

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie**

**Charles University, Faculty of Science
Department of Physical and Macromolecular Chemistry**



Doktorský studijní program: Makromolekulární chemie

Ph.D. study program: Macromolecular chemistry

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis

**Příprava a vlastnosti superparamagnetických anorganicko/polymerních částic
pro biolékařské aplikace**

**Preparation and characterization of superparamagnetic inorganic/polymer
particles for biomedical application**

MSc. Beata Anna Zasoňska

Školitel/Supervisor: Ing. Daniel Horák, CSc.

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.

Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i.

Department of Polymer Particles

Prague, 2016

ABSTRACT

Superparamagnetic γ -Fe₂O₃ nanoparticles were synthesized by coprecipitation of ferric and ferrous salts with a base. Resulting nanoparticles were coated with shells, such as poly(*N,N*-dimethylacrylamide) (PDMAAm), neat and functionalized silica (SiO₂ and SiO₂-NH₂), and polyaniline (PANI). PDMAAm shell was introduced by modification of iron oxide nanoparticle surface with an initiator and *N,N*-dimethylacrylamide was polymerized producing γ -Fe₂O₃&PDMAAm core-shell particles. In case of SiO₂-NH₂ shell, tetramethyl orthosilicate was used to yield γ -Fe₂O₃&SiO₂ nanoparticles, which were subsequently modified by (3-aminopropyl)triethoxysilane to prepare γ -Fe₂O₃&SiO₂-NH₂ particles. Oxidation of aniline hydrochloride with ammonium persulfate in an aqueous solution of poly(*N*-vinylpyrrolidone) in the presence of iron oxides produced γ -Fe₂O₃&PANI nanoparticles. Finally, the last type of the particles was based on thionin-modified poly(carboxymethyl methacrylate) (PCMMA&Th).

The particles were characterized by techniques, such as scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM) and dynamic light scattering (DLS) to determine the particle morphology and hydrodynamic diameter. The presence of the functional groups, chemical composition, and the iron content were investigated by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, elemental analysis (AAS), atomic absorption, energy dispersive X-ray (EDAX), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Vibrating sample magnetometry (VSM) determined the magnetic properties of the iron oxide particles.

Last, but not least, γ -Fe₂O₃&PDMAAm, γ -Fe₂O₃&SiO₂, and γ -Fe₂O₃&SiO₂-NH₂ particles were applied in biological experiments, namely they were incubated with murine macrophages of J774.2 line and engulfment of the particles by the cells was quantified. Cytotoxicity of γ -Fe₂O₃&PANI particles was evaluated on human neuroblastoma cells, while cytotoxicity and immune response of porous silica-coated magnetic nanoparticles was determined on proliferating human peripheral blood cells. The particles were localized within the cytoplasm of treated cells and proved to be non-toxic even at high doses and after long incubation periods. The particles might be suitable in cell applications as the cells labeled with the developed nanoparticles can be non-invasively monitored by magnetic resonance imaging (MRI); optionally they can be easily magnetically separated and redispersed in water solutions on removing of the external magnetic field. Especially, γ -Fe₂O₃&PDMAAm nanoparticles seem to be promising for diagnosis of phagocytic activity, as well as delivery of various biomolecules, such as specific proteins. Finally, PCMMA&Th particles represent a highly sensitive and universal tool for labeling of antibodies in enzyme-based sandwich-type immunosensors.

Keywords: polymer; nanoparticles; superparamagnetism; iron oxide; cell.

ABSTRAKT

Superparamagnetické $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanočástice byly syntetizovány srážením železitých a železnatých solí alkalickými činidly. Výsledné nanočástice byly povlečeny slupkami, jako je poly(*N,N*-dimethylakrylamid) (PDMAAm), výchozí i funkcionalizovaná silika (SiO_2 a $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) a polyanilín (PANI). PDMAAm slupka byla zavedena modifikací povrchu nanočástic oxidů železa iniciátorem a *N,N*-dimethylakrylamid byl polymerizován za vzniku $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PDMAAm}$ částic. V případě $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ slupky byl použit tetramethyl-orthosilikát a vznikly $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2$ nanočástice, které byly následně modifikovány (3-aminopropyl)triethoxysilanem ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částice). Oxidací anilín hydrochloridu peroxodisíranem amonným ve vodném roztoku poly(*N*-vinylpyrolidonu) v přítomnosti oxidů železa vznikly $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PANI}$ nanočástice. Poslední typ částic byl pak na bázi tioninem modifikovaného poly(karboxymethyl-methakrylátu) (PCMMA&Th).

Částice byly charakterizovány technikami, jako je rastrovací a transmisní elektronová mikroskopie (SEM a TEM) a dynamický rozptyl světla (DLS), které stanovily morfologii a hydrodynamický průměr částic. Přítomnost funkčních skupin, chemické složení a obsah železa byly prokázány infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR), dále atomovou absorpční spektroskopií (AAS), prvkovou a mikroprvkovou analýzou (EDAX) a rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií (XPS). Vibrační magnetometrií (VSM) se stanovily magnetické vlastnosti částic oxidů železa.

V neposlední řadě byly $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PDMAAm}$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2$ a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částice použity v biologických experimentech, kde byly inkubovány se savčími makrofágy linie J774.2 a bylo kvantifikováno pohlcování částic buňkami. Cytotoxicita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PANI}$ částic byla vyhodnocena na lidských neuroblastomech; cytotoxicita a imunitní reakce magnetických nanočástic povlečených porézní silikou byly stanoveny na proliferujících lidských periferních krevních buňkách. Částice byly lokalizovány v buněčné cytoplazmě a bylo prokázáno, že jsou netoxické i za vysokých koncentrací a po dlouhé inkubační době. Částice mohou být vhodné pro buněčné aplikace; buňky označené nanočásticemi mohou být neinvazivně monitorovány magnetickým rezonančním zobrazením (MRI); mohou být rovněž snadno magneticky odděleny a poté opět redispersgovány ve vodných roztocích, je-li vnější magnetické pole odstraněno. Zejména $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PDMAAm}$ nanočástice jsou slibné pro diagnostiku fagocytární aktivity a rovněž pro dávkování různých biomolekul, např. proteinů. PCMMA&Th částice pak představují vysoce citlivý a univerzální prostředek pro značení protilátek v ELISA imunosenzorech.

Klíčová slova: polymer; nanočástice; superparamagnetický; oxid železa; buňka.

ABBREVIATIONS

AAS	atomic absorption spectroscopy
ABHA	2,2'-azobis(<i>N</i> -hydroxy-2-methylpropanimidamide) dihydrochloride
AMPA	2,2'-azobis(2-methylpropanimidamide) dihydrochloride
APTES	(3-aminopropyl)triethoxysilane
CCHPA	4-cyano-4- {[1-cyano-3-(<i>N</i> -hydroxycarbonyl)-1-methylpropyl]azo}pentanoic acid
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
D_h	hydrodynamic diameter
DLS	dynamic light scattering
DMAAm	<i>N,N</i> -dimethylacrylamide
D_n	number-average particle diameter
EDAX	energy dispersive X-ray spectroscopy
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
GMA	glycidyl methacrylate
HRP	horseradish peroxidase
MRI	magnetic resonance imaging
NHS	<i>N</i> -hydroxysulfosuccinimide
PANI	polyaniline
PCMMA	poly(carboxymethyl methacrylate)
PCMMA&Th	thionin-modified poly(carboxymethyl methacrylate)
PDI	polydispersity index (according to TEM)
PDMAAm	poly(<i>N,N</i> -dimethylacrylamide)
PGMA	poly(glycidyl methacrylate)
PI	polydispersity (according to DLS)
PVP	poly(<i>N</i> -vinylpyrrolidone)
S_{BET}	specific surface area
SEM	scanning electron microscopy
TEM	transmission electron microscopy
Th	thionin
TMOS	tetramethyl orthosilicate
VSM	vibrating sample magnetometry
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

SEZNAM ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektroskopie
ABHA	2,2'-azobis(<i>N</i> -hydroxy-2-methylpropanimidamid) dihydrochlorid
AMPA	2,2'-azobis(2-methylpropanimidamid) dihydrochlorid
APTES	(3-aminopropyl)triethoxysilan
CCHPA	4-kyano-4- {[1-kyano-3-(<i>N</i> -hydroxykarbamoyl)-1-methylpropyl]azo} pentanová kyselina
CTAB	<i>cetyltrimethylamonium bromid</i>
D_h	hydrodynamický průměr
DLS	dynamický rozptyl světla
DMAAm	<i>N,N</i> -dimethylakrylamid
D_n	početní střed průměru částic
EDAX	mikroprvková analýza
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid
FTIR	infračervená spektroskopie s Furierovou transformací
GMA	glycidyl-methakrylát
HRP	křenová peroxidáza
MRI	magnetické rezonanční zobrazení
NHS	<i>N</i> -hydroxysulfosukcinimid
PANI	polyanilín
PCMMA	poly(karboxymethyl-methakrylát)
PCMMA&Th	tioninem-modifikovaný poly(karboxymethyl-methakrylát)
PDI	index polydisperzity (podle TEM)
PDMAAm	poly(<i>N,N</i> -dimethylakrylamid)
PGMA	poly(glycidyl-methakrylát)
PI	polydispersita (podle DLS)
PVP	poly(<i>N</i> -vinylpyrolidon)
S_{BET}	specifický povrch
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
Th	tionin
TMOS	tetramethyl-orthosilikát
VSM	vibrační magnetometrie
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie

CONTENTS

ABSTRACT	2
ABBREVIATIONS	4
1. INTRODUCTION	8
2. AIMS	9
3. RESULTS AND DISCUSSION	9
3.1. Magnetic nanoparticles	9
3.2. Poly(<i>N,N</i> -dimethylacrylamide)-coated maghemite	10
3.3. Silica-coated maghemite	11
3.4. Polyaniline-coated maghemite	12
3.5. Thionin-modified poly(carboxymethyl methacrylate) nanospheres	13
3.6. Biological experiments	15
4. CONCLUSIONS	16
5. REFERENCES	26
6. CURRICULUM VITAE	28
7. SELECTED PUBLICATIONS AND CONFERENCES	29

OBSAH

ABSTRAKT	3
SEZNAM ZKRATEK	5
1. ÚVOD	17
2. CÍLE	18
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	18
3.1. Magnetické nanočástice	18
3.2. Maghemit pokrytý poly(<i>N,N</i> -dimethylakrylamidem)	19
3.3. Maghemit pokrytý silikou	20
3.4. Maghemit pokrytý polyanilinem	21
3.5. Poly(glycidyl-methakrylátové) nanočástice modifikované tioninem	23
3.6. Biologické experimenty	24
4. ZÁVĚR	25
5. LITERATURA	26
6. ŽIVOTOPIS	28
7. SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFERENCÍ	29

1. INTRODUCTION

Nanotechnology is one of the most rapidly developing scientific areas. It allows fabrication of innovative nanostructured materials featured with unique properties and multiple application possibilities. By the definition, at least one dimension of the nanomaterials is in nanoscale size (typically ≤ 100 nm)¹.

Magnetic nanoparticles are often based on iron oxides, which play a prominent role in life, since iron is indispensable component of the organisms and has reduced toxicity². Magnetite and maghemite have been approved for clinical use by US Food and Drug Administration³. Surface-modified iron oxide nanoparticles have been then found very attractive for cell separations and labeling, cancer therapy, drug delivery, hyperthermia, and as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI)⁴⁻⁶. There are many approaches to obtain various types of iron oxide nanoparticles differing in shape, size, and availability of the reactive groups on the surface, such as coprecipitation, thermal decomposition, spray pyrolysis, microemulsion, hydrothermal, sol-gel, and bacterial methods⁷⁻⁹.

This work describes development of new maghemite nanoparticles. In nature, γ -Fe₂O₃ is a brownish mineral, with saturation magnetization of *ca.* 80 A·m²/kg (bulk)⁷. Its crystal structure is similar to that of magnetite. Small γ -Fe₂O₃ particles (< 20 nm) have large specific surface area, high susceptibility, and exhibit superparamagnetism at ambient temperatures. High surface to volume ratio makes the particles thermodynamically metastable¹⁰. To compensate the excess of surface energy, they tend to form bigger structures (aggregates) in water. Moreover, neat (uncoated) particles exhibit high nonspecific adsorption of biomolecules, which is undesirable for both *in vitro* and *in vivo* applications. This can be avoided by the surface modification with a biocompatible shell¹¹. Typical polymer shells are made from organic (poly(ethylene glycol)¹², poly(vinyl alcohol)¹³, poly(*N,N*-dimethylacrylamide)¹⁴) or inorganic materials (silica)¹⁵. This additional layer renders the particles with colloidal stability, avoids interactions with the surrounding environment, and introduces specific functional groups on the surface to allow attachment of a cargo (protein), or to boost cellular uptake. As any new nanomaterial can have an impact on the biological environment with consequences on the living organism, a series of toxicology studies has to be carried out before any medical application¹⁶. It is worth of mentioning that biological fate of nanoparticles strictly depends on their composition and physico-chemical properties, such as size, surface, charge, morphology, stability, and coating¹⁷.

In this thesis, superparamagnetic maghemite nanoparticles were investigated and several macromolecular agents were chosen for their modification, such as highly hydrophilic poly(*N,N*-dimethylacrylamide), porous and non-porous silica including its amino derivative and conductive polyaniline. Moreover, monodisperse thionin-modified poly(carboxymethyl methacrylate) nanospheres were designed for biosensing applications. In biological experiments, the developed particles were investigated in terms of toxicity and uptake by the cells.

2. AIMS

- Synthesis of superparamagnetic γ -Fe₂O₃ nanoparticles by coprecipitation method.
- Coating of magnetic nanoparticles with biocompatible shells based on
 - poly(*N,N*-dimethylacrylamide),
 - non-porous and porous silica, optionally functionalized with amino groups,
 - polyaniline.
- Synthesis of thionin-modified poly(carboxymethyl methacrylate) particles.
- Control of particle size and thickness of the shell.
- Characterization of the particles.
- Application of the particles in biological and biomedical experiments.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Magnetic nanoparticles

When developing multifunctional core-shell nanoparticles, maghemite (γ -Fe₂O₃) was preferred since it is chemically more stable in air and water than magnetite (Fe₃O₄). In the synthesis of the nanoparticles, Fe₃O₄ nanoparticles were first obtained by conventional coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) salts with ammonia. It was followed by controlled oxidation of Fe₃O₄ with NaOCl to obtain γ -Fe₂O₃ nanoparticles.

According to TEM micrographs, γ -Fe₂O₃ particles were almost spherical and their D_n ranged 9-11 nm (Figure 1); width of the particle size distribution was moderate (PDI ~ 1.2).

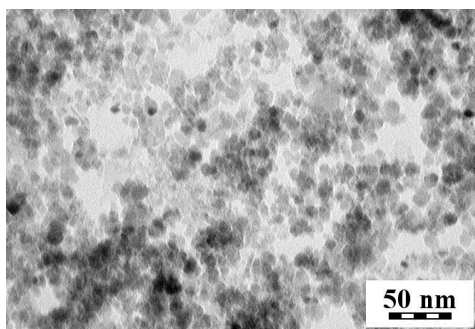


Figure 1. TEM micrograph of maghemite nanoparticles.

Hydrodynamic particle size (D_h) in water according to DLS ranged 108-192 nm depending on pH and ionic strength. D_h was always larger than D_n , which can be ascribed to the fact that while TEM determines number-average diameter of dry particles. DLS measures them in water, where solvent hydration layer contributes to the increased size. Moreover, DLS measures z-average particle diameter proportional to sixth power of the size, which is sensitive to large particles and particle aggregates.

Structure of the particles was verified using FTIR, XPS, and EDAX spectroscopy, elemental analysis, and magnetic measurements. Amount of Fe in the uncoated maghemite particles, ~ 66 and ~ 61 wt.%, was determined according to AAS and VSM, respectively. After applying the external magnetic field, the particles were attracted to a magnet facilitating thus their purification in water. VSM measurements proved that the particles were superparamagnetic.

3.2. Poly(*N,N*-dimethylacrylamide)-coated maghemite

γ -Fe₂O₃&PDMAAm core-shell nanoparticles were obtained in a two-steps reaction. In the first step, initiator was attached to the iron oxide surface. Three various initiators, such as 2,2'-azobis(2-methylpropanimidamide) dihydrochloride (AMPA), 2,2'-azobis(*N*-hydroxy-2-methylpropanimidamide) dihydrochloride (ABHA), and 4-cyano-4-[[1-cyano-3-(*N*-hydroxycarbamoyl)-1-methylpropyl]azo]pentanoic acid (CCHPA), were selected and effect of the initiator/ γ -Fe₂O₃ ratio on the particle size and polydispersity of the γ -Fe₂O₃ nanoparticles was determined. With the increasing initiator/ γ -Fe₂O₃ ratio, the particles were larger; $D_h > 1 \mu\text{m}$ then indicated aggregation of the particles at the AMPA and CCHPA initiator/ γ -Fe₂O₃ ratio = 0.12 and 0.32 w/w, respectively (Figure 2 a). If ABHA/ γ -Fe₂O₃ ratio was < 0.64 w/w, the subsequent polymerization of DMAAm produced colloiddally stable γ -Fe₂O₃&PDMAAm nanoparticles. In the dependence of ζ -potential of initiator-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles on the initiator/ γ -Fe₂O₃ ratio, the ζ -potential of AMPA- and CCHPA- γ -Fe₂O₃ increased from -45 to -13 mV with the ratio increasing up to 0.3 w/w, approaching then a plateau (Figure 2 b). In contrast, ζ -potential of ABHA- γ -Fe₂O₃ was positive amounting to 40 mV irrespectively of the ABHA/ γ -Fe₂O₃ ratio.

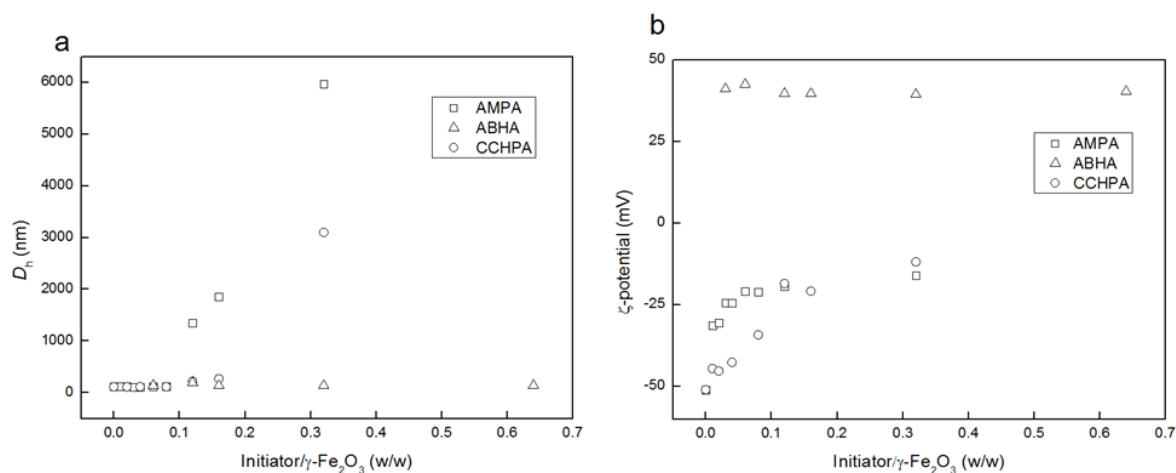
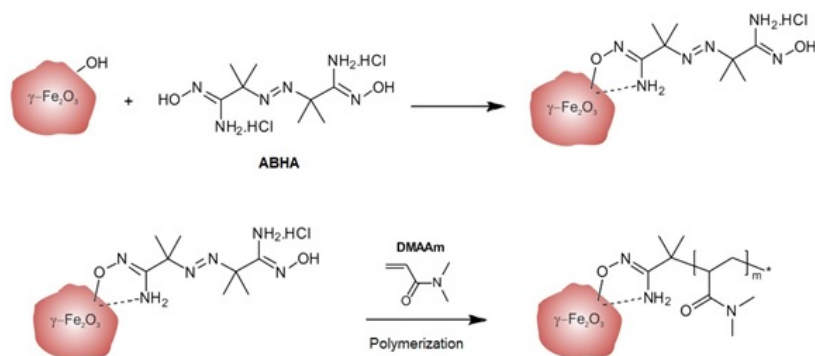


Figure 2. Dependence of (a) hydrodynamic diameter D_h and (b) ζ -potential of initiator-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles on the initiator/ γ -Fe₂O₃ ratio.

In the second step, initiator-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles were “grafted from” by free-radical polymerization of DMAAm, as exemplified on Figure 3 a for ABHA- γ -Fe₂O₃. TEM micrograph is on Figure 3 b. Using different initiators, γ -Fe₂O₃&PDMAAm particle size (D_n) could be controlled from 9 to 16 nm. Typically, D_n of PDMAAm-coated AMPA- γ -Fe₂O₃, ABHA- γ -Fe₂O₃, and CCHPA- γ -Fe₂O₃ nanoparticles was 12, 16, and 13 nm, respectively, with PDI = 1.18, 1.24, and 1.46, respectively. This means that polydispersities of PDMAAm-coated ABHA- γ -Fe₂O₃ and AMPA- γ -Fe₂O₃ were narrower than that of CCHPA- γ -Fe₂O₃ nanoparticles. Hydrodynamic size of all γ -Fe₂O₃&PDMAAm particle clusters D_h was large (~ 206 nm) compared to that obtained from TEM micrographs. The PI values approached 0.2 reflecting polydisperse nature of the product. γ -Fe₂O₃&PDMAAm particles were colloiddally stable for several months.

a



b

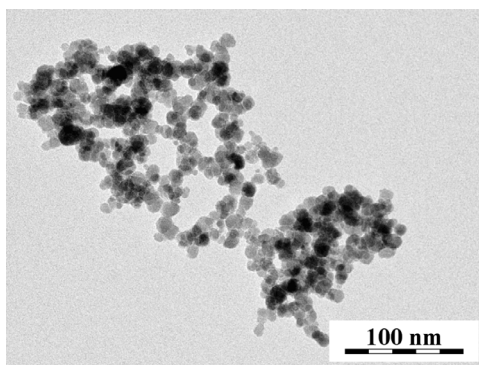


Figure 3. Scheme of (a) preparation and (b) TEM micrograph of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ &PDMAAm nanoparticles obtained by “grafting-from” method. ABHA - 2,2'-azobis(*N*-hydroxy-2-methylpropanimidamide) dihydrochloride. DMAAm - *N,N*-dimethylacrylamide.

3.3. Silica-coated maghemite

Silica shell on the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles was obtained according to Stöber method using hydrolysis and condensation of tetramethyl orthosilicate (TMOS) under base catalysis¹⁸. Amino-functionalized particles were prepared by modification of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ &SiO₂ nanoparticles with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES; Figure 4).

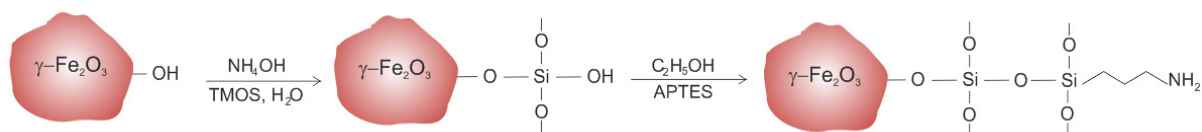


Figure 4. Silanization of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles with tetramethyl orthosilicate (TMOS) and subsequent modification with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES).

During the synthesis, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /TMOS ratio was changed in the range 0.1-0.8 w/w to control morphology and size of the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ &SiO₂ nanoparticles (Figure 5). As expected, a “hallo” was observed on TEM micrograph at a high $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /TMOS ratio (0.8 w/w) suggesting the presence of a silica shell. At $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /TMOS = 0.4 w/w, the particles were 12 nm in size with 2.2 nm thick shell and a quite narrow size distribution (PDI = 1.07). With higher amounts of TMOS relative to iron oxide ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /TMOS = 0.2 w/w) number-average diameter again increased (D_n = 19 nm). Hydrodynamic diameter D_h was again much larger than D_n , increasing from ~ 100 nm for neat $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles to ~ 300 nm for

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2$ particles. Polydispersity PI of the nanoparticles prepared at low $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{TMOS}$ ratios indicated their broad particle size distribution. After the last modification with APTES, amino groups were introduced on the particles, which can be employed for prospective attachment of a target biomolecule.

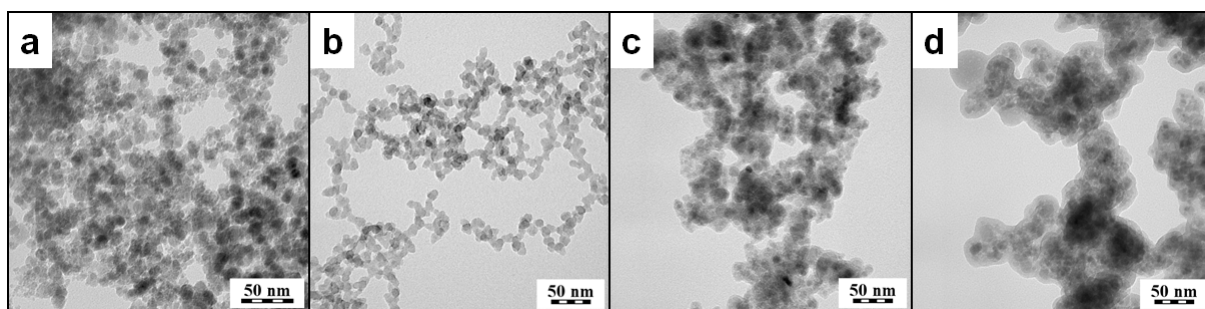


Figure 5. TEM micrographs of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2$ particles obtained at $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{TMOS}$ = (a) 0.8, (b) 0.4, (c) 0.2, and (d) 0.1 w/w.

Optionally, to obtain porous silica shell, cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), was added in the second reaction step during the modification with APTES. Also in this synthesis, several reaction parameters were changed to prepare a thick shell around the nanoparticles. S_{BET} increased from ~ 66 (neat $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) to $206 \text{ m}^2/\text{g}$ for $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ particles documenting thus porous character of the silica shell.

3.4. Polyaniline-coated maghemite

Conductive PANI shell was introduced on the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ surface by oxidation of aniline hydrochloride with ammonium persulfate at 0 and $25 \text{ }^\circ\text{C}$ in the presence of PVP stabilizer (Figure 6). PANI shell, thickness of which was regulated by the reaction temperature, was physically adsorbed on the iron oxide surface (Figure 6).

D_n of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PANI}$ core-shell particles prepared at $0 \text{ }^\circ\text{C}$ was by 9 nm larger than that of the particles synthesized at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 7) due to an increase of molecular weight of PANI with decreasing temperature. D_n , as well as D_h , increased after PANI modification from 11 to 25 nm and from 192 to 257 nm, respectively.

Saturation magnetization of uncoated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles was $\sim 50 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ suggesting that the concentration of maghemite was 61 wt.%. After coating, saturation magnetization of the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PANI}$ nanoparticles decreased to $\sim 14 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ suggesting presence of 28 wt.% $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ in the composite nanoparticles.

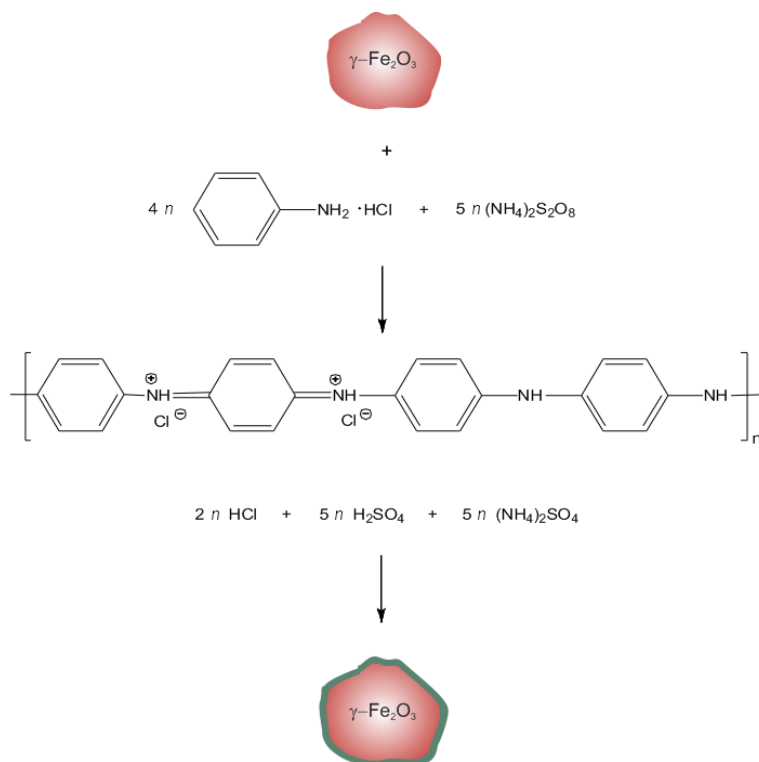


Figure 6. Oxidation of aniline hydrochloride by ammonium persulfate in the presence of poly(*N*-vinylpyrrolidone)-stabilized $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dispersion.

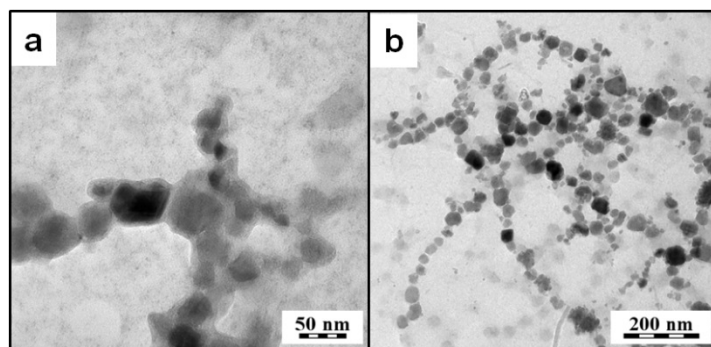
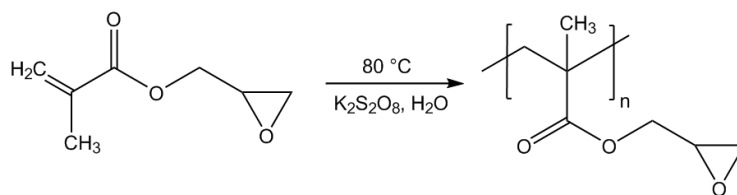


Figure 7. TEM micrographs and of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ &PANI particles prepared at (a) 0 and (b) 25 °C.

3.5. Thionin-modified poly(carboxymethyl methacrylate) nanospheres

Monodisperse poly(glycidyl methacrylate) (PGMA) nanospheres were prepared by emulsifier-free emulsion polymerization (Figure 8) and effect of both monomer and initiator concentration on the PGMA particle size was investigated (Figure 9).

a



b

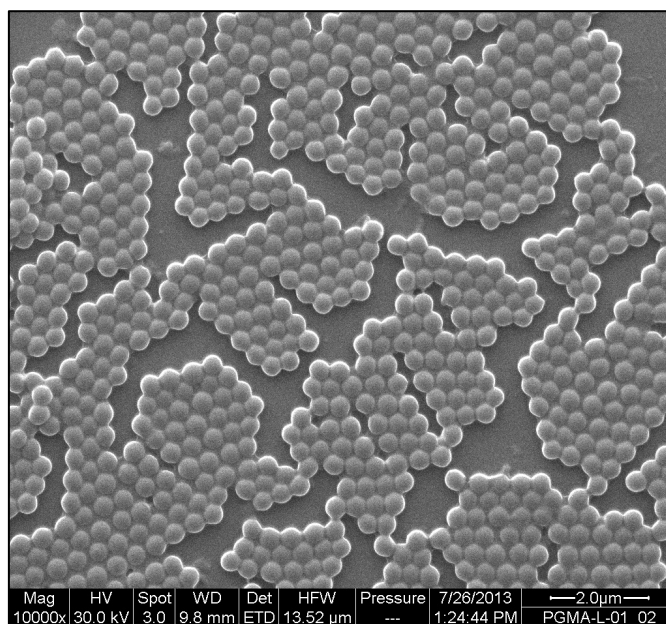


Figure 8. (a) Polymerization of glycidyl methacrylate and (b) SEM micrograph of PGMA nanospheres.

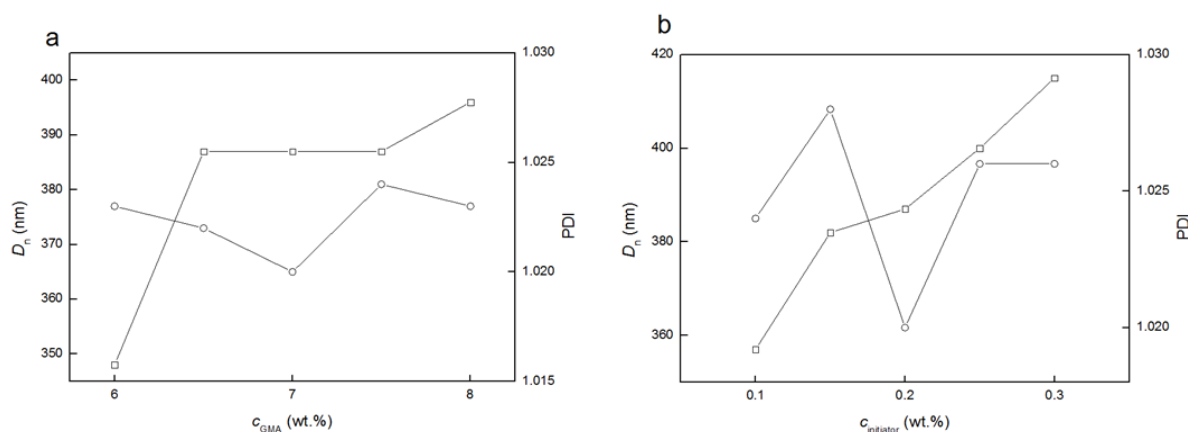


Figure 9. Dependence of (\square) number-average diameter D_n and (\circ) polydispersity index PDI of PGMA nanospheres on concentration of (a) GMA (0.2 wt.% $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$); and (b) $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ in water (7 wt.% GMA).

The particles were spherical with D_n ranging 350-400 nm depending on the GMA concentration in water (Figure 9 a). The PGMA nanosphere diameter was slightly larger with increasing monomer concentration, which can be ascribed to the fact that the monomer

is a good solvent for the polymer increasing thus the oligomer critical chain length before the precipitation. The dependence of the PGMA nanosphere diameter on the concentration of the initiator in water showed that the particle size increased from 360 to 420 nm with increasing initiator concentration due to higher radical-to-monomer molar ratio (Figure 9 b). Typically, the particles had a very narrow size distribution.

To introduce carboxyl groups, the PGMA nanospheres were hydrolyzed with H_2SO_4 and oxidized with $KMnO_4$ yielding poly(carboxymethyl methacrylate) (PCMMA). Finally, thionin (Th) as an electron mediator was covalently attached to the particles using carbodiimide chemistry (Figure 10).

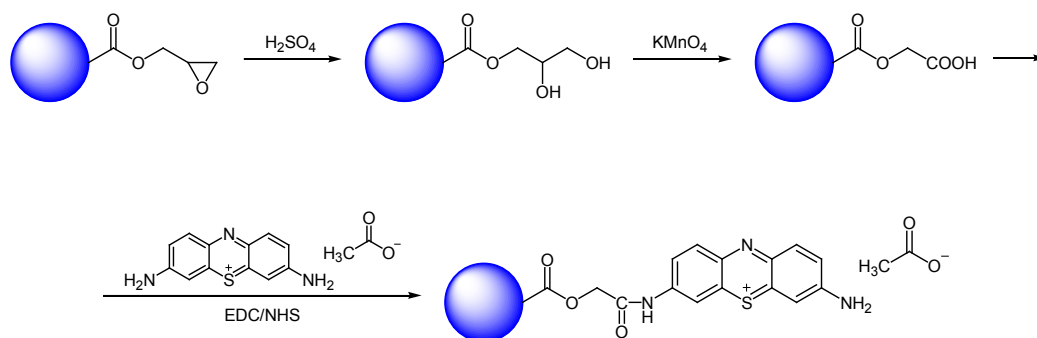


Figure 10. Preparation of PCMMA&Th nanospheres by hydrolysis of poly(glycidylmethacrylate), oxidation, and reaction with thionin. EDC - *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide, NHS - *N*-hydroxysulfosuccinimide.

3.6. Biological experiments

Biological experiments demonstrated that $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PDMAAm}$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2$, and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ core-shell nanoparticles were recognized and engulfed by the macrophages. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PDMAAm}$ and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2$ nanoparticles, in contrast to neat $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, proved to be non-cytotoxic even at high doses ($75\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and after long-time incubation (72 h). Porous $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ nanoparticles did not interfere with the phagocytic activity of monocytes and granulocytes and did not affect respiratory burst of phagocytes. There were no significant differences in proliferative response of T-lymphocytes, as well as T-dependent B-cells, treated with $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ particles in all concentrations and time exposures compared to the control untreated cells. Also $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PANI}$ particles could be considered as safe for biomedical applications. Inhibition of the cell growth increased at high $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PANI}$ particle concentrations, but morphology of the cells exposed to both uncoated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PANI}$ nanoparticles at a concentration $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ did not change and no cell damage was observed in comparison to control cells. The influence of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PANI}$ nanoparticles on the viability of human neuroblastoma derived SH-SY5Y cell line was determined by the real-time cytotoxicity test.

Final biological experiment involved application of PCMMA&Th nanospheres in an immunosensor, where horseradish peroxidase (HRP) was used as an enzyme to generate electrochemical signal. Bioconjugation of HRP on both PCMMA and PCMMA&Th nanoparticles was achieved via EDC/sulfo-NHS chemistry. PCMMA&Th-HRP nanospheres improved the electrochemical signal and the sensitivity of the biosensor. The nanospheres thus represent a highly sensitive and universal tool for labeling of antibodies in enzyme-based sandwich-type immunosensors, which is promising for immunochemical analyses not only in clinical biology, but also in personalized medical devices.

4. CONCLUSIONS

In this work, γ -Fe₂O₃ particles were successfully prepared and their surface was modified with (i) PDMAAm by the radical polymerization using “grafting from” method, (ii) silica obtained by hydrolysis and condensation of Si precursors, and (iii) polyaniline prepared by oxidation of aniline HCl with ammonium persulfate.

Last but not least, thionin-modified monodisperse poly(glycidyl methacrylate) particles, ~ 390 nm in diameter, were developed by emulsifier-free emulsion polymerization.

All surface modifications of the particles were confirmed by a range of physico-chemical methods. The particles proved to be chemically and colloiddally stable even after several months of storage.

In biological experiments, all synthesized magnetic particles were incubated with both animal and human cells including macrophages, peripheral blood and neuroblastoma cells, and particle (immuno)toxicity and engulfment were evaluated.

As the developed surface-modified γ -Fe₂O₃ particles proved to be non-toxic and readily internalized in the living cells, they are promising tool for diagnostics, as well as for delivery of various biomolecules, such as specific proteins.

Finally, monodisperse PCMMA&Th-HRP nanospheres were found to amplify the electrochemical signal in the biosensor improving thus its sensitivity.

1. ÚVOD

Nanotechnologie je jedním z nejrychleji se rozvíjejících vědeckých odvětví umožňující výrobu inovativních nanomateriálů a zaručující unikátní vlastnosti a mnohočetné aplikační možnosti. Nanomateriály jsou definovány tak, že nejméně jeden jejich rozměr musí být v řádu nanometrů (obvykle ≤ 100 nm)¹. Mezi tyto materiály patří i magnetické nanočástice na bázi oxidů železa, které jsou jen omezeně toxické², neboť železo je nepostradatelnou složkou živého organismu. Magnetit a maghemit byly schváleny pro klinické použití amerických Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv³. Povrchově modifikované nanočástice oxidů železa jsou velmi atraktivní pro separace a značení buněk, léčení rakoviny včetně hypertermie, směrování léčiv i jako kontrastní látky pro zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)⁴⁻⁶. Různé typy nanočástic oxidů železa lišících se tvarem, velikostí a dostupností reaktivních skupin na povrchu, lze získat mnoha způsoby, např. koprecipitací, teplotním rozkladem prekurzorů, mikroemulzními, hydrotermálními, sol-gel a bakteriálními metodami⁷⁻⁹.

Tato práce popisuje vývoj nových maghemitových nanočástic. V přírodě se γ -Fe₂O₃ vyskytuje jako hnědý minerál maghemit, jehož nasycená magnetizace⁷ činí *cca.* 80 A·m²/kg. Krystalová struktura maghemitu je podobná struktuře magnetitu. Malé částice γ -Fe₂O₃ (< 20 nm) mají velký specifický povrch, vysokou susceptibilitu a vykazují superparamagnetické vlastnosti při pokojové teplotě. Velký povrch vzhledem k objemu činí částice termodynamicky metastabilní¹⁰. Aby byl přebytek povrchové energie kompenzován, mají částice tendenci tvořit ve vodě větší struktury (agregáty). Holé (nepokryté) částice v kultivačních roztocích neselektivně adsorbují různé biomolekuly, což je nežádoucí pro specifické *in vitro* a *in vivo* interakce. Aby se tento jev omezil, je třeba povrchy modifikovat polymerním povlakem¹¹. Typické polymerní povlaky sestávají z organických nebo anorganických materiálů, jako je polyethylenglykol¹², polyvinylalkohol¹³, poly(*N,N*-dimethylakrylamid)¹⁴, či silika¹⁵. Přídavná vrstva poskytuje částicím koloidní stabilitu, omezuje interakce s okolním prostředím, zavádí specifické funkční skupiny na povrch, umožňuje navázání molekul (proteinů) a zvyšuje vstřebávání oxidů železa buňkami. Jako každý nový nanomateriál, mohou mít i oxidy železa dopad na biologické prostředí a negativní důsledky pro živé organismy. Před každým lékařským použitím částic je proto zapotřebí provést sérii toxikologických studií¹⁶. Osud nanočástic v živém organismu však výhradně závisí na jejich chemickém složení a fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je velikost, povrch, náboj, morfologie, stabilita a kvalita pokrytí¹⁷.

V práci jsou zkoumány superparamagnetické maghemitové nanočástice a několik makromolekulárních látek jako modifikačních činidel: vysoce hydrofilní poly(*N,N*-dimethylakrylamid), porézní a neporézní silika včetně modifikace aminovými skupinami a vodivý polyanilín. V neposlední řadě byly tioninem modifikované monodisperzní poly(karboxymethyl-methakrylátové) nanočástice použity v biosenzoru. Všechny připravené nanočástice byly zkoumány z hlediska toxicity a schopnosti být pohlcovány buňkami.

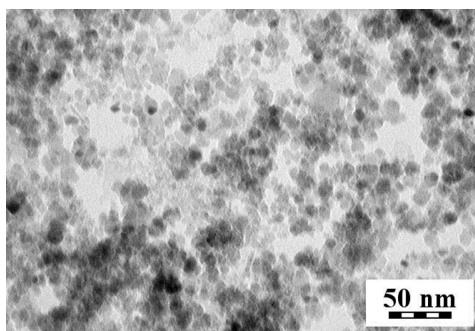
2. CÍLE

- Syntéza superparamagnetických $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanočástic koprecipitační metodou.
- Pokrytí magnetických nanočástic biokompatibilními povlaky na bázi poly(*N,N*-dimethylakrylamidu), neporézní, porézní, případně aminovými skupinami modifikované siliky a polyanilínu.
- Syntéza poly(karboxymethyl-methakrylatových) částic modifikovaných tioninem.
- Regulace velikosti částic a tloušťky povrchové vrstvy.
- Charakterizace částic.
- Použití částic v biologických a biolékařských experimentech.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Magnetické nanočástice

Při vývoji magnetických nanočástic byl upřednostněn maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), protože je chemicky stabilnější na vzduchu i ve vodě než magnetit (Fe_3O_4). Magnetické nanočástice maghemitu byly syntetizovány tak, že nejprve byly připraveny nanočástice magnetitu koprecipitací Fe(II) a Fe(III) solí amoniakem, které byly následně oxidovány chlornanem sodným.



Obrázek 1. TEM mikrofotografie $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanočástic.

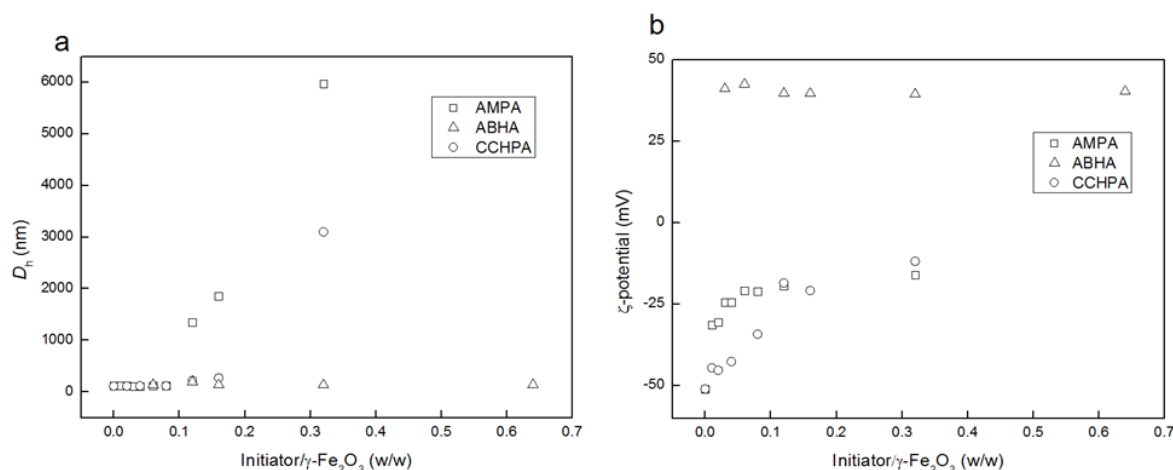
Podle transmisní elektronové mikroskopie, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ částice byly téměř sférické a jejich početní průměr (D_n) se pohyboval v rozmezí 9–11 nm (Obrázek 1) v závislosti na reakčních podmínkách. Výsledný index polydisperzity PDI ~ 1.2 svědčil o relativně úzké distribuci velikosti částic.

Hydrodynamická velikost částic (D_h) byla regulována v rozsahu 108–192 nm v závislosti na koncentraci, typu média, pH, iontové síle, náboji, atd. Rozdíl v hodnotách D_n a D_h můžeme zdůvodnit skutečností, že TEM poskytuje informaci o velikosti suchých částic D_n , která je vždy menší než D_h stanovená metodou dynamického rozptylu světla (DLS) obvykle ve vodné disperzi, kde částice mohou interagovat; rovněž hydratační slupka přispívá ke zvyšování velikosti částic. Měření DLS je navíc citlivé na přítomnost velkých částic, neboť intenzita rozptylu světla je úměrná šesté mocnině velikosti. Vlastnosti částic byly charakterizovány FTIR, XPS a EDAX spektroskopií, prvkovou analýzou a magnetickými měřeními. Výchozí maghemitové částice obsahovaly 66 hm.% Fe podle atomové absorpční spektroskopie (AAS) a 61 hm.% Fe podle měření magnetometrem (VSM). Bylo prokázáno, že nanočástice jsou superparamagnetické.

3.2. Maghemit pokrytý poly(*N,N*-dimethylakrylamidem)

γ -Fe₂O₃&PDMAAm nanočástice byly připraveny dvoustupňovou syntézou. V prvním stupni byl na povrch oxidů železa navázán iniciátor. Byly zvoleny tři různé iniciátory: dihydrochlorid 2,2'-azobis(2-methylpropanimidamidu) (AMPA), dihydrochlorid 2,2'-azobis(*N*-hydroxy-2-methylpropanimidamidu) (ABHA) a 4-kyano-4-{[1-kyano-3-(*N*-hydroxykarbamoyl)-1-methylpropyl]azo}pentanová kyselina (CCHPA); stanoven byl vliv poměru iniciátor/ γ -Fe₂O₃ na velikost částic a polydisperzitu.

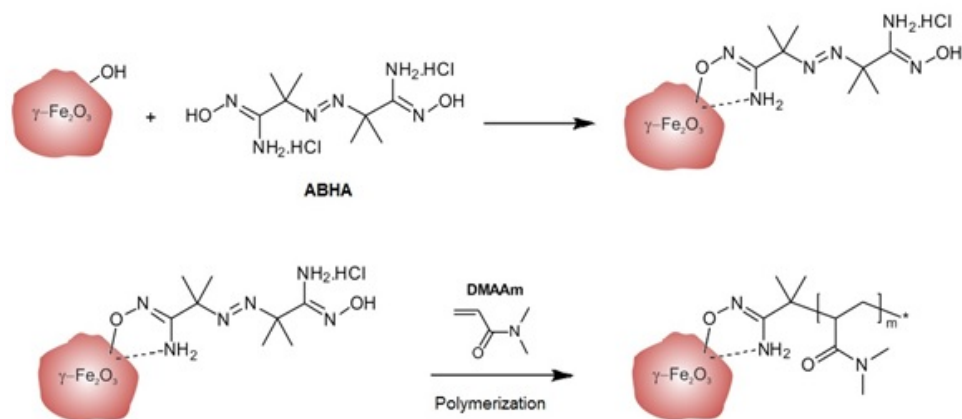
S rostoucím poměrem iniciátor/ γ -Fe₂O₃ velikost částic vzrůstala; $D_h > 1 \mu\text{m}$ pak indikoval agregaci částic při hmotnostních zlomcích AMPA a CCHPA iniciátor/ γ -Fe₂O₃ = 0,12 a 0,32 (Obrázek 2 a). Byl-li hmotnostní zlomek ABHA/ γ -Fe₂O₃ < 0,64, následná polymerizace DMAAm produkovala koloidně stabilní γ -Fe₂O₃&PDMAAm nanočástice. ζ -potenciál iniciátorem modifikovaných γ -Fe₂O₃ nanočástic rostl s rostoucím poměrem iniciátor/ γ -Fe₂O₃. ζ -potenciál AMPA- γ -Fe₂O₃ a CCHPA- γ -Fe₂O₃ částic se do hmotnostního poměru 0,3 zvyšoval od -45 do -13 mV, kde dosáhl plata (Obrázek 2 b). Naproti tomu, ζ -potenciál ABHA- γ -Fe₂O₃ činil +40 mV a byl nezávislý na poměru ABHA/ γ -Fe₂O₃. γ -Fe₂O₃&PDMAAm částice vykazovaly koloidní stabilitu a mohly být skladovány po dobu několika měsíců.



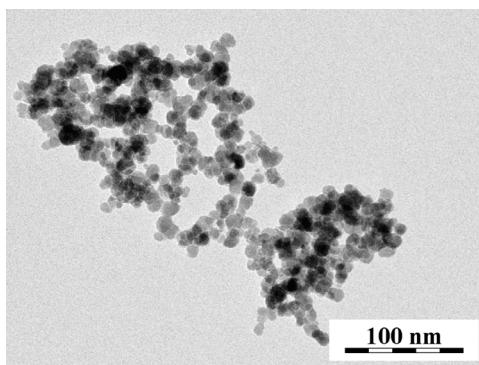
Obrázek 2. Závislost (a) hydrodynamického průměru D_h a (b) ζ -potenciálu iniciátorem-modifikovaných γ -Fe₂O₃ nanočástic na poměru iniciátor/ γ -Fe₂O₃.

V druhém kroku byly γ -Fe₂O₃ částice modifikované iniciátorem roubovány z povrchu radikálovou polymerizací DMAAm (Obrázek 3 a). TEM mikrofotografie ABHA- γ -Fe₂O₃ nanočástic je zachycena na Obrázku 3 b.

a



b

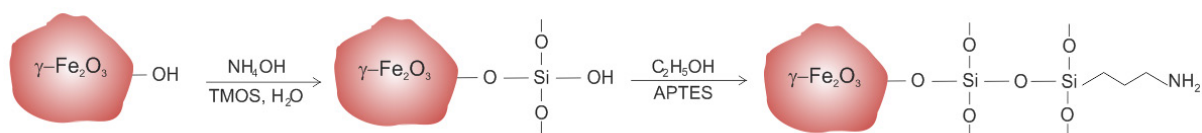


Obrázek 3. Schéma (a) přípravy a (b) TEM mikrofotografie $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PDMAAm nanočástic získaných metodou “grafting-from”. ABHA - dihydrochlorid 2,2'-azobis(*N*-hydroxy-2-methylpropanimidamidu). DMAAm – *N,N*-dimethylakrylamid.

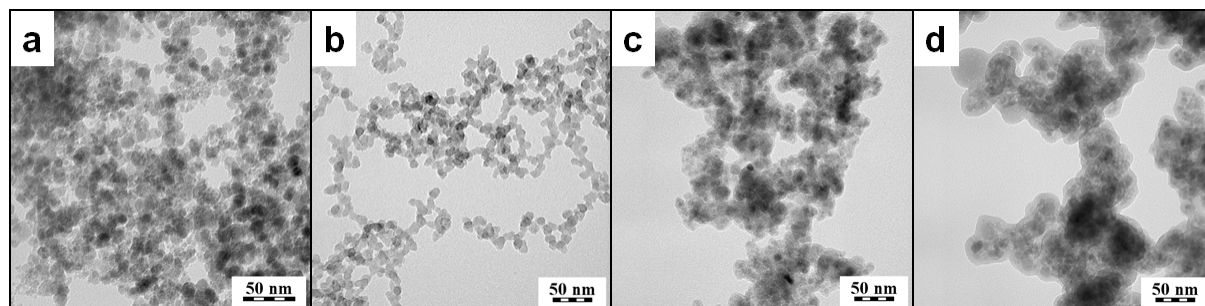
Použitím různých iniciátorů, velikost $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PDMAAm částic D_n byla regulována v rozmezí 9-16 nm. PDMAAmem pokryté AMPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ABHA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a CCHPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanočástice měly průměr 12, 16, and 13 nm, a PDI = 1,18, 1,24 a 1,46. To znamená, že polydisperzity PDMAAmem pokrytých ABHA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ and AMPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ částic byly užší než u CCHPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanočástic. Hydrodynamická velikost shluků $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PDMAAm nanočástic byla přibližně 206 nm. Hodnoty polydisperzity PI se blížily 0,2, což odráží nepříliš širokou distribuci velikostí částic. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PDMAAm nanočástice byly koloidně stabilní po dobu několika měsíců.

3.3. Maghemit pokrytý silikou

Vrstva siliky byla na $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ částice zavedena Stöberovou metodou za použití bazicky katalyzované hydrolyzy tetramethyl-orthosilikátu (TMOS)¹⁸. K zavedení aminových skupin na povrch $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /SiO₂ částic byl použit (3-aminopropyl)triethoxysilan) (APTES; Obrázek 4).



Obrázek 4. Silanizace $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanočástic pomocí tetramethyl-orthosilikátu (TMOS) a následná modifikace pomocí (3-aminopropyl)triethoxysilanu (APTES).

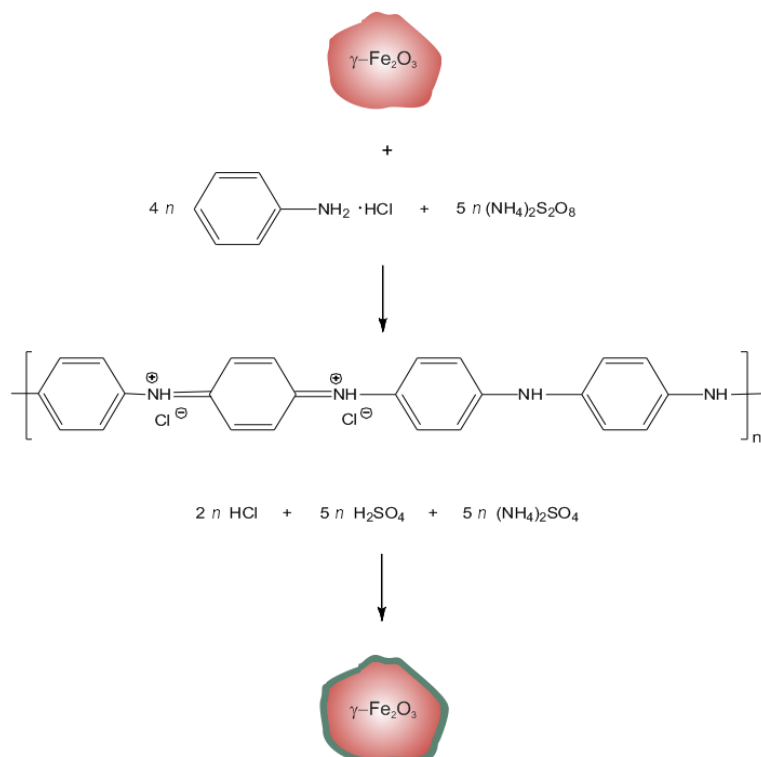


Obrázek 5. TEM mikrofotografie $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2$ částic získaných při hmotnostních poměrech $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{TMOS} =$ (a) 0,8, (b) 0,4, (c) 0,2 a (d) 0,1.

V průběhu syntézy byl hmotnostní poměr $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{TMOS}$ měněn v rozmezí 0,1-0,8, aby byla regulována morfologie a velikost $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2$ nanočástic (Obrázek 5). Podle očekávání byl na TEM mikrofotografiích pozorován okolo částic „kruh“ pouze při vysokém hmotnostním poměru $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{TMOS}$ (0,8), což naznačuje přítomnost siliky na povrchu částic. Jejich velikost činila 12 nm a současně částice vykazovaly poměrně malý index polydisperzity ($\text{PDI} = 1,07$); tloušťka silikové vrstvy činila 2,2 nm. S rostoucím množstvím TMOS vzhledem k oxidu železa (hmotnostní zlomek $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{TMOS} = 0,2$) početní průměr velikosti narůstal ($D_n = 19$ nm). Hydrodynamický průměr D_h byl opět větší než D_n a rostl z 100 nm pro holý $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ k ~ 300 nm pro $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2$ částice. Polydisperzita nanočástic připravených při nízkých poměrech $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{TMOS}$ naznačovala širokou distribuci velikostí částic. Po poslední modifikaci s APTES, byly na částice zavedeny aminové skupiny, které mohou být využity k navázání biomolekul. Částice pokryté porézní silikou byly získány za přítomnosti cetyltrimethylamonium bromidu, který byl přidán v druhém reakčním kroku v průběhu modifikace s APTES. Rovněž jsme sledovali vliv několika reakčních parametrů na tloušťku SiO_2 vrstvy okolo nanočástic. Specifický povrch (S_{BET}) vzrostl z ~ 66 m^2/g (holý $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) na 206 m^2/g pro $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částice, což dokumentovalo porézní charakter silikové vrstvy.

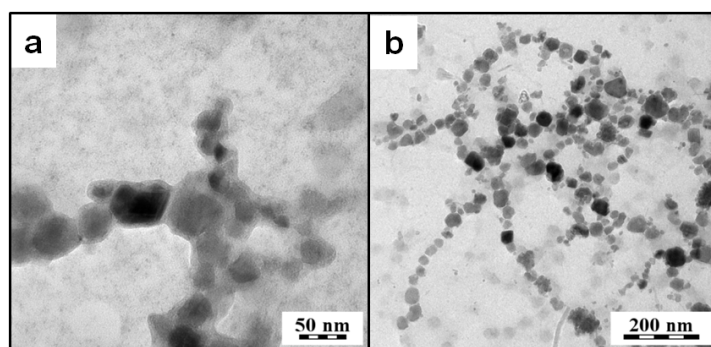
3.4. Maghemit pokrytý polyanilínem

Vodivá PANI vrstva byla připravena na povrchu $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ částic oxidací anilín hydrochloridu peroxidisíranem amonným při 0 a 25 $^\circ\text{C}$ za přítomnosti poly(*N*-vinylpyrolidonu) (PVP) jako stabilizátoru (Obrázek 6). Tloušťka PANI vrstvy adsorbované na povrchu byla regulována reakční teplotou. Početní průměr $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\&\text{PANI}$ částic s morfologií



Obrázek 6. Oxidace anilín hydrochloridu peroxidisíranem amonným v přítomnosti $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ částic stabilizované poly(*N*-vinylpyrolidonem).

„jádro-slupka“ připravených při 0 °C byl 11 nm. Byly-li částice připraveny při 25 °C, jejich velikost vzrostla na 25 nm. Tomu odpovídaly i hydrodynamické průměry, které činily 192 a 257 nm.



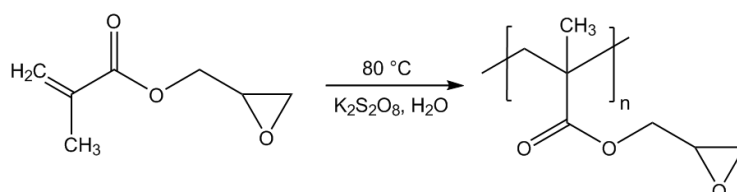
Obrázek 7. TEM mikrofotografie $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ &PANI částic připravených při (a) 0 and (b) 25 °C.

Nasyčená magnetizace holých $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ částic byla $\sim 50 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$, což odpovídá 61 hm.% čistého maghemitu. Po pokrytí nanočástic polyanilinem, klesla nasycená magnetizace $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ &PANI na $\sim 14 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$, což naznačuje přítomnost 28 hm.% obsah maghemitu v kompozitních nanočásticích.

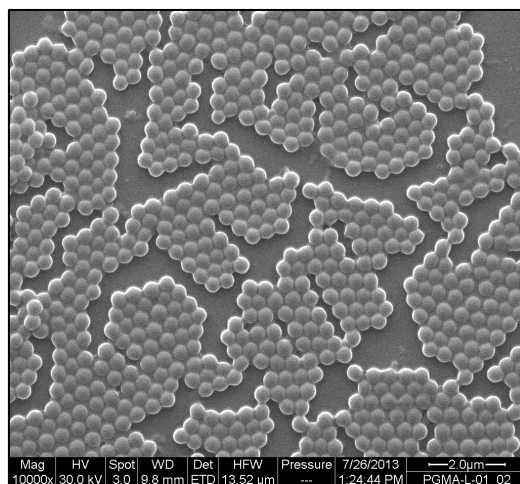
3.5. Poly(glycidyl-methakrylátové) nanočástice modifikované tioninem

Monodisperzní poly(glycidyl-methakrylátové) (PGMA) nanočástice byly připraveny bezemulgátorovou emulzní polymerizací (Obrázek 8) a byl sledován vliv koncentrací monomeru a iniciátoru na velikost PGMA částic (Obrázek 9).

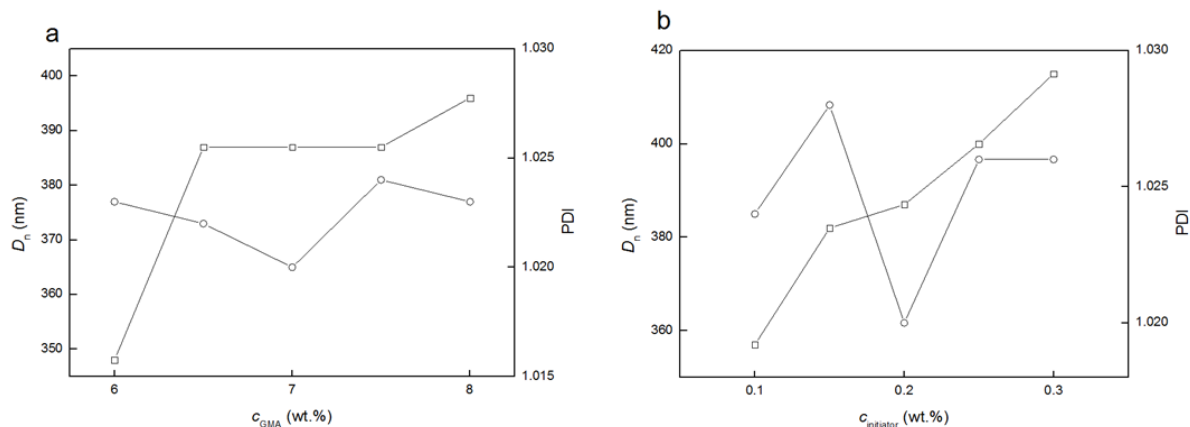
a



b

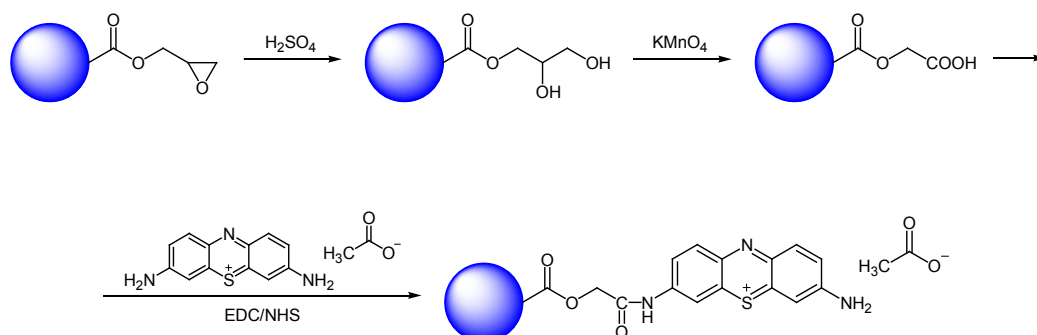


Obrázek 8. (a) Polymerizace glycidyl-methakrylátu a (b) SEM mikrofotografie PGMA nanočástic.



Obrázek 9. Závislost (\square) početního průměru (D_n) a (\circ) indexu polydisperzity (PDI) PGMA nanočástic na koncentraci (a) GMA (0.2 hm.% $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) a (b) $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ve vodě (7 hm.% GMA).

Částice byly sférické s D_n v rozmezí 300-400 nm v závislosti na koncentraci GMA monomeru ve vodě (Obrázek 9 a). Velikost PGMA nanočástic rostla s rostoucí koncentrací monomeru, což může být připsáno skutečnosti, že monomer je dobré rozpouštědlo pro polymer. Tím dochází k opožděné nukleaci, menšímu počtu vniklých nukleí a tím i větší velikosti částic. Závislost velikosti PGMA nanočástic na koncentraci iniciátoru ve vodě ukázala, že velikost částic rostla z 360 na 420 nm díky vyššímu počtu radikálů na monomer (Obrázek 9 b). Pro připravené nanočástice byla typická úzká distribuce velikostí. Pro přípravu poly(karboxymethyl-methakrylátových) (PCMMA) částic byly PGMA nanočástice hydrolyzovány H_2SO_4 a oxidovány $KMnO_4$. Posledním krokem byla modifikace elektronovým mediátorem tioninem (Th) kovalentně navázaným karbodiimidovou chemií (Obrázek 10).



Obrázek 10. Příprava PCMMA&Th nanočástic hydrolyzou poly(glycidyl-methakrylátu), následnou oxidací a reakcí s tioninem pomocí *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu (EDC) a *N*-hydroxysulfosukcinimidu (NHS).

3.6. Biologické experimenty

Biologické experimenty potvrdily, že γ - Fe_2O_3 &PDMAAm, γ - Fe_2O_3 &SiO₂ i γ - Fe_2O_3 &SiO₂-NH₂ „core-shell“ nanočástice byly rozpoznány a pohlceny makrofágy. Dále bylo zjištěno, že γ - Fe_2O_3 &PDMAAm a γ - Fe_2O_3 &SiO₂ nanočástice nejsou cytotoxické ani při vysokých dávkách (75 μ g/cm²) po dlouhou inkubační dobu (72 h), na rozdíl od výchozího γ - Fe_2O_3 . Porézní γ - Fe_2O_3 &SiO₂-NH₂ nanočástice neinterferovaly s fagocytární aktivitou monocytů a granulocytů a též neovlivňovaly respirační reakce fagocytů. V porovnání s kontrolními experimenty nebyly nalezeny žádné rozdíly v proliferační odpovědi T-lymfocytů, stejně tak jako T-závislých B buněk, v přítomnosti γ - Fe_2O_3 &SiO₂-NH₂ částic při všech koncentracích. Rovněž γ - Fe_2O_3 &PANI částice mohou být považovány za bezpečné pro biologické aplikace. Růst buněk byl inhibován vysokou koncentrací γ - Fe_2O_3 &PANI částic, avšak morfologie buněk vystavených koncentraci 100 μ g γ - Fe_2O_3 a γ - Fe_2O_3 &PANI na ml se neměnila a buňky nevykazovaly známky poškození. Vliv γ - Fe_2O_3 &PANI nanočástic na životaschopnost SH-SY5Y buněk odvozených z lidské neuroblastomy byl zjišťován v reálném čase.

V neposlední řadě biologické experimenty zahrnovaly použití PCMMA&Th nanočástic v imunosenzoru, kde byl použit enzym (křenová peroxidáza; HRP) jako zdroj elektrického signálu. HRP byl na PCMMA a PCMMA&Th nanočástice imobilizován pomocí EDC/sulfo-NHS chemie. PCMMA&Th-HRP nanočástice zvyšovaly elektrochemický signál a citlivost biosenzoru. Nanočástice tak představují vysoce citlivý a všestranný nástroj pro značení protilátek v imunosensorech, jejichž budoucí technologický potenciál tkví ve využití pro lékařská zařízení šitá na míru jednotlivým pacientům.

4. ZÁVĚR

V této práci byly úspěšně syntetizovány γ -Fe₂O₃ nanočástice a jejich povrch byl modifikován (i) poly(*N,N*-dimethylakrylamidem) pomocí radikálové polymerizace za použití metody „roubování z povrchu“ částic, (ii) silikou získanou hydrolýzou a kondenzací Si prekurzorů a (iii) polyanilínem připraveným oxidací anilín hydrochloridu peroxodisíranem amonným.

V neposlední řadě byly připraveny tioninem modifikované monodisperzní poly(glycidyl-methakrylátové) částice (velikost 390 nm) bezemulgátorovou emulzní polymerizací. Úspěšná modifikace nanočástic byla prokázána řadou fyzikálně-chemických metod. Všechny částice byly chemicky i koloidně stabilní po skladování v řádu několika měsíců.

V biologických testech byly všechny typy nanočástic inkubovány se zvířecími nebo lidskými buňkami, včetně makrofágů, buněk periferní krve a neuroblastomu. Rovněž byla hodnocena (imuno)toxicita a schopnost buněk pohltovat částice.

Všechny nově vyvinuté povrchově modifikované částice se ukázaly být netoxické a snadno internalizovatelné živými buňkami. Částice jsou slibné pro diagnostiku různých onemocnění, stejně tak i pro směřování rozmanitých biomolekul a specifických proteinů do cílových orgánů.

Rovněž bylo zjištěno, že monodisperzní PCMMA&Th-HRP nanočástice zesilují elektrochemický signál v biosenzorech a zvyšují tak jejich citlivost.

5. LITERATURA / REFERENCES

1. Nouaillhat A., An Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, ISTE, London 2008, UK.
2. Jarockyte G., Daugelaite E., Stasys M., Statkute U., Poderys V., Tseng T.C., Hsu S.H., Karabanovas V., Rotomskis R., Accumulation and toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cells and experimental animals, *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1193 (2016).
3. Duguet E., Vasseur S., Mornet S., Devoisselle J.M., Magnetic nanoparticles and their applications in medicine, *Nanomedicine (London U.K.)* 1, 157-68 (2006).
4. Gupta A.K., Gupta M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials* 26, 3995-4021 (2005).
5. Bauer L.M., Situ S.F., Griswold M.A., Samia A.C.S., High-performance iron oxide nanoparticles for magnetic particle imaging - guided hyperthermia (hMPI), *Nanoscale* 8, 12162-12169 (2016).
6. Bagheri S., Julkapli N.M., Modified iron oxide nanomaterials: Functionalization and application, *J. Magn. Magn. Mater.* 416, 117-133 (2016).
7. Cornell R.M., Schwertmann U., The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses, 2nd Ed., Wiley, Darmstadt 2000, Germany.
8. Horák D., Babič M., Macková H., Beneš M.J., Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations, *J. Sep. Sci.* 30, 1751-72 (2007).
9. Majidi S., Sehrig F.Z., Farkhani S.M., Goloujeh M.S., Akbarzadeh A., Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 44, 722-734 (2016).
10. Rawlings R.D., Materials Science and Engineering II, EOLSS Publishers, Oxford 2009, UK.
11. Ghosh Chaudhuri R., Paria S., Core/shell nanoparticles: Classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications, *Chem Rev.* 11, 2373-433 (2012).
12. Barrera C., Herrera A.P., Rinaldi C., Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly(ethylene glycol), *J. Colloid Interface Sci.* 329, 107-13 (2009).
13. Chastellain M., Petri A., Hofmann H., Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 278, 353-60 (2004).
14. Babič M., Horák D., Jendelová P., Glogarová K., Herynek V., Trchová M., Likavčanová K., Hájek M., Syková E., Poly(*N,N*-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling, *Bioconjugate Chem.* 20, 283-294 (2009).
15. Lu Y., Yin Y., Mayers B.T., Xia Y., Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach, *Nano Lett.* 2, 183-186 (2002).

16. Lei L., Ling-Ling J., Yun Z., Gang L., Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Research strategies and implications for nanomedicine, *Chin. Phys. B* 22, 127503 (2013).
 17. Mahmoudi M., Hofmann H., Rothen-Rutishauser B., Petri-Fink A., Assessing the *in vitro* and *in vivo* toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Chem. Rev.* 112, 2323-2338 (2012).
 18. Stöber W., Fink A., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *J. Colloid Interface Sci.* 26, 62-69 (1968).
-

6. ŽIVOTOPIS / CURRICULUM VITAE

BEATA ANNA ZASOŇSKA

EDUCATION AND EMPLOYMENT

- | | |
|---------------|---|
| 2011– current | Ph.D. student, macromolecular chemistry, Charles University in Prague, Department of Polymer Particles of the Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i. |
| 2010 – 2011 | UNESCO/IUPAC Postgraduate Course in Polymer Science, Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i. |
| 2009 – 2010 | Postgraduate study (Faculty of Education)
Warsaw University of Life Sciences |
| 2007 – 2009 | M.Sc. in chemistry, Cardinal Stefan Wyszyński University, College of Science, Institute of Physical Chemistry PAS |
| 2004 – 2007 | B.Sc. in mathematics and life sciences, Cardinal Stefan Wyszyński University, College of Science, Institute of Physical Chemistry PAS |

7. VYBRANÉ PUBLIKACE A KONFERENCE / SELECTED PUBLICATIONS AND CONFERENCES

1. Zasońska B.A., Boiko N., Horák D., Klyuchivska O., Macková H., Beneš M., Babič M., Trchová M., Hromádková J., Stoika R., The use of hydrophilic poly(*N,N*-dimethylacrylamide) grafted from magnetic γ -Fe₂O₃ nanoparticles to promote engulfment by mammalian cells, *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 479-491, **2013** (IF = 5.338).
2. Zasońska B.A., Boiko N., Klyuchivska O., Trchová M., Petrovský E., Stoika R., Horák D., Silica-coated γ -Fe₂O₃ nanoparticles: Preparation and engulfment by mammalian macrophages, *J. Nanopharm. Drug Delivery* 1, 182-192, **2013**.
3. Zasońska B.A., Čadková M., Kovářová L., Bílková Z., Korecká L., Horák D., Thionin-modified poly(glycidyl methacrylate) nanospheres as label of antibodies for biosensing applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 24926-24931, **2015** (IF = 7.145).
4. Zasońska B.A., Bober P., Jošt P., Boštík P., Horák D., Magnetoconductive maghemite core/polyaniline shell nanoparticles: Physico-chemical and biological assessment, *Colloids Surf. B* 141, 382-389, **2016** (IF = 3.9).
5. Zasońska B.A., Líšková A., Kuricová M., Tulinská J., Pop-Georgievski O., Ilavská S., Horváthová M., Jahnová E., Horák D., Functionalized porous silica&maghemite core-shell nanoparticles for applications in medicine: Design, synthesis and immunotoxicity, *Croat. Med. J.* 57, 165-179, **2016** (IF = 1.483).

Ostatní publikace / Other author's publications

Podhorodecki A., Noculak A., Banski M., Sojka B., Zelazo A., Misiewicz J., Cichos J., Karbowski M., Zasońska B.A., Horak D., Sikora B., Elbaum D., Dumych T., Bilyy R., Szewczyk M., Lanthanides fluorides doped nanocrystals for biomedical applications, *ECS Trans.* 61, 115-125, **2014**.

Huk A., Izak-Nau E., El Yamani N., Uggerud H., Vadset M., Zasońska B.A., Duschl A., Dušinska M., Impact of nanosilver on various DNA lesions and *HPRT* gene mutations – effects of charge and surface coating, *Part. Fibre Toxicol.* 12, 25, **2015** (IF = 8.6).

Bober P., Zasońska B.A., Humpolíček P., Kuceková Z., Varga M., Horák D., Babayan V., Kazantseva N., Prokeš J., Stejskal J., Polyaniline–maghemite based dispersion: Electrical, magnetic properties and their cytotoxicity, *Synth. Met.* 214, 23-29, **2016** (IF = 2.299).

Monografie / Monograph

Zasońska B.A., Patsula V., Stoika R., Horák D., Surface-modified magnetic nanoparticles for cell labeling, in: *The Chemistry and Physics of Engineering Materials, Vol. 1: Modern Analytical Methodologies*, Berlin A.A., Joswik R., Vatin N.I., eds., Apple Academic Press, Oakville 2015, Canada, pp. 145-164. ISBN 9781771880794.

PŘÍSPĚVKY NA KONFERENCÍCH (VYBRANÉ) / CONTRIBUTIONS ON CONFERENCES (SELECTED)

Zasoňská B.A., Boiko N., Horák D., Stoika R., Poly(*N,N*-dimethylacrylamide) shell/ γ -Fe₂O₃ core nanoparticles for labeling of mammalian cells, Polymers in Medicine, Prague, Czech Republic 2012, Abstract Book, p. 113.

Zasoňská B., Boiko N., Horák D., Stoika R., PDMAAm-coated γ -Fe₂O₃ nanoparticles for cell labeling, Bridges in Life Sciences Annual Conference, Biopolymers & Cells, Budapest, Hungary 2012, Abstract Book, p. 79.

Zasoňská B.A., Horák D., Boiko N., Stoika R., Silica/iron oxide nano- and microparticles for cell labeling, Career in Polymers V., Prague, Czech Republic 2013, Abstract Book, P 4.

Zasoňská B.A., Horák D., Boiko N., Stoika R., Silica-coated superparamagnetic nano- and microparticles for cell labeling, Bridges in Life Sciences Annual Conference, Prague, Czech Republic 2013, Abstract Book, p. 93.

Zasoňská B.A., Horák D., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with organic and inorganic polymer shell for imaging and tracking of macrophages, International Polymer Colloid Group Research Conference, Shanghai, People's Republic of China 2013.

Zasoňská B.A., Tulinská J., Horák D., Líšková A., Kuricová M., Bartušová M., Immunotoxicity of functionalized core-shell maghemite/porous silica nanoparticles, Frontiers of Polymer Colloids: From Synthesis to Macro-Scale and Nano-Scale Applications, 78th Prague Meeting on Macromolecules, Prague, Czech Republic 2014, Abstract Book, p. 151.

Zasoňská B.A., Líšková A., Tulinská J., Kuricová M., Bartušová M., Horák D., Functionalized core-shell porous silica/maghemite nanoparticles: Design, synthesis and immunotoxicity, Bridges in Life Sciences Annual Scientific Conference, Split, Croatia 2014, Abstract Book, p. 69.

Zasoňská B.A., Bober P., Jošt P., Boštík P., Horák D., Cytotoxicity of maghemite core/polyaniline shell nanoparticles, Bridges in Life Sciences Annual Scientific Conference, Wroclaw, Poland 2015, Abstract Book, p. 61.

Zasoňská B.A., Bober P., Jošt P., Boštík P., Horák D., Cytotoxicity of maghemite/polyaniline nanoparticles using human neuroblastoma cells, Functional Polymers at Bio-Material Interfaces, 79th Prague Meeting on Macromolecules, Prague, Czech Republic 2015, Abstract Book, p. 66.