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutans streptococci*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 14.4 (1992): 369-379
- [68] Matsunaga, Tadashi, et al.: *Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders*. FEMS Microbiology letters 29.1-2 (1985): 211-214.
- [69] Tarnuzzer, Roy W., et al. *Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage*. Nano letters 5.12 (2005): 2573-2577.
- [70] Thill, Antoine, et al. *Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for Escherichia coli. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism*. Environmental science & technology 40.19 (2006): 6151-6156.
- [71] Schubert, David, et al. *Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective*. Biochemical and biophysical research communications 342.1 (2006): 86-91.
- [72] Stoimenov, Peter K., et al. *Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents*. Langmuir 18.17 (2002): 6679-6686
- [73] Makhluif, Shirly, et al. *Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bactericide*. Advanced Functional Materials 15.10 (2005): 1708-1715.
- [74] Lin, Weisheng, et al.: *In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells*. Toxicology and applied pharmacology 217.3 (2006): 252-259.

- [75] Chung, Tsai-Hua, et al.: *The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells*. *Biomaterials* 28.19 (2007): 2959-2966.
- [76] Chen, Min, and Anna von Mikecz.: *Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles*. *Experimental cell research* 305.1 (2005): 51-62.
- [77] Chen, Min, and Anna von Mikecz.: *Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles*. *Experimental cell research* 305.1 (2005): 51-62.
- [78] Gupta, Ajay Kumar, and Mona Gupta. *Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles*. *Biomaterials* 26.13 (2005): 1565-1573.
- [79] Jaroslav Červenák *Modifikácia radiačnej citlivosti mikroorganizmov*, České vysoké učení technické v Praze Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská Katedra jaderné chemie, 2011/2012
- [80] Ing. Jan Bárta, *Instrumentální praktikum – Rentgenová difrakční analýza*, FJFI ČVUT Praha, 30. 01. 2014