

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra anorganické chemie**

---

NANOKRYSTALICKÉ PEROVSKITOVÉ FÁZE  
PRO MRI A FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPII

Perovskite nanoparticles for MRI  
and fluorescence microscopy

Diplomová práce  
studijního oboru Anorganická chemie

Praha 2009

Michal Kačenka

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a grantů KAN201110651 a KAN20020061.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Jana Kotka, Ph.D., a konzultanta Mgr. Ing. Ondřeje Kamana, a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

V Praze dne 30. srpna 2009

# Obsah

<b>1</b>	<b>Obecný úvod</b>	<b>6</b>
1.1	Perovskity	6
1.1.1	Perovskitové manganity	7
1.1.2	Manganity s obsahem La a Sr	8
1.2	Zobrazování magnetickou rezonancí	9
1.2.1	Kontrastní látky	10
1.3	Nanočástice s možností detekce MR/fluorescence	15
1.4	Strategie přípravy duálních MR/fluorescenčních nanočástic	16
1.4.1	Fluorescenční barvivo navázané na molekuly nízkomolekulárního obalu	16
1.4.2	Fluorescenční barvivo navázané na organický polymerní obal	18
1.4.3	Fluorescenční barvivo kovalentně navázané do vrstvy SiO <sub>2</sub>	19
1.4.4	Kvantové tečky ve vrstvě amorfního SiO <sub>2</sub>	21
1.4.5	Heterodimerní částice – srostlice magnetických částic s Au nanočásticemi	22
1.4.6	Magnetické nanočástice obalené vrstvou Au	23
1.4.7	Uhlíkové nanotuby navázané na magnetické částice	23
<b>2</b>	<b>Motivace a cíl práce</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Popis výchozích materiálů</b>	<b>25</b>
3.1	La <sub>0,75</sub> Sr <sub>0,25</sub> MnO <sub>3</sub>	25
3.2	LSMO@SiO <sub>2</sub>	26
3.3	LSMO@SiO <sub>2</sub> -APS	29
<b>4</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>31</b>
4.1	Použité chemikálie	31
4.2	Charakterizační a preparační metody	31
4.2.1	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	31
4.2.2	Dynamický rozptyl světla (DLS)	32
4.2.3	ζ-potenciál	32
4.2.4	IR spektroskopie – DRIFTS	33
4.2.5	UV-Vis spektroskopie	33
4.2.5.1	<i>Fotometrické stanovení obsahu Mn v suspenzích nanočástic</i>	34
4.2.6	Luminiscenční spektroskopie	34
4.2.7	NMR spektroskopie	35
4.2.8	Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	35

4.2.9	Hmotnostní spektrometrie (MS)	35
4.2.10	RTG difrakce	35
4.2.11	Centrifugace	36
4.2.12	Ultrazvuková sonifikace	36
<b>4.3</b>	<b>Biologické experimenty</b>	<b>36</b>
4.3.1	Buněčné studie s HeLa buňkami a fibroblasty	36
4.3.1.1	<i>Testy viability</i>	36
4.3.1.2	<i>Fluorescenční mikroskopie</i>	37
4.3.1.3	<i>Buněčné linie</i>	37
4.3.1.4	<i>Média a chemikálie</i>	37
4.3.1.5	<i>Instrumentace</i>	38
4.3.2	Buněčné studie s kmenovými buňkami	38
4.3.2.1	<i>Testy viability a fluorescenční mikroskopie</i>	38
4.3.2.2	<i>Použité buňky</i>	39
4.3.2.3	<i>Média a chemikálie</i>	39
4.3.2.4	<i>Instrumentace</i>	39
4.3.3	Inkubace nanočástic s Langerhansovými ostrůvky	39
4.3.3.1	<i>Kultivace, in vitro vitalita</i>	39
4.3.3.2	<i>Statické inkubace</i>	40
4.3.3.4	<i>Média a chemikálie</i>	40
4.3.3.5	<i>Magnetická rezonance</i>	41
<b>4.4</b>	<b>Syntetická část</b>	<b>42</b>
4.4.1	Strategie přípravy	42
4.4.2	Příprava konjugátu APS–FITC	42
4.4.2.1	<i>Příprava FITC</i>	42
4.4.2.2	<i>Konjugace APS + FITC</i>	43
4.4.3	Enkapsulace LSMO do křemičitého obalu	45
4.4.3.1	<i>Standardní příprava LSMO@SiO<sub>2</sub></i>	45
4.4.3.2	<i>Standardní příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>–APS</i>	46
4.4.3.3	<i>Příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)</i>	47
4.4.3.4	<i>Příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub></i>	47
4.4.3.5	<i>Výpočet množství PVP K25 pro stabilizaci LSMO</i>	48
4.4.3.6	<i>Výpočet množství TEOS a APS pro enkapsulaci</i>	48
4.4.4	Příprava suspenzí nanočástic obalených polymery	51
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze</b>	<b>52</b>
5.1	Příprava LSMO@SiO <sub>2</sub> a LSMO@SiO <sub>2</sub> –APS	52
5.2	Optické vlastnosti LSMO@SiO <sub>2</sub>	52

<b>5.3</b>	<b>Pokus o zvýšení fluorescence LSMO dopováním europiem</b>	<b>56</b>
<b>5.4</b>	<b>Pokus o nekovalentní navázání fluorescenčního barviva do vrstvy amorfního SiO<sub>2</sub></b>	<b>57</b>
<b>5.5</b>	<b>Navázání FITC na povrchové aminoskupiny LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS</b>	<b>58</b>
<b>5.6</b>	<b>Příprava a charakterizace LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub></b>	<b>59</b>
5.6.1	Příprava FITC	60
5.6.2	Konjugace APS + FITC	60
5.6.3	Příprava a charakterizace LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)	61
5.6.4	Příprava a charakterizace LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)@SiO <sub>2</sub>	64
5.6.5	Optické vlastnosti	70
<b>5.7</b>	<b>Biologické experimenty s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub></b>	<b>74</b>
5.7.1	HeLa buňky a fibroblasty	74
5.7.2	Kmenové buňky	77
5.7.3	Langerhansovy ostrůvky	77
<b>5.8</b>	<b>Biologické experimenty s nanočásticemi pokrytými polymery</b>	<b>78</b>
5.8.1	Příprava suspenzí LSMO@SiO <sub>2</sub> s rozpustnými polymery	79
5.8.2	Stanovení nejvhodnějšího polymeru pro obalování LSMO@SiO <sub>2</sub>	80
5.8.3	Buněčné studie s LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)@SiO <sub>2</sub> obaleným PVP	84
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Seznam zkratk</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy</b>	<b>97</b>

# 1 Obecný úvod

## 1.1 Perovskity

V přírodě relativně hojný minerál perovskit ( $\text{CaTiO}_3$ , Obr. 1) byl poprvé popsán v roce 1839 německým mineralogem Gustavem Rosem z dolu Achmatovsk (Ахматовская коп) ve Zlatoustu na Urale. Pojmenován byl po ruském mineralogovi Lvu Alexejeviči von Perowski.<sup>[1]</sup> Do skupiny perovskitu (dle Strunzova mineralogického systému) jsou kromě vlastního perovskitu řazeny ještě například minerály lakargiit –  $\text{Ca}(\text{Zr},\text{Sn},\text{Ti})\text{O}_3$ , latrappit –  $(\text{Ca},\text{Na})(\text{Nb},\text{Ti},\text{Fe})\text{O}_3$ , loparit-Ce –  $(\text{Ce},\text{Na},\text{Ca})\text{TiO}_3$ , lueshit –  $\text{NaNbO}_3$  a tausonit –  $\text{SrTiO}_3$ .<sup>[2]</sup> Kromě relativně omezeného množství přírodních perovskitů je známa celá řada syntetických materiálů s analogickou strukturou.



Obr. 1: 9 mm srostlice krystalů perovskitu z Magnet Cove, Arkansas, USA. Převzato z internetové databáze mindat.org.<sup>[3]</sup>

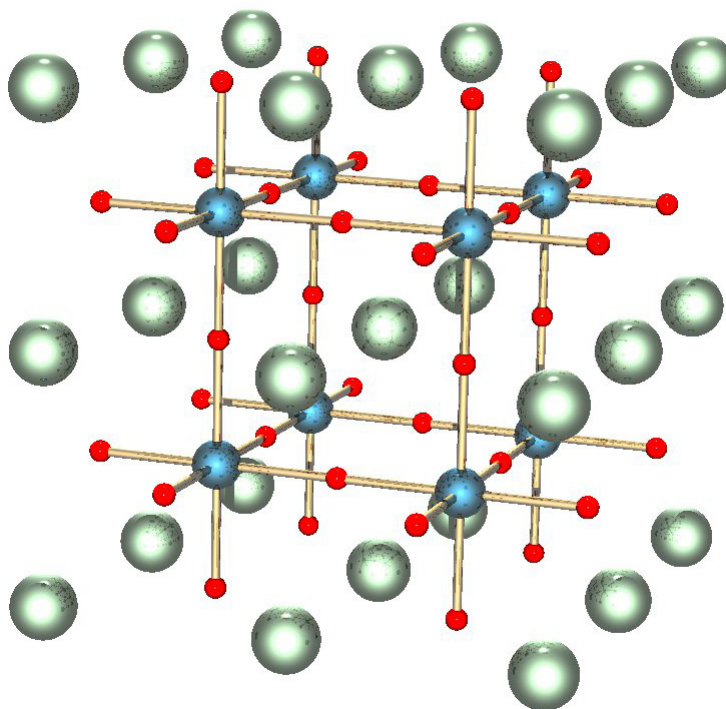
Struktura perovskitu (Obr. 2) je jedním ze základních strukturních typů anorganických sloučenin. Velké kationty  $\text{Ca}^{2+}$  a oxidové anionty společně tvoří mřížku nejtěsnějšího krychlového uspořádání a malé kationty  $\text{Ti}^{4+}$  obsazují oktaedrické dutiny tvořené výhradně kyslíkovými anionty. Perovskitovou strukturu mohou mít i neoxidické materiály, obecně je tedy složení perovskitů  $\text{ABX}_3$ , kde A jsou velké kationty, jenž tvoří společně s anionty X krychlovou mřížku, a B jsou malé kationty obsazující oktaedrické dutiny. Struktura je velmi často porušena a distorze vedou ke snížení symetrie krystalové mříže, přičemž ani vlastní minerál perovskit  $\text{CaTiO}_3$  nemá ideální kubickou perovskitovou strukturu, nýbrž je orthorhombický. V distortovaných strukturách dochází k naklánění oktaedrů  $\text{BX}_6$ , čímž se vyrovnává nepříznivý poměr velikostí iontů A a B.<sup>[4,5]</sup> Distorzi struktury je možno vyjádřit pomocí tzv. tolerančního faktoru  $f$ , který je definován jako

$$f = \frac{r_B + r_X}{\sqrt{2}(r_A + r_X)}$$

kde  $r_i$  ( $i = \text{A}, \text{B}, \text{X}$ ) odpovídá průměrnému iontovému poloměru atomu v dané poloze. Ideální kubická perovskitová struktura by vykazovala  $f=1$ , reálné stabilní perovskitové materiály mají toleranční faktor v rozmezí  $0,8 < f < 1$ . S poklesem  $f$  se symetrie snižuje na rhomboedrickou a dále až na orthorhombickou.<sup>[6]</sup>

Distorze kubického uspořádání na strukturu s nižší symetrií je často příčinou vlastností, pro které bývají perovskity poměrně hojně zkoumány. Mezi perovskity nacházíme širokou řadu mate-

riálů s různými zajímavými vlastnostmi. Pro ilustraci je možno jmenovat BaTiO<sub>3</sub> jakožto klasický příklad ferroelektrické perovskitové fáze,<sup>[4,5]</sup> NaTaO<sub>3</sub> s fotokatalytickými vlastnostmi,<sup>[7]</sup> polovodiivý vrstevnatý (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SnI<sub>4</sub> s organickým kationtem,<sup>[4,8]</sup> či luminiscenční Ce-dopované YAP (Yttrium-Aluminium Perovskite) a LuAP (Lutecium-Aluminium Perovskite) používané jako vysoce citlivé scintilátory v tomografii (CT, PET).<sup>[9]</sup>



Obr. 2: Schéma perovskitové struktury. Červené koule značí atomy v polohách X, modré koule značí polohy malých kationtů B a zelené koule značí polohy velkých kationtů A. Převzato z internetové encyklopedie Wikipedia.<sup>[10]</sup>

### 1.1.1 Perovskitové manganity

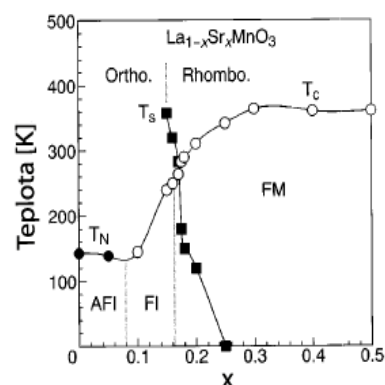
Manganity s perovskitovou strukturou jsou látky obecného složení  $RE^{3+}_{(1-x)}M^{2+}_xMn^{3+}_{(1-x)}Mn^{4+}_xO_3$ , kde  $RE^{3+}$  je trojmocný ion kovů vzácných zemin ( $Y^{3+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Pr^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$ ,  $Sm^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$ , ...), případně  $Bi^{3+}$ , a  $M^{2+}$  je dvojmocný ion kovů alkalických zemin nebo  $Pb^{2+}$ . Tyto ionty obsazují pozice A perovskitové struktury, zatímco Mn obsazuje ve struktuře polohy B. Atomy Mn jsou v oxidačních stavech  $Mn^{3+}$  a  $Mn^{4+}$ , jejich zastoupení lze řídit kontrolovaným složením manganitu (vyjádřeným pomocí  $x$ ). Průměrné oxidační číslo Mn je tedy  $3 + x$ . Tato tzv. *metoda řízené valence* (uplatňuje se i u jiných fází) spočívá ve využití vlivu valencí velkých kationtů na valence iontů manganu, potažmo na průměrné oxidační číslo Mn.<sup>[6,11]</sup>

Perovskitové manganity jsou atraktivními materiály zejména pro své magnetické a elektrické vlastnosti. Jejich specifickou vlastností je mohutný pokles měrného odporu materiálu při apli-

kaci magnetického pole, tzv. *kolosální magnetoresistance* (Collosal Magnetoresistance, CMR).<sup>[6,12]</sup> Materiály s podobnými vlastnostmi se využívají mimo jiné například ve čtecích hlavách moderních pevných disků, což je jedním z důvodů současného značného zájmu o manganity s CMR.<sup>[13]</sup> Jako příklady hojně studovaných fází vykazujících CMR je možno uvést  $\text{La}_{2/3}\text{Ba}_{1/3}\text{MnO}_{3+\gamma}$ <sup>[12],\*</sup> nebo polovodivý  $\text{Nd}_{0,5}\text{Pb}_{0,5}\text{MnO}_3$ .<sup>[14]</sup> Mimo materiálového výzkumu orientovaného na použití v elektrotechnice jsou díky svým magnetickým vlastnostem manganity v současnosti zkoumány také jako potenciální aktivní složky pro magnetickou fluidní hypertermii (MFH).<sup>[15,16,17,18]</sup>

### 1.1.2 Manganity s obsahem La a Sr

Manganit  $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$  (LSMO) je v literatuře uváděn jako prototypový materiál vykazující CMR.<sup>[6]</sup> Jeho magnetické a elektrické vlastnosti je možné ovlivňovat změnou složení, konkrétně hodnoty  $x$ . Mateřská sloučenina  $\text{LaMnO}_3$  je antiferomagnetickým izolantem s Néelovou teplotou  $T_N \sim 140$  K. Postupná substituce La za Sr (čímž se zvyšuje toleranční faktor  $f$ ) vede ke snižování sterických distorzí a tím pro  $x > 0,15$  ke změně symetrie z orthorhombické ( $Pnma$ ) na rhomboedrickou ( $R\bar{3}c$ ). Zároveň probíhá dopování děrovými nositeli náboje  $\text{Mn}^{3+} \rightarrow \text{Mn}^{4+}$  vedoucí k poklesu příspěvku Jahn-Tellerovské distorze perovskitové struktury, a postupně k itinerantnímu chování (delokalizaci) nositelů náboje. Důsledkem je vznik dvojité výměny vedoucí ke vzniku feromagnetického uspořádání a k přechodu izolant–kov. Variací  $x$  v daném rozmezí je tak možné u feromagnetické fáze měnit magnetické vlastnosti, Curieovu teplotu  $T_C$  a magnetizaci (viz Obr. 3).<sup>[6,19]</sup> V závislosti na složení LSMO se  $T_C$  pohybuje v rozmezí 250–350 K. Právě takové materiály jsou velmi vhodné pro použití v MFH, protože jsou LSMO zkoumány.



Obr. 3: Magnetický fázový diagram LSMO ukazující závislost magnetických vlastností na teplotě a složení LSMO. Zkratky označují jednotlivé fáze: antiferomagnetický izolant (AFI), feromagnetický izolant (FI), feromagnetický kov (FM). Druhá křivka ukazuje přechod orthorhombické modifikace na rhomboedrickou. Převzato z literatury.<sup>[19]</sup>

\*  $\gamma$  vyjadřuje odchylku od ideální stechiometrie.

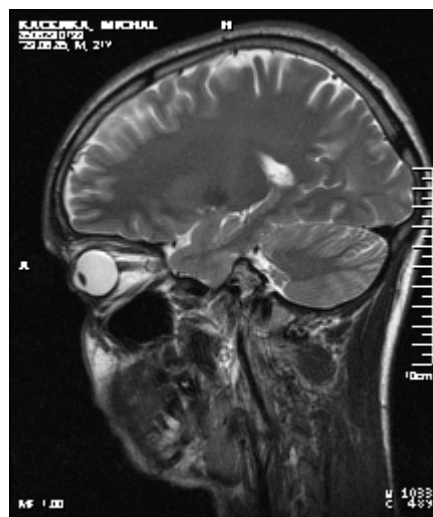


## 1.2 Zobrazování magnetickou rezonancí

Zobrazování magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Imaging, MRI) je velmi moderní neinvazivní technika umožňující trojrozměrné zobrazování vnitřních částí lidského těla (viz Obr. 4). Metoda MRI byla objevena počátkem 70. let 20. století Paulem C. Lauterburem,<sup>[20]</sup> jenž společně s Peterem Mansfieldem získal v roce 2003 Nobelovu cenu za medicínu za příspěvní k objevu a matematickému objasnění MRI.<sup>[21]</sup> Uznání za objev MRI je však poněkud kontroverzní, neboť svého podílu na něm se veřejně začal domáhat i americký lékař Raymond Vahan Damadian, jenž údajně zkonstruoval první MRI scanner ještě před Lauterburem.<sup>[22]</sup>

MRI funguje na stejném principu jako nukleární magnetická rezonance (NMR) používaná např. v chemické analýze. NMR umožňuje měřit prakticky všechna atomová jádra s nenulovým jaderným spinem  $I$ . Taková jádra mají nenulový magnetický moment. Po aplikaci magnetického pole na jádra se původně náhodně orientované vektory magnetického momentu vyrovnají do  $2I + 1$  orientací. Energie nutná pro přechod jádra mezi různými orientacemi magnetických momentů odpovídá energii radiofrekvenčního záření. Vůbec nejčastěji měřenými jádry v NMR spektroskopii jsou  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ .<sup>[23]</sup> Jelikož lidské tělo je složeno z více než 70 % vody, je získávání obrazu v MRI standardně založeno na měření signálů  $^1\text{H}$  vody.<sup>[24]</sup> V malé míře, zejména v experimentálním uspořádání, se obraz v MRI získává i pomocí jiných NMR aktivních jader, např.  $^3\text{He}$ ,<sup>[25]</sup>  $^{129}\text{Xe}$ <sup>[25,26]</sup> a  $^{19}\text{F}$ .<sup>[27]</sup>

Při použití NMR v analytické chemii získáváme signály jednotlivých atomů s NMR aktivními jádry s různou hodnotou tzv. chemického posunu  $\delta$ . Tato hodnota odpovídá energii nutné k přechodu mezi jednotlivými energetickými hladinami. Z hodnoty chemického posunu  $\delta$  je možno usuzovat na okolní atomy v molekule. Signál vody je ale stále signálem jedné a té samé sloučeniny, a proto má v různých tkáních téměř shodný chemický posun. Měření chemického posunu  $\delta$  tedy neposkytuje prakticky žádný kontrast mezi různými tkáněmi. Naproti tomu relaxační časy\* molekul vody se v různých tkáních v organismu (např. zdravá tkáň/nádor) mění dosti výrazně.



Obr. 4: Řez autorovou hlavou pořízený na 3 T MRI tomografu Siemens.

\* Součet vektorů magnetického momentu přítomných jader dává vznik makroskopické vektorové veličině – magnetizaci. Relaxační časy vyjadřují čas potřebný pro návrat vektoru magnetizace do původní polohy.  $T_1$ , longitudinální relaxační čas, vyjadřuje čas potřebný pro navrácení vektoru magnetizace zpět na původní hodnotu ve směru osy  $z$ ;  $T_2$ , transversální relaxační čas, vyjadřuje čas potřebný pro relaxaci v rovině kolmé na osu  $z$ .

Na relaxačních časech je závislá intenzita signálu;\* jejím měřením je tedy možno získávat informaci o povaze zobrazované tkáně.<sup>[24]</sup> Prostorové rozlišení pak zajišťuje soustava gradientů magnetického pole podél os souřadného systému. V každém místě podél tohoto gradientu je možno měřit signál vody při jiné rezonanční frekvenci. Příslušná rezonanční frekvence v sobě tedy nese prostorovou informaci, intenzita pak informaci kvalitativní. Kombinace gradientů potom umožňuje rozdělit jednotlivé řezy do přesně definovaných objemových elementů – voxelů.<sup>[24]</sup>

### 1.2.1 Kontrastní látky

Další zvýšení kontrastu je podobně jako u jiných zobrazovacích technik možno dosáhnout použitím *kontrastních látek* (Contrast Agents, CA). Nejsou však zobrazovány přímo CA, nýbrž kontrastní látkou ovlivněné molekuly vody.\*\* Principem kontrastních látek je výrazné ovlivnění relaxačních časů molekul vody. To se projeví změnou intenzity měřeného NMR signálu. Během kratší doby měření tak získáme větší kontrast.<sup>[24]</sup>

Kontrastní látky je možno dělit do dvou skupin:

- $T_1$  CA, zvané *pozitivní CA*. Tyto látky zkracují zejména  $T_1$  relaxační čas a zvyšují tak intenzitu signálu.
- $T_2$  CA, zvané *negativní CA*, významně zkracující relaxační čas  $T_2$ , což způsobuje pokles signálu.

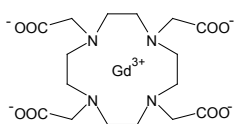
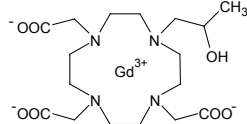
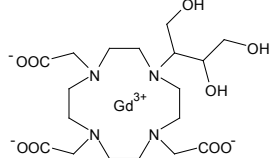
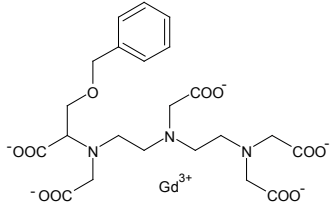
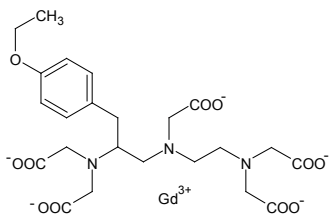
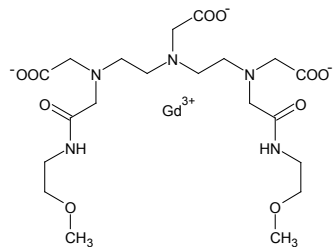
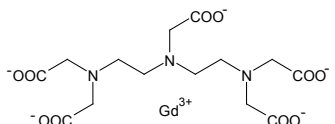
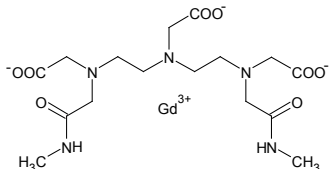
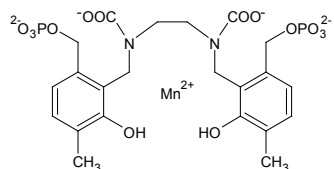
Relaxační časy jsou značně ovlivňovány nepárovými elektrony. Jako  $T_1$  CA jsou zkoumány komplexy paramagnetických iontů  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  a především  $Gd^{3+}$ . Základními požadovanými vlastnostmi takových sloučenin jsou termodynamická stabilita a zejména kinetická inertnost, zajišťující, aby se toxické volné ionty kovů neuvolňovaly do organismu. Vzhledem k dalším elektronickým a magnetickým vlastnostem jsou  $T_1$  CA (jak experimentální, tak klinicky používané) založeny převážně na chelátech  $Gd^{3+}$ . Většina těchto sloučenin jsou komplexy  $Gd^{3+}$  s DTPA nebo DOTA a jejich deriváty (viz **Tab. 1**).<sup>[28,29]</sup>

Ve skupině  $T_2$  CA hrají naprosto rozhodující roli materiály založené na magnetických nanočásticích.  $T_2$  relaxační časy molekul vody v okolí částice jsou výrazně zkracovány magnetickým momentem částice (případně indukovaným magnetickým momentem superparamagnetické částice). Takové zkrácení  $T_2$  relaxačního času způsobí ztmavnutí dané oblasti v  $T_2$ -váženém MR obrazu. Klasicky se jedná o magnetická jádra, představující vlastní kontrastní činidlo, na jejichž povrch je pro zlepšení koloidní stability a biokompatibility zpravidla nekovalentně navázán vhod-

\* Při standardně používané pulsní sekvenci spin-echo se intenzita signálu  $S$  řídí úměrností  $S \approx (1 - e^{-TR/T_1})e^{-TE/T_2}$ ; kde  $TR$  a  $TE$  jsou víceméně technické parametry pulsní sekvence a  $T_1$  a  $T_2$  příslušné relaxační časy.

\*\* Toto platí pouze pro  $^1H$  MRI, např. jádra  $^{19}F$  fluorovaných CA jsou zobrazována přímo.

Tab. 1: Struktury klinicky používaných nízkomolekulárních  $T_1$  CA a jejich obchodní názvy (tučně jsou uvedeny mezinárodně uznávané akronymy daných struktur používané zejména v chemické a lékařské literatuře, kurzívou jsou uvedeny tzv. „generické názvy“, používané zejména ve farmacii, a na posledním řádku jsou obchodní názvy společně s příslušným výrobcem).<sup>[28–33]</sup> Pro zjednodušení jsou v případě soli zobrazeny jen Gd obsahující komplexní anionty a není zobrazena koordinovaná molekula vody.

 <p><b>Gd-DOTA</b> <i>Gadoterate glumine</i> Dotarem® (Guerbet, Paris, Francie)</p>	 <p><b>Gd-HPDO3A</b> <i>Gadoteridol</i> ProHance® (Bracco, Milano, Itálie)</p>	 <p><b>Gd-BT-DO3A</b> <i>Gadobutrol</i> Gadovist® (Bayer, Berlin, Německo)</p>
 <p><b>Gd-BOPTA</b> <i>Gadobenate dimeglumine</i> MultiHance® (Bracco, Milano, Itálie)</p>	 <p><b>Gd-EOB-DTPA</b> <i>Gadoxetic acid</i> Primovist®, Eovist® (Bayer, Berlin, Německo)</p>	 <p><b>Gd-DTPA-BMEA</b> <i>Gadoversetamide</i> OptiMARK® (Covidien, St. Louis, USA)</p>
 <p><b>Gd-DTPA</b> <i>Gadopentetate dimeglumine</i> Magnevist® (Bayer, Berlin, Německo)</p>	 <p><b>Gd-DTPA-BMA</b> <i>Gadodiamide</i> Omniscan® (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Velká Británie)</p>	 <p><b>Mn-DPDP</b> <i>Mangafodipir trisodium</i> Teslascan® (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Velká Británie)</p>

ný polymer/biopolymer, např. dextran či polyethylenglykol (PEG).

Naprostu dominantní postavení mezi  $T_2$  CA mají tzv. SPIO částice (Superparamagnetic Iron Oxide).<sup>\*</sup> Takové nanočástice jsou již běžně používány v klinické praxi. Tuto skupinu látek je možno dále rozdělit (podle klesající velikosti částic) na tzv. orálně podávané SPIO částice, standardní SPIO (SSPIO), a USPIO (Ultrasmlal Superparamagnetic Iron Oxide).<sup>[34,35]</sup> Částice SPIO a USPIO

\* Blíže nespécifikované oxidy železa; nejpoužívanějšími fázemi jsou magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) a maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ).

Tab. 2: Tabulka vlastností klinicky používaných nebo klinicky testovaných  $T_2$  CA založených na nanočásticích oxidů železa. Uvedené hodnoty milimolárních relaxivit odpovídají měření při magnetickém poli indukce  $B_0$ . Data převzata z literatury.<sup>[32–37]</sup>

	generický název	kódové označení	obchodní název	výrobce	materiál obalu	průměr [nm]	velikost jádra [nm]	relaxivita [mmol <sup>-1</sup> ·l·s <sup>-1</sup> ]		$B_0$ [T]	použití
								$r_1$	$r_2$		
Oral SPIO	<i>ferumoxsil</i>	AMI-121	GastroMARK® Lumirem®	AMAG Pharm. Guerbet	poly-[N-(2-aminotethyl)-3-aminopropyl]siloxan	300	10	3,2	72	—	trávicí trakt
	<i>ferristene</i>	OMP	Abdoscan®	GE Health Care	sulfonovaný polystyren	3500	<50	—	—	—	trávicí trakt
SPIO	<i>ferumoxides</i>	AMI-25	Feridex® Endorem®	AMAG Pharm. Guerbet	dextran	80–150	4,8–5,6	23,9	98,3	0,47	RES buňky jater a sleziny
	<i>ferrixan (ferucarbotran)</i>	SHU 555A	Resovist® Cliavist®	Bayer Bayer	karboxydextran	62	4,2	25,4	151	0,47	RES buňky jater a sleziny, MRA
USPIO	<i>ferrumoxtran</i>	AMI-227	Sinerem® Combidex®	Guerbet AMAG Pharm.	dextran/citrát sodný	20–40	4–6	22	53	0,47	lymfatické uzliny, MRA
	<i>feruglose (PEG-feran)</i>	NC100150	Clariscan®	GE Health Care	PEG/polysacharid	20	5–7	20	35	0,35	MRA, perfuse
	<i>ferumoxytol</i>	Code 7228	—	AMAG Pharm.	—	30	—	15	89	1,5	MRA
	<i>ferucarbotran</i>	SHU 555C	Supravist®	Bayer	karboxydextran	<20	—	—	—	—	MRA
	—	VSOP-C184	—	Ferropharm	citrát	7	—	14	33,4	1,5	—

se

liší zejména v počtu magnetických jader v jedné nanočástici: částice SPIO zpravidla obsahují více magnetických jader, přičemž USPIO částice obsahují pouze jediné magnetické jádro. Vlastní SPIO částice je možné připravovat několika způsoby. Klasickým způsobem, jímž se připravují i komerční SPIO částice, je koprecipitace. SPIO částice je možné dále připravovat mikroemulsní metodou, termickým rozkladem vhodných prekurzorů nebo hydrotermální syntézou.<sup>[38]</sup> Dextran obalující magnetická jádra může být sesítovaný vhodným činidlem a výsledné částice jsou pak někdy nazývány jako CLIO (Cross-linked Iron Oxide). Výhodou nanočásticových CA jsou obecně vyšší hodnoty milimolárních relaxivit, než u nízkomolekulárních látek, a díky tomu lepší kontrastní vlastnosti. Je zřejmé, že osud a chování nanočásticových CA v organismu bude zcela odlišné od nízkomolekulárních  $T_1$  CA. Proto i klinické použití těchto dvou typů CA je většinou odlišné. Klinicky používané  $T_2$  CA založené na částicích SPIO a USPIO ukazuje **Tab. 2**.

Klinicky používané  $T_2$  CA jsou velmi dobře prozkoumanými materiály, jejichž fyzikální vlastnosti jsou velmi dobře popsány. Přesto jsou v odborné literatuře publikovány značně rozdílné hodnoty jejich relaxivit (**Tab. 3**). Relaxivity značně závisí na podmínkách měření, zejména na použitém magnetickém poli ( $B_0$ ), teplotě a médiu, v němž bylo měření prováděno. Data uváděná

**Tab. 3:** Tabulka relaxivit  $r_2$  běžných komerčních  $T_2$  CA při uváděných v literatuře. Dokonce ani při stejných podmínkách měření se hodnoty mezi jednotlivými autory neshodují. Relaxivity jsou uváděny v jednotkách [ $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$ ]. Každý řádek obsahuje hodnoty relaxivit od uvedeného autora pro uvedené podmínky při různých indukcích magnetického pole  $B_0$ .

	$B_0 = 0,47 \text{ T}$	$B_0 = 1,5 \text{ T}$	$B_0 = 3 \text{ T}$	$B_0 = 4,7 \text{ T}$	teplota [°C]	prostředí	citace
<i>ferumoxsides</i>	98,3	—	—	—	—	—	Wang 2001 <sup>[34]</sup>
	107	—	—	—	39,5	agar	Jung 1995 <sup>[39]</sup>
	156	—	174	235	—	želatina	Horák 2009 <sup>[40]</sup>
	126	—	—	—	37	želatina	Babič 2008 <sup>[41]</sup>
	—	120	—	—	37	voda	Corot 2006 <sup>[37]</sup>
	152	41	93	105	37	voda	Rohrer 2005 <sup>[42]</sup>
	—	33	45	25	37	plasma	Rohrer 2005 <sup>[42]</sup>
	—	66	—	—	37	krev	Rohrer 2005 <sup>[42]</sup>
<i>ferucarbotran</i>	151	—	—	—	—	—	Wang 2001 <sup>[34]</sup>
	217	—	207	265	—	želatina	Horák 2009 <sup>[40]</sup>
	—	189	—	—	37	voda	Corot 2006 <sup>[37]</sup>
	86	61	143	176	37	voda	Rohrer 2005 <sup>[42]</sup>
	101	95	160	118	37	plasma	Rohrer 2005 <sup>[42]</sup>
	—	77	—	—	37	krev	Rohrer 2005 <sup>[42]</sup>
<i>ferumoxtran</i>	53	—	—	—	—	—	Wang 2001 <sup>[34]</sup>
	—	100,4	127,8	—	—	Ficoll. rozt.	Simon 2006 <sup>[43]</sup>
	53,1	—	—	—	39,5	agar	Jung 1995 <sup>[39]</sup>
	—	65	—	—	37	voda	Corot 2006 <sup>[37]</sup>
	129	—	114	177	—	želatina	Horák 2009 <sup>[40]</sup>

v literatuře jsou však získána za různých podmínek a tyto podmínky často nebývají ani přesně uvedeny. Jsou ale publikovány i rozdílné hodnoty pro stejné podmínky. Vzhledem k těmto faktům je třeba přistupovat k publikovaným hodnotám relaxivity s rezervou, zejména jedná-li se o nově připravené materiály, které ani nemohou být tak dobře charakterizovány jako ty, které se již klinicky používají.

Nové nanočásticové CA jsou připravovány obalováním částic oxidů železa mnohem širší paletou látek; jak nízkomolekulárních, tak i makromolekulárních. Jako příklad lze uvést práce Babiče, Horáka *et al.* zabývající se přípravou CA na bázi nanočástic oxidů železa pokrytých polylysinem,<sup>[41]</sup> poly(*N,N*-dimethylakrylamidem)<sup>[44]</sup> či *D*-mannosou.<sup>[45]</sup> Z mnoha dalších publikovaných materiálů lze pro ilustraci jmenovat například částice pokryté *meso*-2,3-dimerkaptojantarovou kyselinou (DMSA),<sup>[46]</sup> polyethylenoxidovými kopolymery,<sup>[47]</sup> alginátem,<sup>[48]</sup> tzv. „gumovou kyselínou“ připravenou z arabské gumy,<sup>[49]</sup> albuminem,<sup>[50]</sup> SiO<sub>2</sub><sup>[51]</sup> či PEG-derivatizovaným SiO<sub>2</sub>,<sup>[52,53]</sup> nebo zlatem.<sup>[54,55]</sup>

Ačkoliv při studiu nových nanočásticových  $T_2$  CA naprosto dominují materiály založené na oxidech železa, v omezené míře jsou studovány i nanočástice s jinými magnetickými jádry. Jako příklady magnetických jader lze uvést částice oxidických materiálů (ferity) nebo metalických fází (Fe, FeCo, FePt, apod.). Příslušná magnetická jádra jsou opět samozřejmě pokryta vhodným materiálem zajišťujícím dobrou koloidní stabilitu a biokompatibilitu (Tab. 4).

Tab. 4: Vybrané materiály zkoumané jako potenciální nanočásticové CA s magnetickým jádrem z jiného materiálu než oxidů železa a jejich vlastnosti.

jádro	obal	velikost jádra [nm]	celkový průměr [nm]	relaxivita [mmol <sup>-1</sup> ·l·s <sup>-1</sup> ]		B <sub>0</sub> [T]	citace
				r <sub>1</sub>	r <sub>2</sub>		
duté Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	PEG–fosfolipid	20	—	1,42	7,74	—	Shin 2009 <sup>[56]</sup>
NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	PEG–dopamin	10–15	—	7,19	9,96	2,4	Shultz 2007 <sup>[57]</sup>
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	kopolymer PEG/polyamid	8,5	80	—	270	1,5	Lu 2009 <sup>[58]</sup>
Fe <sub>1-x</sub> (Co,Mn) <sub>x</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> x = 0–1	kyselina laurová	9–11	80	—	—	—	Giri 2008 <sup>[59]</sup>
Mn <sub>0,6</sub> Zn <sub>0,4</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	DMSA	15	—	—	860	4,7	Jang 2009 <sup>[60]</sup>
FePt	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> OH	9	—	7,4	239	4,7	Maenosono 2008 <sup>[61]</sup>
FePt	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10	—	—	62	7	Gao 2008 <sup>[62]</sup>
FeCo	Au	20	—	—	—	—	Xu 2007 <sup>[63]</sup>
Fe	Au	18	—	6,87	28,15	7	Cho 2006 <sup>[54]</sup>

### 1.3 Nanočástice s možností detekce MR/fluorescence

Syntéza duálních MR/fluorescenčních aktivních nanočástic (tzv. *dual probes*) ve formě skutečně použitelné v biologických systémech je velmi komplexní záležitostí. Znamé magnetické MR aktivní nanočástice zpravidla neposkytují fluorescenci a proto je nutné vytvořit komplexní nanočástice obsahující MR aktivní součást spojenou s fluorescenční značkou. Většina takových materiálů je tvořena magnetickým jádrem a fluorescenčně označeným obalem. Při návrhu duální MR/fluorescenční kontrastní látky je tedy třeba zvolit:

- magnetické MR aktivní jádro – většinou se jedná SPIO částice (viz kap. 2.2.1)
- fluorescenční značku a případný spacer pro její zakotvení
- materiál pro obalení (viz kap. 2.2.1)
- případné biologicky aktivní látky pro povrchovou derivatizaci komplexní nanočástice. Tyto látky pak umožňují specifické cílení dané nanočástice v organismu (např. monoklonální protilátky, HIV tat peptid, atd.).

Syntéza takových komplexních materiálů se skládá z několika stupňů. Prvním stupněm je příprava vlastních magnetických nanočástic. Použité syntetické metody závisí na konkrétním materiálu. Nejčastěji se však jedná o různé variace metody *sol-gel*, případně různých srážecích reakcí. Moderní postupy zahrnují také například využití micel při precipitacích, termický rozklad vhodných prekurzorů nebo hydrotermální syntézu.<sup>[38]</sup> Při některých syntézách může následovat chemická modifikace vytvořených částic. Příkladem je často využívaná oxidace magnetitových nanočástic na částice maghemitové. V případě tepelného zpracování je nutno na konci syntézy přistoupit ještě k mechanickému zpracování produktu, které zahrnuje např. mletí či válcování.

Dalším krokem je obalení magnetických nanočástic. To je prováděno nejrůznějšími technikami, často se však jedná o pouhou sorpci příslušné látky na magnetické nanočástice. Při obalování polymerními materiály je hojně využívána *in situ* polymerace přímo ve stabilizovaných suspenzích magnetických nanočástic. Jak již bylo zmíněno dříve, obalování je prováděno s ohledem na zvýšení biokompatibility a koloidní stability. Při návrhu obalu je též nutno přihlížet k faktu, že obal nanočástice je také většinou využit k zakotvení fluorescenční značky a proto musí tuto operaci umožňovat.

Při výběru vhodné fluorescenční značky je třeba zejména vzít v úvahu optické vlastnosti magnetického jádra a samotné fluorescenční značky tak, aby se excitace ani emise značky v rámci možností co nejméně překrývaly s absorpčními maximy magnetického jádra. Dále je nutno uvážit možnosti fluorescenčního mikroskopu, jenž bude použit k pozorování výsledných částic. Mnohé, zejména starší a jednodušší fluorescenční mikroskopy, mají málo excitačních a emisních filtrů, což umožňuje vizualizaci pouze omezeného spektra fluorescenčních značek. V neposlední řadě

je nutno uvážit i cenu fluorescenční značky, neboť zejména reaktivní deriváty moderních fluorescenčních barviv používaných v biologii jsou značně nákladné (řádově  $10^3$  Kč/mg)<sup>[64]</sup> a přitom jejich spotřeba při syntéze (na rozdíl od běžného použití v biologických vědách) může být poměrně značná.

Nejčastěji používanými značkami jsou tradiční organická fluorescenční barviva fluorescein, eosin, rhodamin, apod., dále kvantové tečky a někdy i komplexy přechodných kovů či lanthanoidů, zejména Eu a Tb. Moderními možnostmi jsou využití nanočástic zlata vykazujících jev povrchové plasmonové resonance nebo jednovrstevných uhlíkových nanotub (Single Wall Nanotube, SWNT) s fluorescencí v blízké infračervené (Near Infrared, NIR) oblasti. Vlastní nízkomolekulární fluorescenční barviva jsou při syntéze komplexních částic používána ve formě aktivních derivátů, které reagují s dostupnými funkčními skupinami obalů magnetických jader, případně jejich prekurzorů. Standardně se využívá např. reakcí isothiokyanátů či *N*-hydroxysukcinimidových esterů (NHS) s aminoskupinami nebo jodacetylových či maleimidových derivátů s thiolovými skupinami.<sup>[64,65]</sup>

## 1.4 Strategie přípravy duálních MR/fluorescenčních nanočástic

V následujících odstavcích jsou popsány vybrané strategie přípravy vedoucí k biologicky použitelným materiálům daných vlastností. Byly vybrány převážně takové příklady z literatury, které byly skutečně *in vivo* či *in vitro* vyzkoušeny v biologických systémech.<sup>[66]</sup> Širší přehled magnetických-fluorescenčních nanokompozitů potenciálně vhodných pro biomedicínské aplikace podává v přehledném článku Corr *et al.*<sup>[67]</sup> Následující odstavce jsou přehledně shrnuty v Tab. 5.

### 1.4.1 Fluorescenční barvivo navázané na molekuly nízkomolekulárního obalu

Nejjednodušším přístupem k přípravě fluorescenčních magnetických nanočástic je solubilizace magnetických nanočástic nízkomolekulární látkou. Pokud je tato látka stabilizována látkou derivatizovanou fluorescenčním barvivem, je možno připravit částice s přímou vazbou fluorescenční značky na magnetické jádro. Bertorelle *et al.*<sup>[46]</sup> připravil částice  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> stabilizované pomocí *meso*-2,3-dimerkaptojantarové kyseliny (DMSA). Reakcí DMSA s aktivními deriváty fluorescenčních barviv byly částice pevně spojeny s fluorescenční značkou. Fluorescein-5-maleimid byl přímo adován na thiolovou skupinu DMSA, rhodamin byl navázán pomocí bifunkčního spaceru.



Tab. 5: Vybrané, biologicky otestované, duální MR/fluorescenční fluorescenční nanočásticové  $T_2$  CA.

jádro	obal	fluorescenční značka	$\lambda_{em}$ [nm]	biologické testy	biol. aktivní součást	velikost jádra [nm]	celkový průměr [nm]	$r_2$ [ $\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$B_0$ [T]	citace
$\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_3$	DMSA	rhodamin/ fluorescein	578/516	<i>in vitro</i>	—	—	30	—	—	Bertorelle 2006 <sup>[46]</sup>
CLIO	dextran	Cy5.5	695	<i>in vivo</i>	—	—	68	91,2	9,4	Josephson 2002 <sup>[68]</sup>
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	chitosan	FITC	520	<i>in vitro</i>	—	—	13,8	—	—	Ge 2009 <sup>[69]</sup>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	poly(styren-co-akrylová kyselina)	PMI	—	<i>in vitro</i>	—	10–12	45–70	—	—	Holzappel 2006 <sup>[70]</sup>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	SiPEG	Cy5.5	695	<i>in vitro</i>	chlorotoxin	10,5	—	—	—	Veiseh 2005 <sup>[71]</sup>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$\text{SiO}_2$	FITC	518	<i>in vitro</i>	—	—	~150	153	4,7	Lin 2006 <sup>[81]</sup>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$\text{SiO}_2$	FITC	—	<i>in vitro</i>	—	~10	50	128	1,5	Lu 2007 <sup>[72]</sup>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$\text{SiO}_2$	rhodamin	580	<i>in vitro</i>	$\text{Ab}_{\text{Hmab}1}$	~10	50	397	9,4	Lee 2006 <sup>[73]</sup>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$\text{SiO}_2/\text{PEG}$	RITC	577	<i>in vitro</i>	—	15	97	245	—	Kim 2008 <sup>[52]</sup>
$\text{CoFe}_2\text{O}_4$	$\text{SiO}_2/\text{PEG}$	FITC/RITC	—	<i>in vitro</i>	$\text{Ab}_{\text{CD}_310}$	—	—	—	—	Yoon 2006 <sup>[53]</sup>
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	$\text{SiO}_2/\text{PEG}$	CdSe	550–600	<i>in vitro</i>	—	12–14	—	—	—	Selvan 2007 <sup>[75]</sup>
CLIO	aminovaný dextran	Vivotag-680	680	<i>in vivo</i>	—	—	—	—	—	Nahrendorf 2008 <sup>[76]</sup>
SPIO	sesíťovaný kopolymer PEG / akrylát	Cy5.5	695	<i>in vivo</i>	—	—	32	—	—	Lee 2007 <sup>[77]</sup>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$\text{SiO}_2$	BTBCT-Eu <sup>3+</sup>	334, 611	<i>in vitro</i>	transferrin	10	55	—	—	Wu 2007 <sup>[78]</sup>
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	oligonukleotid $d(\text{GT})_{15}$	SWNT	950–1300	<i>in vitro</i>	—	3	12–20	—	—	Choi 2007 <sup>[79]</sup>
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Au-PEG	Au	plasmonová resonance	<i>in vitro</i>	<i>anti</i> -EGFR	—	45	23,5	4,7	Larson 2007 <sup>[55]</sup>
FePt	Au-PEG	Au	plasmonová resonance	<i>in vitro</i>	$\text{Ab}_{\text{Hmab}1}$	6	—	58,7	9,4	Choi 2006 <sup>[80]</sup>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$\text{SiO}_2$ -PNIPAM	CdTe	547, 600, 660	<i>in vitro</i>	—	—	158	—	—	Guo 2006 <sup>[81]</sup>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	Au-PEG	Au	590–650	<i>in vitro</i>	<i>anti</i> -EGFR	20	—	105	3	Xu, 2008 <sup>[74]</sup>

Inkubací s nádorovými buňkami byla potvrzena dobrá internalizace nanočástic a možnost jejich pozorování fluorescenčním mikroskopem.

#### 1.4.2 Fluorescenční barvivo navázané na organický polymerní obal

Částice SPIO obalené dextranem jsou používány již od konce 80. let minulého století. Vzhledem k jejich komerčnímu využití jsou velmi důkladně prozkoumány. Je tedy zřejmé, že derivatizace takových materiálů fluorescenční značkou je již dobře prozkoumána. Josephson *et al.*<sup>[68]</sup> připravil CLIO částice označené indokyaninovým barvivem Cy5.5 vykazujícím fluorescenci v NIR oblasti. Sesíťovaný dextran obalující nanočástice oxidu železitého byl nejprve derivatizován oligopeptidem, na který bylo dále navázáno fluorescenční barvivo Cy5.5. Částice byly pokusně využity k *in vivo* zobrazování lymfatických uzlin v myši pomocí MRI i NIR fluorescenčního zobrazování. Výhodou je, že v této oblasti elektromagnetického spektra je absorpce biomolekul ve tkáních malá a světlo tak proniká až několik cm do tkáně (tzv. biologické okno).

Nahrendorf *et al.*<sup>[76]</sup> využil obdobného designu pro přípravu trimodální MRI/PET/fluorescenční kontrastní látky. CLIO částice s aminovaným dextranem byly označeny komerčním NIR fluorescenčním barvivem Vivotag-680® a PET aktivním komplexem <sup>64</sup>Cu-DTPA. Tato trimodální CA byla následně úspěšně využita pro *in vivo* zobrazování makrofágů při zánětlivé ateroskleróze u myši. Ostatní buňky v zobrazované oblasti internalizovaly připravené částice mnohem méně a připravené částice tak vykazovaly jistou specifitu pro zobrazování nemocné tkáně.

Ge *et al.*<sup>[69]</sup> připravil materiál, ve kterém je fluorescenční barvivo kovalentně vázáno na biopolymer obalující vlastní magnetické jádro. Reakcí fluoresceinisothiokyanátu (FITC) s aminoskupinami chitosanu byl získán fluorescenčně označený polymer, jímž byly následně obaleny nanočástice maghemitu. Inkubace produktu též ukázala internalizaci CA do buněk a možnost detekce buněk pomocí MRI.

Zatímco předchozí dva případy zmiňovaly obalování magnetických nanočástic již kompletními polymery, Holzapfel *et al.*<sup>[70]</sup> uvádí přípravu obalených magnetitových částic *in situ* polymerací poly(styren-co-akrylové kyseliny). Fluorescenční barvivo *N*-(2,6-di-isopropylfenyl)-perylene-3,4-dikarboximid (PMI) bylo k polymeru přidáno během kopolymerace styrenu a akrylové kyseliny prováděné v mikroemulsi. Molekuly barviva jsou v polymerních částicích mechanicky uzavřeny, případně vázány nekovalentními interakcemi. U výsledných nanočástic byla prokázána jejich internalizace do lidských nádorových a kmenových buněk a možnost detekce internalizovaných částic fluorescenčním mikroskopem.

Na rozdíl od výše uvedených prací využil Veiseh *et al.*<sup>[71]</sup> řetězce polymeru kovalentně vázá-

né na magnetické jádro. Magnetitové nanočástice byly reakcí s triethoxysilanovým derivátem bifunkčního PEGu kovalentně spojeny s polymerem. Volné konce PEGu byly následně derivatizovány fluorescenčním barvivem Cy5.5 a peptidem chlorotoxinem pro specifické vázání vzniklých nanočástic na buňky nádorů neuroektodermálního původu. Na *in vitro* experimentech autoři prokázali pomocí fluorescenční mikroskopie specifickou vazbu popisovaných nanočástic na gliomové buňky a ověřili možnost zobrazování pomocí MRI.

Velmi podobný přístup použil i Lee *et al.*<sup>[77]</sup> K obalení SPIO částic byl použit kopolymer nesoucí na methakrylátové kostře ještě nehydrolyzované trimethoxysilanové skupiny, řetězce PEGu a NHS-aktivované karboxylové kyseliny. Řetězce PEGu opět zajišťovaly dobrou biokompatibilitu, karboxylové skupiny posloužily k navázání NIR fluorescenčního barviva Cy5.5. Trimethoxysilanové skupiny umožnily stejně jako v předchozím případě připojení polymerních řetězců k oxidickému jádru. Nezareagované silanové skupiny byly pak termicky sesíťovány při 80 °C. Výsledkem byly SPIO částice pevně obalené kopolymerem methakrylát/PEG sesíťovaným křemičitými můstky. Částice byly úspěšně použity k *in vivo* zobrazení nádoru v myši.

### 1.4.3 Fluorescenční barvivo kovalentně navázané do vrstvy SiO<sub>2</sub>

Klasickým designem jsou magnetické nanočástice enkapsulované do fluorescenčním barvivem označeného amorfního hydratovaného oxidu křemičitého SiO<sub>x</sub>(OH)<sub>y</sub> (v dalším textu označen jako SiO<sub>2</sub>).\* Jedná se o pravděpodobně nejvyužívanější strategii přípravy biokompatibilních komplexních MR/fluorescenčně aktivních nanočástic. Vrstva SiO<sub>2</sub> je připravována hydrolyzou tetraethoxysilanu (TEOS) a následnou polykondenzací hydrolytických produktů. Pro kovalentní navázání fluorescenčního barviva do této vrstvy je standardně používána konjugace aktivního derivátu fluorescenčního barviva s 3-aminopropyltriethoxysilanem (APS), případně 3-aminopropyltrimethoxysilanem, a tvorba křemičité slupky ze směsi takto připraveného konjugátu a TEOS. Příkladem této strategie je práce Lin *et al.*,<sup>[51]</sup> jenž enkapsuloval částice Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> do fluorescenčně označeného SiO<sub>2</sub> kondenzovaného ze směsi TEOS a malého množství konjugátu FITC s 3-aminopropyltriethoxysilanem mikroemulzní metodou. U produktu byla naměřena relaxivita  $r_2 = 154 \text{ mmol} \cdot \text{s}^{-1}$  typická pro SPIO částice a zároveň byla *in vitro* potvrzena internalizace výsledných částic do buněk (fibroblastů).

Materiál téměř stejného designu, ale podstatně lepší morfologie připravil analogickým způsobem i Lu *et al.*<sup>[72]</sup> Výsledkem byly komplexní sférické nanočástice o průměru asi 50 nm obsahující vždy jedno jádro z Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> o průměru 10 nm. Práce ukazuje efektivní označení kmenových buněk komplexními nanočásticemi a dále úspěšný *in vivo* pokus s transplantací označených buněk do

\* anglosaská literatura využívá termínu „silica“

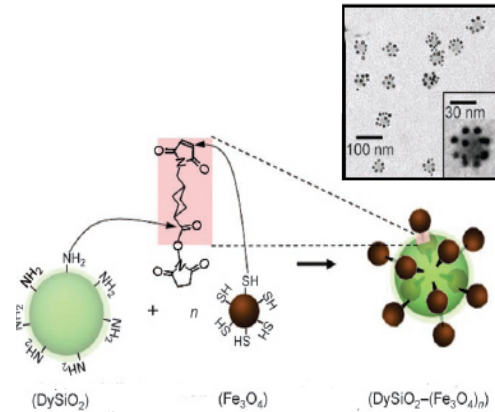
myši a jejich následnou detekcí pomocí MRI.

Značení magnetitových nanočástic obalených  $\text{SiO}_2$  pomocí fluorescenčních činidel založených na lanthanoidech ukazuje Wu *et al.*<sup>[78]</sup> Jako fluorescenční značka byl použit konjugát europitého komplexu BTBCT– $\text{Eu}^{3+}$  s APS. Výslednými nanočásticemi byly pak úspěšně označeny nádorové buňky.

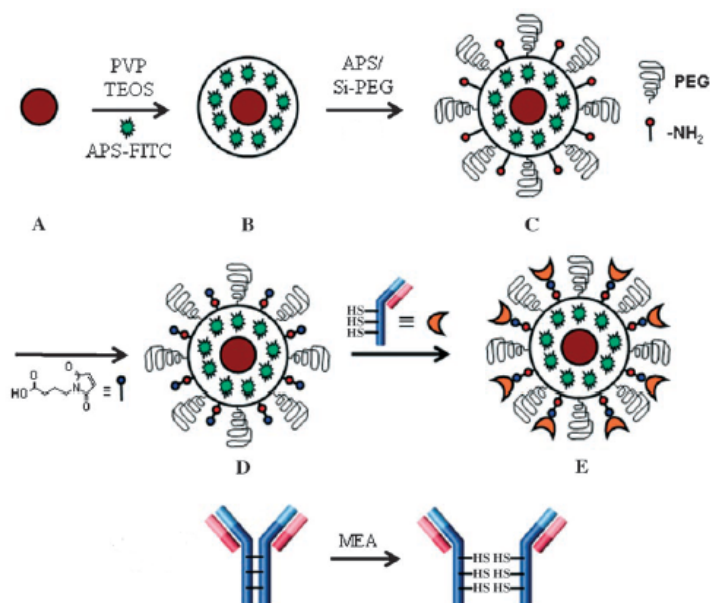
Netradiční přístup spočívající v použití fluorescenčním barvivem označeného  $\text{SiO}_2$  zvolil Lee *et al.*<sup>[73]</sup> Na rhodaminem označené nanočástice  $\text{SiO}_2$  s povrchovými  $-\text{NH}_2$  skupinami byla pomocí bifunkčního organického spaceru navázána satelitní magnetitová jádra s povrchovými  $-\text{SH}$  skupinami. Výsledné nanočástice tedy obsahovaly několik magnetických částic usazených na povrchu větší centrální fluorescenční částice z amorfního  $\text{SiO}_2$  (viz Obr. 5). Povrchová modifikace protilátkou  $\text{Ab}_{\text{HmenB1}}$  umožnila specifické cílení částic na buňky obsahující polysialové kyseliny (PSA). Inkubace označeného produktu s nádorovými buňkami vykazujícími zvýšenou tvorbu PSA a s kontrolními embryonálními ledvinovými buňkami bez exprese PSA ukázala, že produkt selektivně značí buňky se zvýšenou expresí PSA a je tedy možné ho využít pro detekci některých nádorových buněk.

Kim *et al.*<sup>[52]</sup> připravil jádra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  enkapsulovaná do  $\text{SiO}_2$  mikroemulsní metodou. Zakotvení fluorescenční značky bylo provedeno použitím konjugátu rhodaminisothiokyanátu s APS (RITC–APS) při kondenzaci křemičité vrstvy. Na povrch fluorescenčních nanočástic byly pro zlepšení biokompatibility zakotveny řetězce PEGu. *In vitro* značení nádorových buněk prokázalo internalizaci kontrastní látky do buněk. *In vivo* pokusy na myších následně prokázaly možnost sledovat osud označených buněk v organismu pomocí MRI.

Yoon *et al.*<sup>[53]</sup> enkapsuloval do  $\text{SiO}_2$  magnetické jádro feritu  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . Vrstva  $\text{SiO}_2$  byla stejně jako v předchozích případech označena FITC nebo RITC. Povrch  $\text{SiO}_2$  byl derivatizován směsí APS a triethoxysilanového derivátu PEGu. Výsledkem byly nanočástice obalené kovalentně navázaným PEGem mající povrchové aminoskupiny, jež byly využity k připojení monoklonální protilátky (Obr. 6). Protilátka  $\text{Ab}_{\text{CD-10}}$  umožnila specifickou vazbu nanočástic na leukemické buňky. Toho bylo využito pro magnetickou separaci označených buněk a jejich zobrazení zobrazení pomocí MRI.



Obr. 5: Schéma přípravy komplexních nanočástic rhodaminem dopovaného  $\text{SiO}_2$  (označeno jako  $\text{DySiO}_2$ ) s povrchově navázanými hydrofilizovanými satelitními částicemi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Vpravo nahoře pak snímek částic z TEM. Převzato z literatury.<sup>[73]</sup>



Obr. 6: Schéma přípravy komplexních nanočástic kobaltnatého feritu enkapsulovaného do fluorescenčně označeného  $\text{SiO}_2$ . Jádra  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (A) jsou pomocí TEOS a APS–FITC enkapsulována do fluorescenčně značeného  $\text{SiO}_2$  PVP metodou. Reakcí vzniklých nanočástic se silanovým derivátem PEG a APS vznikají komplexní částice s organickou korunou a povrchovými  $-\text{NH}_2$  skupinami (C). Reakcí těchto skupin s vhodným činidlem je možno získat aktivní nanočástice s povrchovými maleimidovými skupinami (D). Ty umožňující navázání monoklonální protilátky na částice (E) pomocí reakce s thiolovými skupinami protilátky, které vzniknou reduktivním stěpením disulfidových můstků v těžkém řetězci protilátky pomocí merkaptoethylaminu (MEA). Uvedený postup je v podstatě obecným schématem přípravy komplexních specificky cílených magnetických / fluorescenčních nanočástic. Převzato z literatury.<sup>[53]</sup>

#### 1.4.4 Kvantové tečky ve vrstvě amorfního $\text{SiO}_2$

Nanočástice polovodičů, tzv. *kvantové tečky* (QD), jsou velmi efektivními fluorescenčními značkami, které na rozdíl od organických fluorescenčních barev nepodléhají tak snadno fotodegradaci. Dnes se již běžně používají v biologických vědách pro fluorescenční značení. Jejich inkorporací do vrstvy  $\text{SiO}_2$  obalující magnetické jádro lze stejně jako inkorporací molekul fluorescenčního barviva připravit částice vhodné současně pro MRI i fluorescenční mikroskopii.

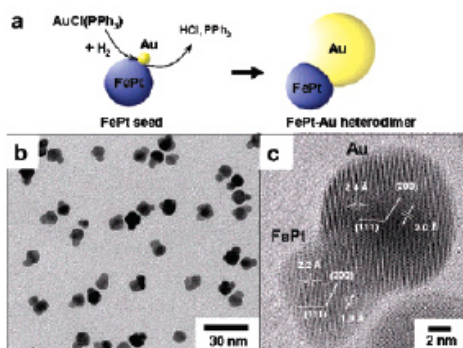
Selvan *et al.*<sup>[75]</sup> popisuje magnetický fluorescenční kompozit  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CdSe}$ . Jednotlivé částice  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  o rozměru 8–10 nm sloužily jako krystalizační jádra. Na povrchu každé z nich byla vypěstována částice CdSe o rozměru 4–5 nm. Vzniklé kompozitní nanočástice (uváděné jako magnetické QD) byly pokryty tenkou vrstvou  $\text{SiO}_2$  s povrchovými aminoskupinami, které byly posléze derivatizované NHS–skupiny bifunkčního PEGu. Na vnější konce PEGu byly navázány hydrofobní olejové skupiny umožňující značení buněčných membrán. Biokompatibilita přípra-

vených nanočástic a jejich schopnost vizualizovat buněčné membrány byla úspěšně otestována na několika typech nádorových buněk.

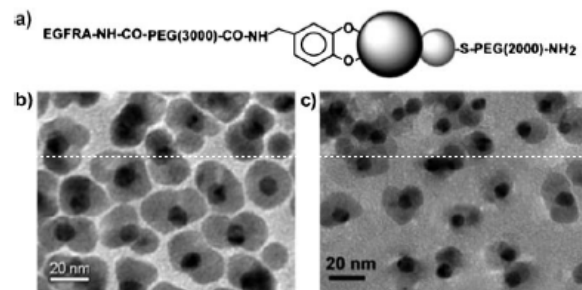
Sofistikovanější materiál připravil Guo *et al.*<sup>[81]</sup> Autoři nejprve pokryli magnetitové částice tenkou vrstvou SiO<sub>2</sub>. Přidáním Cd<sup>2+</sup> do směsné suspenze vyrobených magnetických částic a QD (CdTe) s povrchovými –SH skupinami byly na křemičitém povrchu zachyceny QD. Získané kompozitní částice Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-CdTe byly následně pokryty další vrstvou SiO<sub>2</sub>. Na závěr byly částice ještě pokryty vrstvou termosenzitivního polymeru poly(*N*-isopropylakrylamidu) (PNIPAM). Výsledné částice tedy obsahovaly magnetické jádro, které obalovala vrstva SiO<sub>2</sub> obsahující QD, celé ještě dále obalené vrstvou PNIPAM. Částicemi byly pokusně označeny buňky, které pak byly velmi dobře pozorovatelné konfokální mikroskopií.

### 1.4.5 Heterodimerní částice – srostlice magnetických částic s Au nanočásticemi

Pro optické zobrazování je rovněž možno použít nanočástic zlata vykazujících jev povrchové plasmonové rezonance.<sup>[82]</sup> Choi *et al.*<sup>[80]</sup> připravil heterodimerní nanočástice FePt–Au. Nanokrystaly Au byly vypěstovány na částicích FePt použitých jako krystalizační jádra (Obr. 7). Výsledné heterodimerní částice byly solubilizovány navázáním PEGu s thiolovými skupinami. Konjugací na koncové aminoskupiny molekul PEGu byly následně navázány molekuly protilátky Ab<sub>HmenB1</sub>, jež specificky rozpoznává PSA. Inkubace označeného produktu s nádorovými buňkami vykazujícími zvýšenou tvorbu polysialové kyseliny (PSA) a s kontrolními embryonálními ledvinovými buňkami bez exprese PSA ukázala, že produkt selektivně značí buňky se zvýšenou expresí PSA. Biologické testy daných částic jsou analogické se zkouškami jež provedl Lee *et al.* na magnetitových nanočásticích.<sup>[63]</sup>



Obr. 7: Schéma přípravy heterodimerních částic FePt–Au (a) a morfologie takto připravených částic na snímcích z TEM (b) a HRTEM (c). Převzato z literatury.<sup>[80]</sup>



Obr. 8: Schéma heterodimerních částic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–Au (a) a morfologie (TEM snímky) připravených částic před (b) a po (c) povrchové modifikaci řetězci PEG. Převzato z literatury.<sup>[74]</sup>

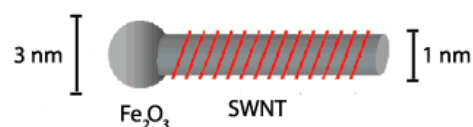
Xu *et al.*<sup>[74]</sup> připravil  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Au nanočástice, ve kterých je Au částice víceméně obklopena magnetitem (**Obr. 8**). Částice byly připraveny rozkladem  $\text{Fe}(\text{CO})_5$  na povrchu zlatých nanočástic. Nanokompozitní částice byly pak stabilizovány pomocí dopaminem derivatizovaného PEGu. Za účelem biologického cílení na receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) na povrchu nádorových buněk byl zlatý povrch modifikován protilátkou *anti*-EGFR připojenou na konec řetězce PEG. Modifikované částice pak byly inkubovány s nádorovými buňkami. Konfokální mikroskopie pak potvrdila navázání částic na povrch buněk. Následně byla úspěšně vyzkoušena možnost magnetické separace buněk a jejich zobrazení pomocí MRI.

#### 1.4.6 Magnetické nanočástice obalené vrstvou Au

Povrchovou plasmonovou resonanci poskytují nejen nanočástice Au, nýbrž i nanoskopické vrstvy Au. Po obalení příslušných částic vrstvou Au je tedy možné dané částice také využít k optickému zobrazování. Larson *et al.*<sup>[55]</sup> připravil maghemitové nanočástice obalené tenkou vrstvou Au. Velikost kompozitních nanočástic byla  $45 \pm 14$  nm. Zlatý povrch modifikován pomocí PEG-thiolu. Povrch byl pak ještě modifikován protilátkou *anti*-EGFR připojenou pomocí PEGového linkeru. Hybridní nanočástice byly použity k označení nádorových buněk. Buňky pak byly úspěšně zobrazeny pomocí MRI a konfokální mikroskopie. Plasmonová resonance Au-nanovrstvy rovněž teoreticky umožňuje využití podobných částic pro fototermální terapii. Narušení označených buněk při ozařování 700 nm laserem bylo také prokázáno.

#### 1.4.7 Uhlíkové nanotuby navázané na magnetické částice

Jednovrstevné uhlíkové nanotuby (SWNT) vykazují mimo jiných zajímavých vlastností i NIR fluorescenci ležící v tzv. biologickém okně (700–1300 nm). Fluorescence nastává jen tehdy, když jsou nanotuby individuálně rozptýleny. Choi *et al.*<sup>[79]</sup> připravil nanočástice  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  s navázanými SWNT (**Obr. 9**). Na kulovou částici  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  je navázána nanotuba o průměru 1 nm. Ta je pro dobrou solubilizaci obalena molekulami oligonukleotidu  $d(\text{GT})_{15}$ . Celý podlouhlý útvar má délku 12–20 nm. Vyrobené nanočástice byly úspěšně použity k NIR a MR zobrazení makrofágů.



Obr. 9: Schéma heterodimerních částic  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -SWNT, červené linky představují obalení uhlíkové nanotuby oligonukleotidem. Převzato z literatury.<sup>[79]</sup>

## 2 Motivace a cíl práce

Cílem této diplomové práce je připravit fluorescenční magnetické nanočástice použitelné pro buněčné značení, tzv. *cellular labelling*. Tyto duální MR/fluorescenční značky umožňují sledovat označené buňky v organismu pomocí magnetické rezonance a zároveň kontrolovat přítomnost kontrastní látky v buňce pomocí fluorescenční mikroskopie.

Příprava polyfunkčních nanočástic s možností dvojí detekce (MR/fluorescence) je velmi moderní záležitostí (viz kap. 1.3). Výsledné materiály jsou velmi atraktivní z hlediska dalšího použití v biomedicinském výzkumu. I přesto není stále ještě příprava biologicky použitelných fluorescenčních magnetických nanočástic zdaleka triviální záležitostí. Duálních kontrastních látek, jež obsahují magnetické jádro z jiného materiálu než různě modifikovaných SPIO částic, je v literatuře popisováno jen velmi omezené množství.

Tato práce je založena na již vyvinutých perovskitových nanočásticích  $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$  (LSMO) enkapsulovaných do křemičitého obalu (viz kap. 3.2). Bezprostředně navazuje na disertační práci O. Kamana, jež se zabýval právě přípravou enkapsulovaných perovskitových nanočástic pro biomedicinské aplikace, zejména pro magnetickou fluidní hypertermii a MRI. Pro pozorování interakcí takových nanočástic s buňkami na buněčné a subcelulární úrovni je vhodné mít částice pozorovatelné též fluorescenčním mikroskopem.

Konkrétním cílem této práce je tedy příprava fluorescenčně označených nanočástic LSMO pro buněčné značení a ověření jejich použitelnosti v biologických systémech. Výsledné nanočástice by tedy měly být dobře pozorovatelné pod fluorescenčním mikroskopem a zároveň by neměly být (příliš) toxické pro buňky. Protože živé buňky bezpodmínečně nutně potřebují k životu vodné prostředí, je nezbytné, aby připravené částice měly dostatečnou koloidní stabilitu ve vodě. Vlastnosti konečného produktu by tedy měly být:

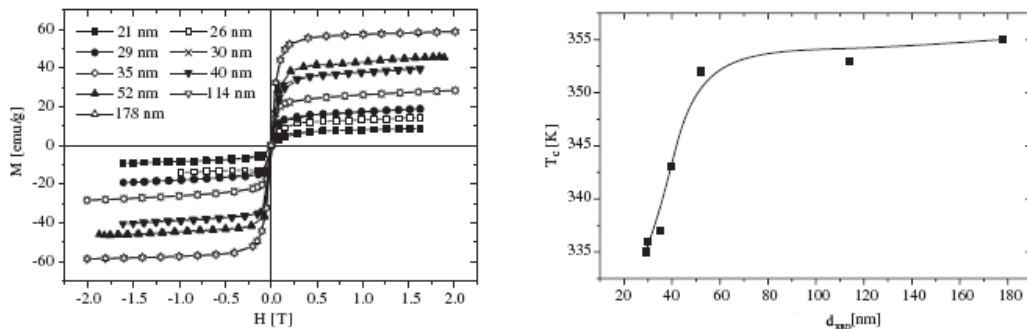
- zachování magnetických vlastností jádra
- dostatečná fluorescence (ve vhodné oblasti spektra) pro pozorování fluorescenčním mikroskopem
- dostatečná koloidní stabilita ve vodě v přibližně neutrálním pH
- nízká toxicita pro buňky



### 3 Popis výchozích materiálů

#### 3.1 $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$

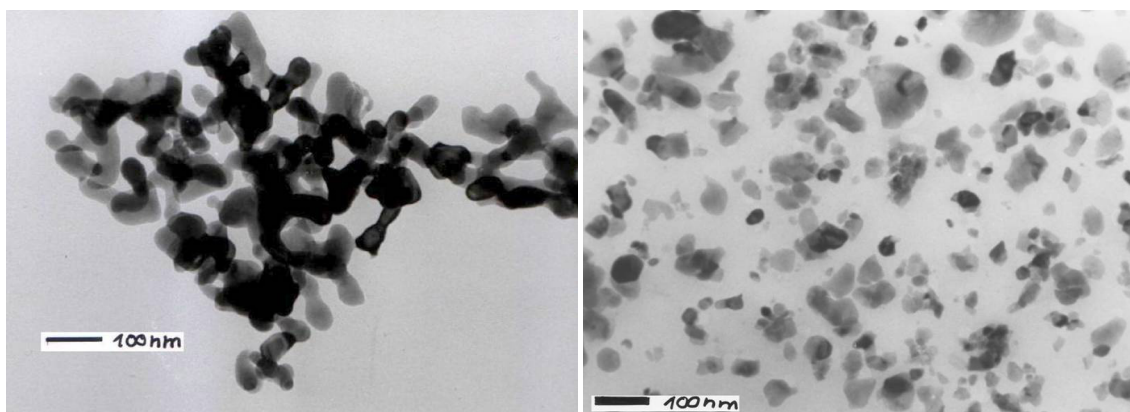
V minulých letech byly v rámci studia materiálů pro potenciální použití v magnetické fluidní hypertermii (MFH) a zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) připraveny skupinou E. Pollerta na Fyzikálním ústavu AV ČR (FZÚ AV ČR) nanočástice LSMO s  $x=0,25$  ( $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$ ). Objemový polykrystalický LSMO tohoto složení vykazuje Curieovu teplotu  $T_C=350$  K a magnetizaci  $M_{1000 \text{ kA/m}}=66 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$  při 298 K. S poklesem velikosti částic klesá  $T_C$  a magnetizace materiálu (Obr. 10). Toto chování lze vysvětlit přítomností neuspořádané, tzv. „magneticky mrtvé“ vrstvy na povrchu nanočástic LSMO. Tloušťka mrtvé vrstvy byla při zjednodušeném uvažování kulových částic odhadnuta na 5 nm.<sup>[17,18]</sup>



Obr. 10: Grafy znázorňující pokles magnetizace  $M$  (vlevo) a Curieovy teploty  $T_C$  v závislosti na střední velikosti krystalitu  $d_{\text{XRD}}$  LSMO. Převzato z literatury.<sup>[18]</sup>

Pokles magnetizace s klesající velikostí částic popisuje pro LSMO s  $x=0,3$  také Duan *et al.*<sup>[83]</sup> Metodou sol-gel připravil částice LSMO o velikostech 16, 24, 35 a 47 nm, na kterých daný jev popisuje.

LSMO ( $x=0,25$ ) se standardně připravuje klasickou sol-gel citrátovou metodou. Směs příslušných množství výchozích látek ( $\text{La}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SrCO}_3$  a  $\text{MnCO}_3$ ) je rozpuštěna v  $\text{HNO}_3$ . Po přidání kyseliny citronové a ethylenglykolu je přidávkem  $\text{NH}_4\text{OH}$  upraveno pH reakční směsi na  $\sim 7,6$ . Směs je tepelně zpracována (odpaření rozpouštědla, sušení, kalcinace a žhání) a následuje mechanické zpracování (válcování a mletí). Mechanickým zpracováním jsou od sebe oddělena jednotlivá zrna, která jsou v surovém produktu pospojována můstky vznikajícími tendencí produktu ke slinování během konečného tepelného zpracování při teplotách nad  $650$  °C (Obr. 11). Podle provedeného zpracování je možno získat produkty s požadovanou střední velikostí krystalitů ( $d_{\text{XRD}} \sim 20\text{--}180$  nm).<sup>[18]</sup> Obdobnou metodou připravili nanočástice LSMO s  $x=0,3$  i Rajagopal *et al.*<sup>[84]</sup> a Bha-



Obr. 11: TEM snímky LSMO ( $x=0,25$ ) připraveného na FZÚ AV ČR před (vlevo) a po (vpravo) mechanickém zpracování (mletí, válcování).

yani *et al.*<sup>[85]</sup> Připravené částice měly v obou případech rozměry přibližně  $\sim 30$  nm, Rajagopal je pak převedl do suspenze v organické fázi pomocí oktadecylaminu.

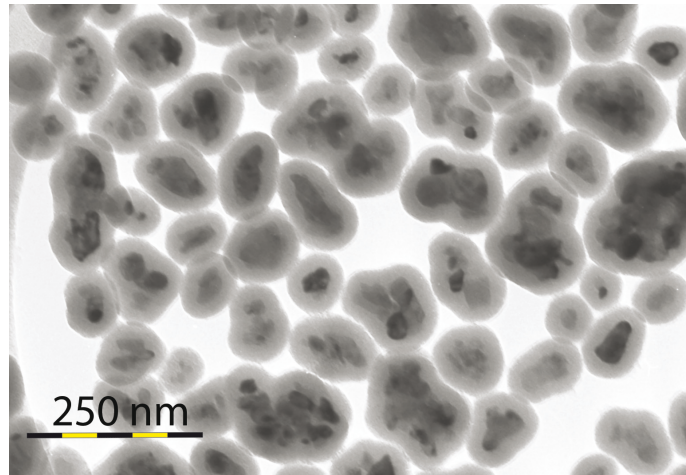
Pro použití v biomedicíně však nejsou samotné nanočástice vhodné. Prvním důvodem je, že samy o sobě netvoří stabilní suspenze ve vodě (naproti tomu tvoří stabilní suspenze v EtOH, případně *i*PrOH). Neméně důležité však je, že nanočástice LSMO vykazují značnou cytotoxicitu. Viabilita kmenových buněk inkubovaných v jejich přítomnosti byla menší než 5%.<sup>[86–88]</sup> Značnou cytotoxicitu volného LSMO popisuje též Bhayani *et al.*<sup>[85]</sup> Důvodem takové toxicity je pravděpodobně narušení povrchu nanočástice v prostředí buňky a související uvolňování toxických iontů  $Mn^{3+}$  a  $Mn^{4+}$  do vnitřního prostředí buňky.

LSMO je tedy nutné pro biomedicínské použití obalit vhodným materiálem, který izoluje magnetická jádra od vnějšího prostředí a zároveň umožňuje dobrou solubilizaci ve vodném a fyziologickém prostředí. Kromě enkapsulace amorfním  $SiO_2$  diskutované v dalším textu je třeba zmínit práci Bhayaniho *et al.*,<sup>[85]</sup> jenž obalil LSMO s  $x=0,3$  ( $La_{0,7}Sr_{0,3}MnO_3$ ) dextransm a albuminem hovězího séra (bovinní sérumalbumin, BSA). Výsledné produkty poskytly při inkubaci s rakovinnými buňkami viability těchto buněk nad 80 %. Je však otázkou, zda podobný „*nekovalentní coating*“ skutečně efektivně brání kontaktu perovskitového jádra s prostředím buňky.

### 3.2 LSMO@SiO<sub>2</sub>

Pro dobrou izolaci jádra od vnějšího (biologického) prostředí byla zvolena vrstva amorfního  $SiO_2$ , kterou je možno získat polykondenzací hydrolytických produktů TEOS na povrchu částic LSMO. Výsledkem jsou hybridní nanočástice LSMO enkapsulované do  $SiO_2$  – LSMO@ $SiO_2$ . Přípravou tohoto materiálu se zabýval v rámci své disertační práce O. Kaman na FZÚ AV ČR a následující odstavce jsou shrnutím jeho výsledků.<sup>[86–88]</sup>

Enkapsulace se provádí v citrátem stabilizované suspenzi částic LSMO aktivovaných pomocí  $\text{HNO}_3$ . Pro přípravu jsou standardně používány nanočástice LSMO o střední velikosti krystalitů  $d_{\text{XRD}} \sim 20$  nm. Vlastní enkapsulace je upravenou Stöberovou metodou.<sup>[89]</sup> Bazicky katalyzovaná hydrolyza TEOS a následná polykondenzace hydrolytických produktů probíhá v polární směsi

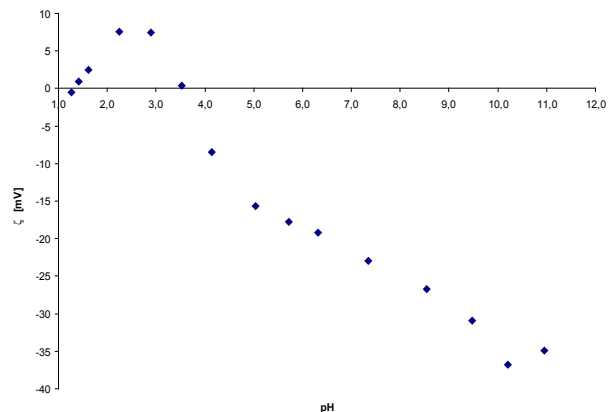


Obr. 12: TEM snímky LSMO@SiO<sub>2</sub> připraveného autorem v rámci této diplomové práce (šarže 43.14).

EtOH, NH<sub>4</sub>OH a vody. Tloušťku vrstvy je možné kontrolovat množstvím přidaného TEOS. Posledním krokem přípravy je frakcionace produktu sekvenční centrifugací, kdy je nejprve odstraněna těžká frakce obsahující částice spleené vyloučeným SiO<sub>2</sub> a nejrůznější agregáty (Obr. 12). Přesný postup syntézy je uveden v kapitole 4.4.3.1.

Připravené částice tvoří velmi stabilní suspenze ve vodě v důsledku záporného náboje na povrchu nanočástic a z toho vyplývajícího elektrostatického odpuzování jednotlivých částic. Příslušný  $\zeta$ -potenciál je při pH=7 přibližně -22 mV a izoelektrický bod částic, kdy mají částice nulový povrchový náboj, je IEP=3,4 (viz Obr. 13). Hydrodynamická velikost standardně připravovaných šarží produktu se pohybuje kolem  $d_{\text{DLS}} = 135$  nm a s časem se nemění, suspenze částic jsou tedy stabilní.

Během přípravy pozoroval O. Kaman zvětšení střední velikosti krystalitů z  $d_{\text{XRD}}(\text{LSMO}) = 20$  nm na  $d_{\text{XRD}}(\text{LSMO@SiO}_2) = 24$  nm.<sup>[88]</sup> To vysvětluje převážně rozpouštěním nejmenších částic při aktivaci LSMO pomocí  $\text{HNO}_3$ . Důsledkem takového „zvětšení“ je i zvýšení magnetizace LSMO@SiO<sub>2</sub> oproti samotnému LSMO (viz kap. 3.1). Jako dalším faktor, jenž může mít na této změně určitý podíl, je zmiňována i frakční centrifugace používaná pro čištění a separaci produktu, kdy je produkt podroben sérii centrifugací a odstraňování supernatantu nad usa-



Obr. 13: Graf závislosti  $\zeta$ -potenciálu LSMO@SiO<sub>2</sub> na pH. Převzato od O. Kamana.<sup>[86,88]</sup>

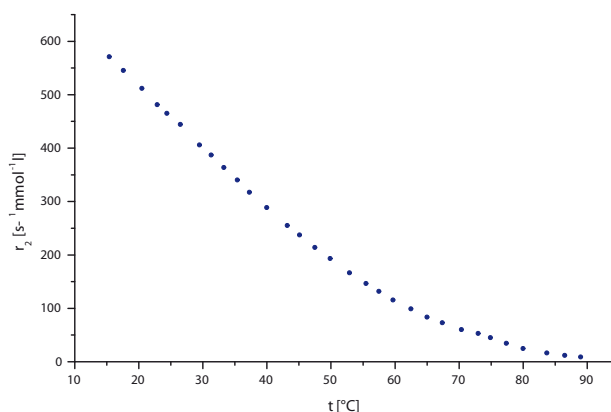
zeným materiálem.

Změna  $d_{\text{XRD}}$  během enkapsulace se odrazila i v magnetických vlastnostech. Hodnota magnetizace LSMO@SiO<sub>2</sub> přepočtená na obsah LSMO je jak v suspenzi, tak v suchém vzorku vyšší než magnetizace samotného LSMO (viz Tab. 6). Změna magnetizace tedy koresponduje se zvýšením střední velikosti krystalitů během enkapsulace do SiO<sub>2</sub>.

Tab. 6: Porovnání vlastností LSMO a LSMO@SiO<sub>2</sub>. Hodnota magnetizace v posledním řádku je vztažena na obsah LSMO. Převzato od O. Kamana.<sup>[88]</sup>

	LSMO	LSMO@SiO <sub>2</sub> (suchý vzorek)
$d_{\text{XRD}}$ [nm]	20	24
$T_c$ [K]	336	335
$M_{750\text{kA/m}}$ [Am <sup>2</sup> ·kg <sup>-1</sup> ]	24	31

Z hlediska využití enkapsulovaných částic v MRI je důležité, že vykazují značně vysoké hodnoty  $r_2$  relaxivity (Obr. 14). Při 25 °C je hodnota relaxivity při  $B_0=0,47$  T přibližně  $r_2 \sim 450 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Tato hodnota násobně převyšuje  $r_2$  relaxivity komerčních SPIO částic. Relaxivita samozřejmě v důsledku poklesu magnetického uspořádání LSMO klesá s teplotou.



Obr. 14: Graf závislosti  $r_2$  relaxivity LSMO@SiO<sub>2</sub> na teplotě, měřeno při  $B_0=0,47$  T. Převzato od O. Kamana.<sup>[86]</sup>

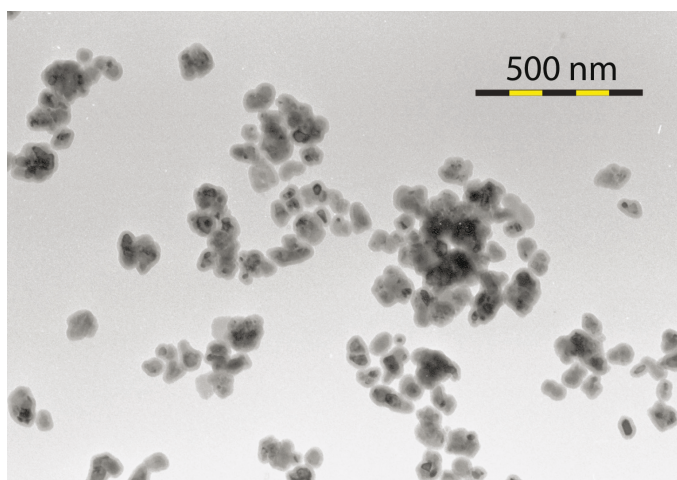
LSMO@SiO<sub>2</sub> je určen pro biomedicínské využití (MFH, MRI). Z toho důvodu byla testována viabilita buněčných kultur v jeho přítomnosti. Lidské HeLa nádorové buňky, kožní fibroblasty a kmenové buňky v jeho přítomnosti vykazují nejen dobré viability při relativně vysokých koncentracích, nýbrž i vstřebávání částic dostatečné pro vizualizaci označených buněk pomocí MRI. Při koncentraci nanočástic odpovídající koncentraci LSMO 0,11 mmol/l bylo opakovaně dosaženo u všech testovaných buněk vysokých viabilit, často přesahujících 90 %.

Přípravu podobných hybridních částic ( $\text{La}_{0,76}\text{Sr}_{0,24}\text{MnO}_3\text{@SiO}_2$ ) o velikosti  $\sim 250$  nm obdobnou metodou, avšak s poněkud horší morfologií, zmiňuje i nedávná publikace Uskokovice *et al.*<sup>[16]</sup>

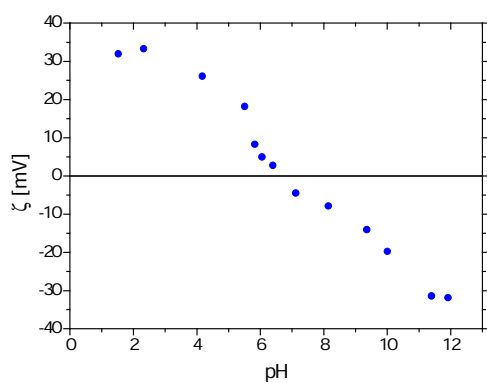
### 3.3 LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS

Dalším materiálem připraveným O. Kamanem je LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS.<sup>[86,87]</sup> Jde o nanočástice LSMO enkapsulované do křemičitého obalu obsahujícího 3-aminopropylové skupiny vázané přímo na atomy Si. Na rozdíl od standardního LSMO@SiO<sub>2</sub>, na jehož povrchu jsou pouze Si-O<sup>-</sup> (případně Si-OH) skupiny, LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS obsahuje na svém povrchu primární aminoskupiny použitelné pro další reakce. Reakcí těchto aminoskupin např. s aktivními estery nebo isothiokyanáty je možno na povrch nanočástic kovalentně navázat nejrůznější molekuly.

Enkapsulace se provádí v suspenzi nanočástic stabilizovaných polyvinylpyrrolidonem, tedy tzv. *PVP metodou*. Příprava opět standardně vychází z nanočástic LSMO o střední velikosti krystalitů  $d_{\text{XRD}} \sim 20$  nm. Jedná se o bazicky katalyzovanou hydrolyzu směsi TEOS a APS a následnou polykondenzaci hydrolytických produktů. Reakce opět probíhá ve velmi polární směsi EtOH, NH<sub>4</sub>OH a vody. Množství povrchových aminoskupin je možné ladit změnou poměru APS/TEOS (standardně používán poměr 1:4). Tloušťku vrstvy je opět možné kontrolovat množstvím přidaného TEOS a APS (Obr. 15). Posledním krokem je frakční centrifugace produktu, kdy jsou z produktu odstraněny velké agregáty a slepence.



Obr. 15: TEM snímek LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS připraveného autorem v rámci této diplomové práce (šarže 43.8).



Obr. 16: Graf závislosti  $\zeta$ -potenciálu LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS na pH. Převzato od O. Kamana.<sup>[86]</sup>

Připravené částice na rozdíl od LSMO@SiO<sub>2</sub> netvoří stabilní suspenze ve vodě při neutrálním pH. To je dáno přítomností primárních aminoskupin na křemičitém povrchu částice, které snižují záporný náboj na povrchu částice. Příslušný  $\zeta$ -potenciál je při pH=7 mnohem menší než u LSMO@SiO<sub>2</sub>, klesá téměř k nule. Izoelektrický bod tedy leží při neutrálním pH. Produkt ale tvoří relativně stabilní suspenze v EtOH (Obr. 16).

Je zřejmé, že se zvyšujícím se množstvím APS v reakční směsi stoupá *IEP* a zejména klesá „kom-

paktnost“ křemičité vrstvy, neboť se snižuje sesíťování atomů křemíku kyslíkovými můstky. Takový materiál bude tedy pravděpodobně méně důkladně izolovat perovskitové jádro od okolí. Protože LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS netvoří stabilní vhodné suspenze za fyziologického pH, není možné ho přímo použít na biologické experimenty. Díky povrchovým aminoskupinám a možnosti jejich snadné derivatizace je však potenciálním prekurzorem pro případné komplexnější materiály.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie

- 5-aminofluorescein, >99 % GC, Aldrich
- 3-aminopropyltriethoxysilan (APS), Aldrich
- dextran, extrahovaný z *Leukonostoc* ssp, Fluka
- eosin, Lachema
- ethanol (EtOH), čistý, P-Lab
- ethanol (EtOH), bezvodý – přesušený ethanolátem hořečnatým, podle literatury<sup>[90]</sup>: V aparatuře promývané Ar byly Mg-hobliny aktivované malým množstvím I<sub>2</sub> převrstveny malým množstvím komerčního suchého EtOH (Penta), směs byla poté přibližně 2 h refluxována. Poté byl přidán další suchý EtOH a směs byla dále přibližně 2 h refluxována. Přesušený EtOH byl vydestilován do baňky vypláchnuté Ar.
- polyethylenglykol (PEG),  $M_w = 10\,000$ , Fluka
- polyvinylalkohol (PVA),  $M_w = 57\text{--}66\,000$ , Alfa Aesar
- polyvinylpyrrolidon (PVP) K25,  $M_w = 24\,000$ , Aldrich
- polyvinylpyrrolidon (PVP) K90,  $M_w = 360\,000$ , Fluka
- rhodamin B, Aldrich
- tetraethoxysilan (TEOS), >99 % GC, Aldrich
- thiofosgen, 97 %, Fluka

### 4.2 Charakterizační a preparační metody

Není-li uvedeno jinak, nachází se příslušná instrumentace na PŘF UK.

#### 4.2.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Morfologie částic byla měřena RNDr. Jaroslavem Kupčíkem v Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži u Prahy na mikroskopu Philips EM 201 (urychlovací napětí 100 kV, wolframové vlákno).

**Příprava vzorku:** Zředěná suspenze nanočástic byla nejprve několik minut v plastové zkumavce sonifikována v ultrazvukové lázni. Poté bylo automatickou pipetou nanášeno několik  $\mu\text{l}$  suspenze na uhlíkem potažený měděný terčík SPI 3630C–MB a kapka byla následně ponechána volně uschnout za laboratorní teploty.

**Obrazová analýza:** Obrazová analýza byla prováděna v programu ImageJ 1.37a.<sup>[91]</sup> Vzhledem k omezenému množství vhodných snímků byl zvolen následující postup analýzy: Hranice jednotlivých rozlišitelných částic byly označeny ručně. Ručně byly též označeny hranice příslušných magnetických jader. Tato metoda dovolila na dostupných snímcích analyzovat větší množství částic než automatické metody. Pro každou měřenou částici byla zjištěna její plocha a obvod, plocha a obvod magnetického jádra. Částice a jádra byla aproximována modelem kulových částic, jejichž průřez je zobrazený na TEM mikrofotografiích. Z ploch komplexních částic a ploch příslušných magnetických jader byla pro každou částici spočítána tloušťka křemičité vrstvy jako rozdíl příslušných poloměrů. Z kulového modelu byly následně spočítány průměry magnetických jader i částic. Pro každou měřenou částici byla také stanovena cirkularita.

#### 4.2.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Instrumentace pro měření DLS se skládala z 633 nm He-Ne laseru, goniometru ALV CGS/8F, detektoru ALV High QE APD a multibitového multitaun autokorelátoru ALV 5000/EPP. Měření bylo prováděno při úhlu 90°.

Zpracování naměřených data byla provedeno pomocí programu ALV Correlator Software. Rozptyl byl vyhodnocen fitováním změřené normalizované časové autokorelační funkce intenzity rozptýleného světla  $g^{(2)}(t)$ , vztahené k autokorelační funkci elektrického pole  $g^{(1)}(t)$  Siegertovým vztahem  $g^{(2)}(t) = 1 + \beta |g^{(1)}(t)|^2$ .

Výsledky měření jsou uváděny ve formě hydrodynamického poloměru  $r_{DLS}$ .

**Příprava vzorku:** Není-li uvedeno jinak, byla zředěná suspenze nanočástic přímo ve skleněné DLS kyvetě krátce sonifikována v ultrazvukové lázni.

#### 4.2.3 $\zeta$ -potenciál

$\zeta$ -potenciál byl měřen na přístroji Malvern Autosizer Lo-C v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze. Zředěné suspenze o daném pH byly měřeny v plastové kyvetě; každý vzorek byl změřen minimálně šestkrát. pH suspenzí bylo upravováno přidáním příslušného množství 1M HCl nebo 1M NaOH. Přesné pH připravených vzorků bylo stanoveno pH-metrem Radiometer pIONner 10 vybaveném kombinovanou skleněnou elektrodou Mettler Toledo.



#### 4.2.4 IR spektroskopie – DRIFTS

IR spektra byla měřena technikou difúzní reflektance (DRIFTS) na IR spektrometru Nicolet Magna 760 FTIR (rozlišení  $4\text{ cm}^{-1}$ , Happ–Genzelova apodizace). Získaná data byla vyhodnocena programem Omnic 6.0.

**Příprava vzorku:** Suspenze nanočástic byla nejprve odstředěna a rozpouštědlo vyměněno za EtOH. Ethanická suspenze byla pak sušena ve vakuové sušárně při  $40\text{ °C}$  po dobu minimálně 12 h. Pevný vysušený vzorek byl pak rozetřen v achátové misce s opticky čistým KBr.

#### 4.2.5 UV-Vis spektroskopie

Měření byla prováděna na přístroji UNICAM UV 300. Všechna měření byla prováděna v křemenných květách Hellma 114–QS. Získaná data byla vyhodnocena programem Vision 32.

Při průchodu světla koloidy se kromě absorpce světla uplatňuje ještě rozptyl (Tyndallův jev). Při měření úbytku intenzity procházejícího paprsku v UV-Vis spektrometru je tedy měřen společný účinek absorpce a rozptylu světla. Turbidimetrii nazýváme měření snížení intenzity procházejícího světla v koloidních soustavách. Pro snížení intenzity ve zředěných suspenzích platí vztah<sup>[92]</sup>

$$A_T = \log \frac{I_0}{I} = k \frac{clr^3}{r^4 + \alpha\lambda^4}$$

kde  $A_T$  jest turbidancí,  $I$  a  $I_0$  jsou intenzity prošlého, respektive vstupujícího světla,  $\alpha$  a  $k$  jsou konstanty úměrnosti,  $c$  koncentrace částic,  $l$  optická dráha,  $r$  poloměr částic a  $\lambda$  vlnová délka použitého světla. Měříme-li při konstantní vlnové délce a ve stejném uspořádání, pak turbidance  $A_T$  je přímo úměrná koncentraci  $c$  s konstantou úměrnosti  $K$

$$A_T = Kc$$

je s ní tedy možno zacházet stejně jako s absorbcí u pravých roztoků. Protože částice vykazují i absorpci světla, je možno pro snížení intenzity psát, že

$$\log \frac{I_0}{I} = k \frac{clr^3}{r^4 + \alpha\lambda^4} + \epsilon lc = A + A_T = A^* = K.c$$

kde  $A$  je absorbance dle Lambert-Beerova zákona a  $\epsilon$  je extinkční koeficient. Pro účely této práce nazveme součet absorbance a turbidance  $A^*$  souhrnnou absorbcí a dále ho budeme standardně značit  $A$ . Při zachování stejných podmínek měření a srovnatelně velkých částic srovnatelného tvaru je souhrnná absorbance přímo úměrná koncentraci částic.

V dalším textu budou pro zjednodušení výsledky měření úbytku intenzity procházejícího světla UV-Vis spektrometrem uváděny jako absorpční spektra.

#### 4.2.5.1 Fotometrické stanovení obsahu Mn v suspenzích nanočástic

Koncentrace nanočástic v suspenzích odpovídala obsahu Mn.

**Příprava vzorku:** Přípravu vzorků pro fotometrické stanovení prováděla prom. chem. Dagmar Zemanová na Fyzikálním ústavu AV ČR v Praze. Nanočástice v suspenzi bylo nejprve nutno rozložit. Prvotní rozklad probíhal za tepla působením směsi  $\text{HNO}_3$  a  $\text{HCl}$ . Do směsi byla pak přidána  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Odpařením roztoku do hustých dýmů  $\text{H}_2\text{SO}_4$  byla ze směsi odstraněna  $\text{HCl}$ . Současně se vylučovala kyselina křemičitá ve formě bílého zákalu. Směs byla zfiltrována přes filtrační papír s modrým pruhem. Filtrační papír se zachycenou kyselinou křemičitou byl následně spálen a pevný zbytek byl vystaven působení směsi  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $\text{HF}$ . Opětovným odkuřováním roztoku byla odstraněna  $\text{HF}$ . Vzniklý roztok byl v odměrné baňce spojen s filtrátem. Z baňky byla odpipetována přesně 1/5 roztoku.  $\text{Mn}^{2+}$  byl v odebraném roztoku oxidován na  $\text{MnO}_4^-$  přidáním pevného  $\text{NaIO}_3$ , výsledný roztok byl stabilizován přídavkem  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Stejným způsobem byly ze spektroskopického standardu  $\text{Mn}^{2+}$  připraveny roztoky pro kalibrační křivku a kontrolní vzorky získané metodou standardního přídavku. Použité kyseliny byly standardně zředěny vodou v poměru 1 : 1.

**Fotometrické stanovení:** Byla změřena UV-Vis absorpční spektra připravených vzorků a bodů kalibrační křivky. Pro stanovení obsahu Mn byla využita absorbance v maximu absorpčního pásu  $\text{MnO}_4^-$  při  $\lambda = 525 \text{ nm}$ . Obsah Mn v roztocích byl odečítán ze čtyřbodové kalibrační křivky. Ta byla získána lineární regresí absorbancí roztoků standardu  $\text{Mn}^{2+}$  dané koncentrace. Výsledný obsah Mn je průměrem výsledků zjištěných s přídavkem a bez standardního přídavku.

#### 4.2.6 Luminiscenční spektroskopie

Měření byla prováděna na přístroji AMINCO Bowman Series 2 FA-357. Všechna měření byla prováděna v křemenných fluorescenčních kyvetách Hellma 111-QS. Velikost napětí na detektoru (citlivost detektoru) je vždy uvedena u konkrétního měření. Získaná data byla vyhodnocena programem AB2.

Při průchodu světla koloidy dochází k rozptylu světla. Rozptyl světla v suspenzích nanočástic poněkud omezuje měření fluorescenční spektroskopie. Je nutné se vyvarovat nastavení monochromátoru detektoru na vlnovou délku excitačního paprsku  $\lambda_{\text{exc}}$ , případně její násobky, neboť v tom případě proudí do detektoru relativně vysoká intenzita rozptýleného záření, často významně

převyšující případnou fluorescenci. Čím vyšší je zvoleno napětí na detektoru, tím menší intenzita záření stačí k jeho kompletnímu vysycení. Logicky tedy musí být tím vyšší rozdíl mezi  $\lambda_{exc}$  či jejími násobky a měřenými vlnovými délkami emise. Pro napětí 700 V byl používán rozdíl přibližně 8 nm, pro napětí 1200 V rozdíl 40–50 nm.

#### 4.2.7 NMR spektroskopie

NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian NMRS 300. Příslušné rezonanční frekvence pro jednotlivá jádra:  $^1\text{H}$  (300 MHz),  $^{13}\text{C}$  (75 MHz). Chemické posuny  $\delta$  jsou udávány v jednotkách ppm, interakční konstanty v Hz. Měření byla prováděna v DMSO- $d^6$  (Chemotrade; 99,5 % D) při teplotě 25 °C.

#### 4.2.8 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

TLC byla prováděna na destičkách Merck Silica Gel 60 F<sub>254</sub>. Příslušné mobilní fáze a způsoby detekce jsou uvedeny u jednotlivých látek.

#### 4.2.9 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla měřena Miroslavem Pniokem na přístroji Bruker ESQUIRE 3000 vybaveným iontovou pastí. Spektra byla měřena v pozitivním i negativním módu, ionizace byla prováděna elektrosprejem. V charakterizacích jsou uváděny pouze signály, jež se podařilo interpretovat. Při popisu spekter je zachováno toto uspořádání:

hodnota  $m/z$  (intenzita v % nejintenzivnějšího signálu, charakter iontu).

#### 4.2.10 RTG difrakce

Měření RTG difrakce a vyhodnocení naměřených dat provedl RNDr. Karel Knížek, Ph.D, na Fyzikálním ústavu AV ČR v Praze. Difrakce vysušeného vzorku byla měřena na přístroji Bruker D 8 s použitím záření CuK $\alpha$  a detektoru rozptylové energie SOL-X. Rietveldova metoda analýzy difrakčních obrazů byla provedena s použitím programu FULLPROF.<sup>[93]</sup> Analýza fázového složení byla založena na datech z krystalografické databáze ICSD.<sup>[94]</sup> K rozdělení rozšíření peaku na instrumentální příspěvek a příspěvky napětí a velikosti zrna byl použit Thompson-Cox-Hastingsův pseudo-Voigtův profil. Instrumentální příspěvek byl stanoven měřením standardního beznapětového wolframového prášku s velikostí krystalitu 9,4  $\mu\text{m}$ .

### **4.2.11 Centrifugace**

Centrifugace byly prováděny převážně v plastových 15 ml centrifugačních zkumavkách v centrifuze Hettich EBA 20. V případě, že bylo nutno centrifugovat při otáčkách vyšších než 6000 rpm, bylo odstředování prováděno v 50 ml plastových centrifugačních zkumavkách s kónickým dnem na centrifuze Nüve NF-800. Parametry centrifugace, tedy doba a otáčky, jsou uváděny ve formátu (otáčky/čas). Otáčky jsou uvedeny v jednotkách rpm.

### **4.2.12 Ultrazvuková sonifikace**

Pro sonifikace ultrazvukovou sondou byla používána sonda Hielscher IP200S s výkonem 500 W. Pro sonifikace v ultrazvukové lázni byla využívána lázeň Bandelin SONOREX Longlife RK103CH opatřená chladicí spirálou napojenou na externí termostat.

## **4.3 Biologické experimenty**

### **4.3.1 Buněčné studie s HeLa buňkami a fibroblasty**

Biologické testy připravených nanočástic na nádorových HeLa buňkách a fibroblastech prováděl Mgr. Lukáš Falteisek na Katedře buněčné biologie PřF UK v Praze.

#### **4.3.1.1 Testy viability**

Buňky byly nasazeny do 24 jamkové mikrotitrační destičky na konfluenci cca 70 %. 24 h po nasazení byly buňky opláchnuty PBS a bylo jim vyměněno médium (objem 0,5 ml). Poté byla do jednotlivých jamek přidána suspenze nanočástic v příslušné koncentraci. Buňky byly inkubovány v humidifikovaném CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C a 5 % atmosféře CO<sub>2</sub> s nanočásticemi po dobu 48 h. Po inkubaci bylo odstraněno a uschováno médium obsahující mrtvé buňky a adherované buňky byly resuspendovány pomocí 0,5 ml roztoku trypsin/EDTA v PBS. Získaná suspenze byla spojena se suspenzí mrtvých buněk v médiu, obarvena propidium jodidem (1 kapka/ml, inkubace min. 5 min) a měřena na průtokovém cytometru. Živé a mrtvé buňky vytvářejí při barvení propidium jodidem dostatečně odlišitelné populace. Bylo měřeno minimálně 5000 událostí u HeLa buněk a 2500 událostí u fibroblastů. Odečítán byl poměr počtu událostí v gatú pro jednoznačně živé a jednoznačně mrtvé buňky (dot plot, osa x: FITC, osa y: propidium jodid) a střední hodnota fluorescence v kanálu FITC (pouze po inkubaci s fluorescenčními částicemi, získány pouze relativní

hodnoty). Viabilita byla vypočítána jako podíl množství živých buněk a součtu počtů živých a mrtvých buněk.

#### **4.3.1.2 Fluorescenční mikroskopie**

Buňky byly nasazeny do 24 jamkové mikrotitrační destičky s vloženými krycími skly. 24 h po nasazení byla do jednotlivých jamek přidána suspenze nanočástic v příslušné koncentraci. Buňky byly inkubovány s nanočásticemi v humidifikovaném CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C a 5 % atmosféře CO<sub>2</sub> po dobu 48 h.

**Fixace:** Krycí skla s narostlou buněčnou kulturou byla opláchnuta PBS a inkubována 20 min 3,8 % formaldehydem. Poté byla promývána 2 min v PBS. Zbytky formaldehydu byly neutralizovány 5 min v 0,015M NH<sub>4</sub>Cl. Skla byla promyta 2 × 5 min v PBS a montována na podložní sklo do kapky mowiolu s DAPI.

**Vlastní mikroskopie:** Preparáty byly pozorovány imerzním objektivem 63 × (Olympus) pod excitačními a emisními filtry pro DAPI a FITC. Expoziční čas pro fotografování byl typicky 30 ms DAPI a 500 ms FITC. V ovládacím softwaru mikroskopu byl odříznut šum (v polovině šumového peaku na histogramu) a upraven kontrast.

#### **4.3.1.3 Buněčné linie**

- **HeLa:** lidské nádorové buňky (adenokarcinomu děložního krčku), adherentní, epitheloidní morfologie
- **Normální lidské fibroblasty:** kožní fibroblasty odebrané ze zdravého dárce

#### **4.3.1.4 Média a chemikálie**

Není-li uvedeno jinak, výrobce Sigma Aldrich nebo Lachema.

- **D-MEM:** 90 % (v/v) D-MEM (Gibco BRL); 10 % (v/v) fetálního bovinního séra – FBS (Gibco BRL); 40 µg/ml gentamycin (Lek); 0,25 mg/ml glutamin (Sevapharma); sterilní příprava; skladováno při 4 °C
- **PBS:** 7,9 g NaCl; 0,11 g KCl; 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 0,31 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; doplněno do 1000 ml destilovanou vodou
- **10 × Trypsin EDTA:** 5 g prasečího trypsinu; 2 g EDTA; 0,9 % (w/v) NaCl do 100 ml
- **Propidium jodid, aq.;** 1 mg/ml
- **Fixační roztok:** 3,8 % (w/v) formaldehyd v PBS

- **Promývací roztok po fixaci:** 0,015M NH<sub>4</sub>Cl v PBS
- **Mowiol s DAPI:** 20 % (w/v) glycerol; 10 % (w/v) Mowiol 4–88 (Calbiochem); 0,1M Tris.HCl pH = 8,5; DAPI 1µg/50ml; skladováno při 4 °C ve tmě

#### **4.3.1.5 Instrumentace**

- **Průtokový cytometr:** Becton Dickinson LSR II; nastavení jednotlivých kanálů fotonásobiče: FSC 120 V, SSC 150 V, FITC 300 V, PI 350 V; filtry (bandpass): FITC 530/30 nm, PI 610/20 nm; threshold: FSC (15 000 událostí); kompenzace: žádná. Ovládací a analytický software: BD FACSDiva 6.1.2
- **Fluorescenční mikroskop:** Olympus IX-81 CellR s filtry pro fluorescenci U–M3DAFITR (Olympus). Digitální kamera: Hamamatsu C4742–80–12AG. Ovládací a analytický software: Olympus CellR

### **4.3.2 Buněčné studie s kmenovými buňkami**

Biologické testy připravených nanočástic na kmenových buňkách prováděla RNDr. Pavla Jendelová, Ph.D, v Centru buněčné terapie a tkáňových náhrad 2.LF UK v Praze.

#### **4.3.2.1 Testy viability a fluorescenční mikroskopie**

Buňky kostní dřeně rMSC byly vysety v kultivačním médiu DMEM. Po 24 hodinách byly odstraněny neadherentní buňky. Množství přisedlých buněk bylo stanoveno počítáním v Bürkerově komůrce. Médium bylo měněno každé 2–3 dny dle toho, jak buňky dorůstaly do konfluence. Při experimentech byly použity pasáže 2–5.

Buňky byly vysety v novém kultivačním médiu DMEM obsahujícím suspenzi nanočástic příslušné koncentrace do 12 jamkových destiček, 100 000 buněk na jamku. Po 48 h inkubace v humidifikovaném CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C a 5 % atmosféře CO<sub>2</sub> bylo slito medium s plovoucími buňkami a pomocí trypsin/EDTA byly sklizeny adherentní buňky. Sklizené buňky byly odstředěny (1000 rpm/5 min), promyty PBS, fixovány paraformaldehydem a následně spočítány v Bürkerově komůrce.

Viabilita rMSC byla stanovena pomocí trypanové modři. Bürkerova komůrka byla naplněna 20 µl trypanové modři a 20 µl buněčné suspenze a byl spočítán podíl mrtvých (tj. modře obarvených) buněk ve 100 buňkách.

Morfologie inkubovaných buněk byla následně zkoumána pomocí fluorescenčního mikroskopu. Buňky byly fixovány roztokem paraformaldehydu.

#### **4.3.2.2 Použité buňky**

Mesenchymální stromální buňky z kostní dřene potkanů (rMSC) byly izolované ze stehenních kostí dospělých potkanů kmene Wistar.

#### **4.3.2.3 Média a chemikálie**

- **DMEM:** 90 % (v/v) DMEM high glucose (PAA Laboratories); 10 % (v/v) FBS (PAA Laboratories); směs antibiotik penicilinu (Gibco BRL) a streptomycinu (Gibco BRL), obě v koncentraci 100 jednotek/ml.
- **PBS:** 7,9 g NaCl; 0,11 g KCl; 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 0,31 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; doplněno do 1000 ml destilovanou vodou
- **Fixace:** 4 % (w/v) paraformaldehyd v PBS
- **trypsin:** 0.25 % (w/v)
- **tryptanová modř**

#### **4.3.2.4 Instrumentace**

**Fluorescenční mikroskop:** inverzní fluorescenční mikroskop Zeiss Axioplan Imaging II. Digitální kamera AxioCam. Ovládací a analytický software: AxioVision 4.

### **4.3.3 Inkubace nanočástic s Langerhansovými ostrůvky**

Biologické testy připravených nanočástic na pankreatických Langerhansových ostrůvcích prováděl Ing. Bc. Daniel Jiráček v IKEM v Praze.

#### **4.3.3.1 Kultivace, in vitro vitalita**

Izolované pankreatické ostrůvky byly uloženy do kultivačního média CMRL do humidifikovaného CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C a 5 % atmosféře CO<sub>2</sub>. Pro značení ostrůvků byl použit produkt v koncentraci 0,11 mmol/l LSMO, což odpovídá obsahu Mn 6 µg/ml. Ostrůvky byly takto značeny 24 h. Před dalšími experimenty byly vzorky ostrůvků 3 × 5 min v PBS.

Vitalita ostrůvků byla testovaná pomocí fluorescenčních barev propidium jodid (PI) a akridi-

nová oranž (AO). PI vstupuje přes membránu mrtvých nebo umírajících buněk, kde se váže na nukleové kyseliny a intenzívně je barví na červenou. AO v nízkých koncentracích vstupuje přes membránu živých buněk a barví jejich cytoplazmu na zeleno. Pod fluorescenčním mikroskopem byly ostrůvky rozděleny do skupin podle % nekrotických buněk 0–25, 26–50, 51–75, 76–100 % a na základě toho byla stanovena celková vitalita.

Pro pozorování označených ostrůvků fluorescenčním mikroskopem byly promyté ostrůvky 5 min barveny pomocí DAPI, následně promyty 3×5 min v PBS a montovány na podložní sklo, přebytečná tekutina byla odsáta, ostrůvky zakápnuty kapkou Dabco–Mowiolu, překryty krycím sklem a zalakovány lakem na nehty.

Obě pozorování byla provedena fluorescenčním mikroskopem Olympus BX41 s digitální kamerou Olympus DP71.

#### **4.3.3.2 Statické inkubace**

Schopnost ostrůvků produkovat inzulin byla stanovena *in vitro* pomocí statických inkubací. Základní roztok pro tento test se skládá z ekvivalentního množství roztoků Krebs I, Krebs II a Krebs III. Do pracovního roztoku se glukóza nepřidává, slouží pouze na promytí ostrůvků. Glukóza se přidává do bazálního roztoku v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 3,3 mmol/l. Stimulační roztok má koncentraci glukózy 22 mmol/l. Ostrůvky se inkubují 60 min v bazálním roztoku, pak 60 min ve stimulačním a nakonec opět 60 min v bazálním roztoku. Po každé inkubaci se odebere vzorek média pro stanovení koncentrace inzulinu pomocí 125I RIA Kit. Vzhledem k variabilitě použitých ostrůvků se stanovuje tzv. *stimulační index, SI* (množství uvolněného inzulinu po stimulaci/množství uvolněného inzulinu v první nestimulační kultuře).

#### **4.3.3.4 Média a chemikálie**

- **CMRL:** médium CMRL 1066 (PANBiotech GmbH) obohacené o 10 % (v/v) fetálního séra; 1 % penicilinu/ streptomycinu/glutaminu a 1 % HEPES (vše Sigma)
- **PBS:** 7,9 g NaCl; 0,11 g KCl; 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 0,31 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; doplněno do 1000 ml destilovanou vodou
- **propidium jodid**
- **akridinová oranž**
- **Krebs I:** NaCl 26,892 g/l
- **Krebs II:** KCl 1,490 g/l; NaHCO<sub>3</sub> 8,064 g/l; MgCl<sub>2</sub> 0,814 g/l
- **Krebs III:** CaCl<sub>2</sub> 1,11 g/l



- <sup>125</sup>I RIA Kit (ICN Pharmaceuticals)
- DAPI (Sigma Aldrich), 10 mg/ml
- Dabco–Mowiol, v glycerolu

#### **4.3.3.5 Magnetická rezonance**

Magnetická rezonance označených Langerhansových ostrůvků byla provedena na přístroji 4,7 T Bruker Biospec spectrometer. Gelový vzorek v Petriho misce se skládal z ostrůvků umístěných mezi dvěma vrstvami želatiny, spodní vrstva byla 4 % (w/w) želatina, vrchní vrstva 3 % (w/w) želatina. Parametry měření jsou:

- pro 0,85 mm vrstvy: doba 200 min;  $T_{1w}$  RARE sekvence;  $TR/TE = 730/14$  ms; turbo faktor 2; 128 akvizicí; Matrix =  $256 \times 256$ ; FOV (field of view) =  $4,0 \times 4,0$  cm
- pro 0,5 mm vrstvy: doba 97 min;  $T_{1w}$  RARE sekvence;  $TR/TE = 474,9/14$  ms; turbo faktor 2; 96 akvizicí; Matrix =  $256 \times 256$ ; FOV (field of view) =  $4,0 \times 4,0$  cm

## 4.4 Syntetická část

### 4.4.1 Strategie přípravy

Je zřejmé, že materiál daných vlastností je možno připravit řadou způsobů. Byla tedy snaha vyzkoušet nejprve nejjednodušší možné přístupy; v ideálním případě pouze modifikovat již připravené materiály. Prvotní pokusy byly tedy založeny na materiálech LSMO@SiO<sub>2</sub> a LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS, jejichž syntéza byla již dříve zvládnuta. Strategie práce byla tedy následující:

- změření fluorescence již připraveného LSMO@SiO<sub>2</sub> (případně i LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS) a její případné využití (optické vlastnosti nanočástic LSMO@SiO<sub>2</sub> a LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS nebyly dosud prozkoumány).
- zlepšení fluorescenčních vlastností perovskitového jádra dopováním Eu
- navázání fluorescenční značky (FITC) na povrchové aminoskupiny LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS
- nekovalentní zachycení fluorescenčního barviva (eosin, rhodamin B) ve vrstvě SiO<sub>2</sub> v LSMO@SiO<sub>2</sub>
- kovalentní navázání fluoresceinové značky (FITC) do vrstvy SiO<sub>2</sub>
- pokrytí předchozího produktu sekundární vrstvou čistého SiO<sub>2</sub>

### 4.4.2 Příprava konjugátu APS-FITC

#### 4.4.2.1 Příprava FITC

Reakce byla prováděna podle přizpůsobeného postupu z literatury.<sup>[95]</sup> 5-aminofluorescein (0,50 g; 1,44 mmol) byl rozpuštěn v 50 ml hruškové baňce v 1,25 ml DMF. Následně bylo přidáno 2,5 ml acetonu a suspenze byla za současného míchání ochlazena v chladicí lázni (NaCl + led + EtOH 1 : 1 : 1) na -17 °C. Poté bylo ve třech dávkách během 20 min přidáno 0,75 ml roztoku thiofosgenu (cca 42%; připravený smísením 0,60 g CSeCl<sub>2</sub> a 0,82 g CCl<sub>4</sub>).

Vzniklá hustá, žlutá, prakticky nemíchatelná kašovitá hmota byla po 10 min rozptýlena v 10 ml ledového acetonu. Filtrací směsi přes fritu S3 byl získán žlutý pevný produkt. Ten byl následně promyt ještě 15 ml ledového acetonu, 10 ml vychlazeného CHCl<sub>3</sub> a následně 10 ml vody. Výsledný produkt byl přes noc usušen ve vakuovém exsikátoru. Výtěžek byl 440 mg.

Acetonový filtrát byl vlit do 200 ml studené vody a ponechán 30 min míchat. Vysrážený žlutý materiál byl zachycen filtrací na fritě S4. Materiál byl promyt 10 ml vody a výsledný produkt byl přes noc usušen ve vakuovém exsikátoru. Výtěžek byl 50 mg.

Dle TLC (jedna skvrna) byly obě frakce čisté a proto byly smíchány. Celkový výtěžek byl 490 mg (1,25 mmol), což představuje 87 %.

Charakterizace:

TLC (Merck, THF:toluen 1:1, vizuální detekce):  $R_f=0,7$ ; oranžová skvrna

(výchozí látka:  $R_f=0,45$ ; žlutá skvrna)

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 8,02 (dd; 1H;  $^4J_{\text{HH}}=1,8$ ;  $^5J_{\text{HH}}=0,6$ ); 7,79 (dd; 1H;  $^3J_{\text{HH}}=8,1$ ;  $^4J_{\text{HH}}=1,8$ ); 7,34 (dd; 1H;  $^3J_{\text{HH}}=8,1$ ;  $^5J_{\text{HH}}=0,6$ ); 6,69 (d; 2H;  $J_{\text{HH}}=2,4$ ); 6,59 (t; 2H;  $J_{\text{HH}}=8,7$ ); 6,54 (dd; 2H;  $J_{\text{HH}}=8,7$ ;  $J_{\text{HH}}=2,4$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 167,8; 160,3; 152,4; 151,2; 136,2; 133,8; 132,5; 129,7; 126,2; 113,2; 109,4; 102,8

IR:  $2100\text{ cm}^{-1}$  (wb, valenční antisymetrická vibrace  $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$  skupiny)

#### 4.4.2.2 Konjugace APS + FITC

Pro zabezpečení bezvodého prostředí byla reakce prováděna v čerstvě přesušeném EtOH, nadesťilovaném přímo před použitím produktu v následné enkapsulaci.

Přibližně 20 ml komerčního bezvodého EtOH bylo dále přesušeno dle literatury<sup>[90]</sup> pomocí  $\text{Mg}(\text{OEt})_2$  v argonem důkladně promyté aparatuře. Do argonem několikrát vypláchnuté zvážené slzové baňky bylo vneseno 110 mg FITC (0,282 mmol; 1,2 eq.). Baňka byla obalena alobalem pro zamezení přístupu světla. Bezvodý EtOH byl při destilaci jímán přímo do této baňky opatřené zváženým míchadlem. Po nadesťilování cca 10 ml rozpouštědla byla baňka odpojována od destilační aparatury a za dostatečně silného protiproudu Ar uzavřena septem a septum obaleno parafilmem. Po kompletním rozpuštění FITC v takto čerstvě nadesťilovaném EtOH bylo přes septum Hamiltonovou stříkačkou vneseno do roztoku 50  $\mu\text{l}$  APS (0,238 mmol; 1 eq.) a reakční směs byla v uzavřené baňce pod Ar atmosférou v temnu ponechána míchat při laboratorní teplotě po dobu přibližně 20 h.

Produkt ve formě takto získané reakční směsi (roztok v EtOH) byl ihned, bez jakékoliv další purifikace, použit při kondenzaci fluorescenční vrstvy na nanočásticích LSMO (viz kap. 4.4.3.3), která na jeho přípravu bezprostředně navazovala. Množství nadesťilovaného EtOH a tím i koncentrace APS a konjugátu APS-FITC ve vzniklém ethanolickém roztoku bylo stanoveno z rozdílu hmotností baňky před a po nadesťilování EtOH.

Reakce byla prováděna ve škálách odpovídající navážce FITC cca 50–110 mg v závislosti na konkrétní potřebě konjugátu pro další použití. Poměr reaktantů však zůstával vždy zachován.

Charakterizace:

TLC (Merck, THF:toluen 1:1, vizuální detekce):  $R_f=0,63$ ; oranžová skvrna

(FITC:  $R_f=0,7$ ; oranžová skvrna)

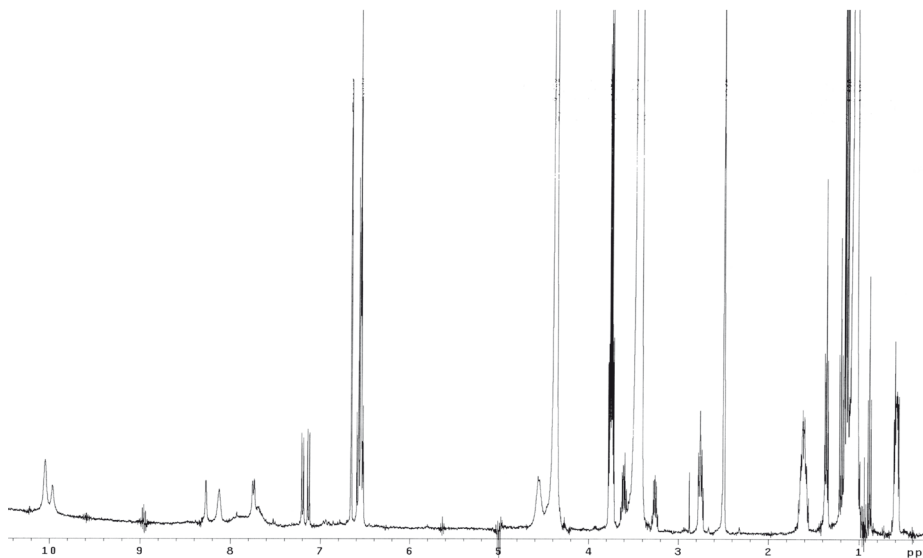
(APS:  $R_f=0,0$ ; detekce ninhydrinem – fialová skvrna)

**MS–pozitivní:** 633,2 [100 %, ( $\{\text{FITC-APS}\}+\text{Na}\}^+$ ); 221,8 [58 %, ( $\{\text{FITC-APS}\}+\text{Na}\}^+$ ); 175,8 [57 %, ( $\{\text{APS}\}-\text{EtO}\}^+$ ); 389,8 [28 %, ( $\{\text{FITC}\}^+$ ); 611,3 [25 %, ( $\{\text{FITC-APS}\}+\text{H}\}^+$ )

**MS–negativní:** 609,0 [100 %, ( $\{\text{FITC-APS}\}-\text{H}\}^-$ ); 610,0 [37 %, ( $\{\text{FITC-APS}\}^-$ ); 611,0 [16 %, ( $\{\text{FITC-APS}\}+\text{H}\}^-$ ); 387,6 [13 %, ( $\{\text{FITC-APS}\}-\text{H}\}^-$ )

$^1\text{H}$  NMR pro stanovení stupně konverze APS: příprava vzorku:

V dostatečně silném protiproudu Ar byl do předem Ar vypláchnuté NMR kyvety vpraven pomocí injekční stříkačky 1 ml reakční směsi. Kyveta byla vložena do velké zábrusové zkumavky připojené k vakuové lince a reakční směs byla ponechána odpařovat za sníženého tlaku. Směs nebyla odpařena úplně, (aby se předešlo případnému odpaření APS), nýbrž přibližně z 80%. Ke zbytku reakční směsi bylo v protiproudu Ar přidáno injekční stříkačkou cca 0,4 ml sušeného DMSO- $d_6$  ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 24 h) a kyveta byla uzavřena, utěsněna parafilmem a ihned bylo změřeno NMR spektrum (**Obr. 17**).



Obr. 17: Naměřené NMR spektrum reakční směsi.

### 4.4.3 Enkapsulace LSMO do křemičitého obalu

Přesné parametry vybraných syntéz, jejichž výsledky prezentuje tato práce jsou uvedeny v **Tab. 7**.

#### 4.4.3.1 Standardní příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>

Enkapsulace byla prováděna přesně podle postupu optimalizovaného O. Kamanem.<sup>[86-88]</sup> Postup se skládá ze tří plynule na sebe navazujících částí – aktivace a stabilizace LSMO, vlastní enkapsulace a nakonec frakcionace (separace částic vhodné velikosti) a promývání produktu.

##### *aktivace a stabilizace*

Navážka LSMO asi 130 mg přesně byla 15 min sonifikována v ledem chlazené ultrazvukové lázni v 20 ml vychlazené 1M HNO<sub>3</sub>. Suspenze byla následně odstředěna (6000 rpm/5 min) a supernatant odpipetován.

Pevný materiál byl dispergován v 20 ml vychlazené 0,1M kyseliny citronové a směs byla opět 15 min sonifikována v ultrazvukové lázni. Suspenze byla následně odstředěna (6000 rpm/5 min) a supernatant odpipetován. Pevný materiál byl promyt 20 ml destilované vody (odstředění 6000 rpm/30 min).

##### *vlastní enkapsulace*

Pevný zbytek byl dispergován v 10 ml vody alkalizované asi 4 kapkami koncentrovaného amoniaku a směs byla rozptylována ultrazvukovou sondou po dobu 30 min. Po ochlazení byla takto připravená suspenze přikapána do směsi 300 ml čistého EtOH, 70 ml destilované vody a 20 ml koncentrovaného amoniaku v 500 ml baňce. Baňka byla umístěna do ultrazvukové lázně temperované na 40 °C a současně bylo zavedeno mechanické míchadlo. Po přibližně 5 min míchání bylo v jedné dávce přidáno vypočítané množství TEOS (viz kapitola 4.4.3.6). Míchaná reakční směs byla ponechána v termostatované ultrazvukové lázni reagovat po dobu přibližně 20 h.

##### *frakcionace a promývání*

Surová reakční směs byla odstředěna (3000 rpm/15 min) a supernatant separován tak, aby se usazené částice (nežádoucí těžká frakce) co nejméně vířily. Částice byly ze supernatantu následně separovány odstředěním (6000 rpm/50 min). Částice byly promyty 1 × 90 ml čistého EtOH (odstředění 6000 rpm/50 min) a následně 4 × 90 ml vody (odstředění 6000 rpm/65 min). Suspenze byla ponechána stát přes noc při teplotě 4 °C a druhý den byl odpipetován supernatant obsahující

výsledný produkt. Ten byl nakonec převeden do 30 ml suspenze a dále byl uchováván při 4 °C.

Celkový výtěžek preparace, vztažený na množství Mn v reaktantu a produktu, se standardně pohyboval (dle analýzy obsahu Mn) v rozmezí 10–20 %.

#### **4.4.3.2 Standardní příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS**

Enkapsulace byla prováděna podle postupu optimalizovaného O. Kamanem.<sup>[86,87]</sup>

##### *stabilizace*

Navážka LSMO asi 200 mg přesně rozptýlená v 20 ml destilované vody byla 1 h sonifikována na ultrazvukovou sondou. Takto připravená suspenze byla poté pomalu přikapána do roztoku vypočteného množství PVP K25 (viz kap. 4.4.3.5) v 380 ml vody v kulaté 500 ml baňce umístěné v ultrazvukové lázni temperované na přibližně 25–30 °C. Směs byla ponechána v ultrazvukové lázni po dobu přibližně 20 h.

Poté byla suspenze odstředěna (7500 rpm/55 min) a supernatant odpipetován. Pevné zbytky v centrifugačních zkumavkách byly vypláchnuty malým množstvím čistého EtOH do jedné zkumavky tak, že celkový objem směsi činil 25 ml. Materiál byl důkladně rozptýlen sonifikací v ultrazvukové lázni, odstředěn (7500 rpm/60 min) a nakonec byl odpipetován ethanolický supernatant obsahující přebytek PVP.

##### *vlastní enkapsulace*

Pevný zbytek byl dispergován v 400 ml čistého EtOH. Baňka byla umístěna do ultrazvukové lázně temperované na 25–30 °C a současně bylo zavedeno mechanické míchadlo. Po přibližně 5 min míchání byla v jedné dávce přidána vypočtená množství TEOS a poté APS (viz kap. 4.4.3.6). Míchaná reakční směs byla ponechána v termostátované ultrazvukové lázni reagovat po dobu přibližně 24 h.

##### *promývání a frakcionace*

Surová reakční směs byla odstředěna (6000 rpm/45 min) a produkt byl promyt 4 × 90 ml čistého EtOH (odstředění 6000 rpm/45 min). Pevný zbytek byl dispergován v 200 ml EtOH v ultrazvukové lázni. Poté byl vzorek odstředěn (3000 rpm/15 min) a supernatant odpipetován. Separovaný supernatant byl ponechán stát přibližně 12 h při teplotě 4 °C a následně byla odpipetována suspenze bez sedimentovaného pevného materiálu. Suspenze byla odstředěna (6000 rpm/45 min) a

získaný pevný produkt byl nakonec dispergován v 50 ml EtOH. Výsledná suspenze produktu byla uchovávána při teplotě 4 °C.

Celkový výtěžek preparace, vztažený na množství Mn v reaktantu a produktu, se standardně pohyboval (dle analýzy obsahu Mn) v rozmezí 10–15 %.

#### **4.4.3.3 Příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)**

Příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) je modifikací syntézy LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS.

##### *stabilizace*

Tento krok je naprosto shodný se stabilizací při přípravě LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS.

##### *vlastní enkapsulace*

Pevný zbytek byl dispergován v 400 ml EtOH. Baňka byla umístěna do ultrazvukové lázně temperované na 40 °C a současně bylo zavedeno mechanické míchadlo. Po přibližně 5 min míchání bylo v jedné dávce přidáno vypočtené množství TEOS (viz kapitola 4.4.3.6). Z uzavřené baňky bylo do Ar vypláchnuté injekční stříkačky nasáto vypočítané množství čerstvě připravené reakční směsi konjugátu APS-FITC a nezreagovaného APS a FITC (příprava viz kap. 4.4.2.2) a tato směs byla vpravena do enkapsulační reakce. Reakční směs byla míchána v termostátované ultrazvukové lázni za nepřístupu světla po dobu přibližně 6–12 h.

##### *promývání a frakcionace*

Tento produkt standardně nebyl separován a neboť se většinou jednalo jen o meziproduct pro další enkapsulaci. Pro některá měření však bylo nutno tento materiál separovat.

Surová reakční směs byla odstředěna (6000 rpm/35 min) a produkt byl promyt 4 × 90 ml čistého EtOH (odstředění 6000 rpm/45 min). Pevný zbytek byl dispergován v 350 ml *i*PrOH.

#### **4.4.3.4 Příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>**

Preparace bezprostředně navazuje na přípravu LSMO@SiO<sub>2</sub>(F). Po uplynutí 6–12 h reakce, během které kondenzovala křemičitá fluorescenční vrstva LSMO@SiO<sub>2</sub>(F), bylo v jedné dávce přidáno do původní reakční směsi přesné množství dalšího TEOS (standardně stejné množství jako pro kondenzaci první vrstvy). Směs byla ponechána dále reagovat za stálého míchání mechanickou míchačkou v temperované ultrazvukové lázni za nepřístupu světla po dobu přibližně dalších 12 h.

#### *promývání a frakcionace*

Surová reakční směs byla odstředěna (6000 rpm/35 min) a produkt byl promyt  $4 \times 90$  ml čistého EtOH (odstředění 6000 rpm/45 min) a následně  $3 \times 90$  ml destilované vody. Pevný zbytek byl dipergován v 350 ml destilované vody a důkladně rozptýlen pomocí ultrazvukové lázně. Poté byl vzorek odstředěn (3000 rpm/15 min) a supernatant odpipetován. Separovaný supernatant byl ponechán stát přibližně 12 h při teplotě  $4^\circ\text{C}$  a následně byla odpipetována suspenze bez sedimentovaného pevného materiálu. Suspenze byla odstředěna (6000 rpm/45 min), pevný produkt byl nakonec dispergován v přibližně 45 ml převařené, Ar probublané, destilované vody. Pro zbavení nanočástic stop EtOH byla suspenze vložena na 1 h do vakuové sušárny temperované na  $35^\circ\text{C}$ . Pak byla odpipetována suspenze bez usazených částic a nakonec byla zředěna na objem 50 ml. Získaný produkt byl uchováván při  $4^\circ\text{C}$ .

Celkový výtěžek preparace, vztažený na množství Mn v reaktantu a produktu, se standardně pohyboval (dle analýzy obsahu Mn) v rozmezí 8–15 %.

#### **4.4.3.5 Výpočet množství PVP K25 pro stabilizaci LSMO**

Výpočet vychází z velmi zjednodušeného fyzikálního modelu. Předpokládá kulové nanočástice LSMO s průměrem  $d_{\text{XRD}}$ , které je nutno pro úspěšnou stabilizaci obalit vrstvou PVP. Byl zaveden empirický parametr  $N_{\text{PVP}}$ , jehož fyzikální význam lze popsat jako hustota pokrytí povrchu molekulami PVP, tj. kolik molekul PVP se nachází na jednotce povrchu částice. Pro syntézy byla použita hodnota  $N_{\text{PVP}} = 15$  molekul/nm<sup>2</sup>. Tato hodnota byla převzata z optimalizovaných postupů O. Kamana.<sup>[86,87]</sup>

Známe-li hustotu LSMO  $\rho_{\text{LSMO}}$  a střední velikost krystalitu  $d_{\text{XRD}}$ , snadno vypočítáme celkový povrch navážky LSMO a  $m_{\text{LSMO}}$  dále s pomocí parametru  $N_{\text{PVP}}$  i potřebné množství PVP K25 ( $M_w = 24\,000$  g/mol). Pro navážku PVP tedy platí

$$m_{\text{PVP}} = m_{\text{LSMO}} \frac{6M_w N_{\text{PVP}}}{d_{\text{XRD}} \rho_{\text{LSMO}} N_A} = m_{\text{LSMO}} \frac{K}{d_{\text{XRD}}}$$

kde  $N_A$  je Avogadrova konstanta. Vztah byl zjednodušen zahrnutím neměnných veličin do konstanty úměrnosti  $K = 367,6$  nm.

#### **4.4.3.6 Výpočet množství TEOS a APS pro enkapsulaci**

Výpočet množství TEOS vychází z modelu, který pro materiál LSMO@SiO<sub>2</sub> odvodil O. Kaman.<sup>[86,87]</sup> Odvozená kritériální rovnice ukazuje závislost tloušťky  $e$  křemičitého obalu částic LSMO@SiO<sub>2</sub>

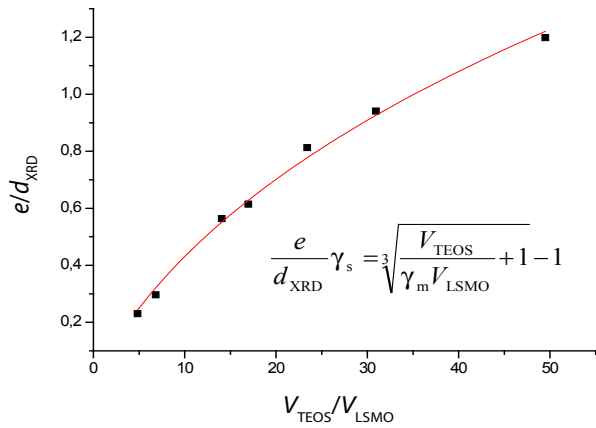


na objemu přidaného TEOS (Obr. 18). Závislost je možno přepsat do vztahu umožňujícího výpočet objemu TEOS potřebného k pokrytí LSMO částic o střední velikosti krystalitů  $d_{\text{XRD}}$  křemičitou vrstvou o síle  $e$

$$V_{\text{TEOS}} = \gamma_m V_{\text{LSMO}} \left( \left( \gamma_s \frac{e}{d_{\text{XRD}}} + 1 \right)^3 - 1 \right)$$

kde  $V_{\text{LSMO}}$  je objem LSMO spočítaný z navážky a hustoty LSMO získané z Rietveldovy analýzy difraktogramů

( $6508,6 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ) a  $\gamma_m = 5,91$  a  $\gamma_s = 0,91$  jsou parametry spočítané od O. Kamanem. Potřebné množství APS (včetně případného konjugátu APS-FITC) bylo odvozováno vždy z vypočítaného množství TEOS pro danou enkapsulaci. Molární poměr TEOS:APS při syntéze LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS byl 4:1, poměr TEOS:(APS + APS-FITC) při syntéze LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) byl 10:1.



Obr. 18: Graf závislosti poměru  $e/d_{\text{XRD}}$  na  $V_{\text{TEOS}}/V_{\text{LSMO}}$ . Experimentální body byly proloženy křivkou s parametry  $\gamma_s$  a  $\gamma_m$ . Převzato od O. Kamana.<sup>[86]</sup>

Tab. 7: Konkrétní parametry jednotlivých enkapsulací, jejichž výsledky jsou použity v této práci. První řádek označuje konkrétní připravovanou šarži, druhý řádek typ produktu. Uvedené syntézy byly provedeny postupy uvedenými v kapitole 4.4.3. Následující řádky již uvádí konkrétní parametry: navážka LSMO  $m_{\text{LSMO}}$ , navážka PVP  $m_{\text{PVP}}$  (je-li potřeba), objem TEOS použitý v prvním kroku  $V_{\text{TEOS-1}}$ , celkový objem použitého APS  $V_{\text{APS}}$  (včetně konjugátu APS-FITC), případná navážka FITC  $m_{\text{FITC}}$ , molární poměr TEOS:APS použitý v prvním kroku  $n_{\text{TEOS}}/n_{\text{APS}}$ , molární poměr FITC:APS použitý pro reakci FITC + APS  $n_{\text{TEOS}}/n_{\text{FITC}}$ , objem TEOS přidáný v druhém kroku  $V_{\text{TEOS-2}}$  a dále stanovenou koncentraci Mn ve výsledném produktu  $C_{\text{Mn}}$  a výtěžek reakce.

šarže	43.8	43.14A	43.14B	43.6	43.19	43.20	M595.4	M595.7	M595.10
produkt	LSMO@SiO <sub>2</sub> -APS	LSMO@SiO <sub>2</sub>	LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)	LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)@SiO <sub>2</sub>	LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)@SiO <sub>2</sub>	LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)@SiO <sub>2</sub>	LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)	LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)@SiO <sub>2</sub>	LSMO@SiO <sub>2</sub> (F)@SiO <sub>2</sub>
$m_{\text{LSMO}}$ [mg]	206,6	124,1	126,1	201,6	200,7	207,3	207,0	206,6	201,4
$m_{\text{PVP}}$ [g]	3,80	—	—	3,71	3,69	3,81	3,80	3,80	3,70
$V_{\text{TEOS-1}}$ [μl]	244	590	599	238	167	173	172	173	168
$V_{\text{APS}}$ [μl]	64,0	—	—	33,2	18,0	17,9	17,9	17,1	17,5
$m_{\text{FITC}}$ [mg]	—	—	—	62	39	39	39	37	38
$n_{\text{TEOS}}/n_{\text{APS}}$	4,0	—	—	7,5	9,7	10,1	10,0	10,5	10,0
$n_{\text{FITC}}/n_{\text{APS}}$	—	—	—	1,1	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
$V_{\text{TEOS-2}}$ [μl]	167	—	—	—	167	173	—	173	168
$C_{\text{Mn}}$ [mg/ml]	—	0,19	—	—	—	0,09	—	0,13	0,087
výtěžek [%]	—	19	—	—	—	9	—	13	9

#### 4.4.4 Příprava suspenzí nanočástic obalených polymery

Polymery byly rozpuštěny ve skleněných vialkách v daném množství vody tak, aby jejich hmotnostní koncentrace byla vždy stejná (viz Tab. 8). Pro dobré rozvolnění polymerních řetězců bylo rozpouštění prováděno po dobu 60 min v ultrazvukové lázni při teplotě cca 30 °C. Vypočítané množství roztoku polymeru pak bylo přidáno k zásobní suspenzi LSMO@SiO<sub>2</sub> (šarže 43.14) tak, aby výsledná koncentrace odpovídala poměru 40 mg polymeru/1 mg Mn/5 ml vody. Suspenze s polymery pak byly po dobu přibližně 4 h sonifikovány v ultrazvukové lázni při teplotě cca 30 °C ve skleněných vialkách. Získané suspenze pravděpodobně obsahovaly značné množství nadbytečného neadsorbovaného polymeru.

Pro oddělení přebytečného polymeru byly suspenze odstředěny (6000 rpm/45 min), supernatant odstraněn a nahrazen odpovídajícím množstvím destilované vody. Následně byly částice opět sonifikací rozptýleny.

Získané suspenze odstředěných a neodstředěných částic byly ponechány stát přibližně 12 h při laboratorní teplotě a následně byla změřena hydrodynamická velikost částic v jednotlivých šaržích.

Takto byla provedena první fáze experimentu se snadněji dostupnými částicemi LSMO@SiO<sub>2</sub>. V druhé fázi experimentu byla zde popsána příprava přesně zopakována s částicemi LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže M595.7).

Tab. 8: Tabulka připravených suspenzí LSMO@SiO<sub>2</sub> (L@S-P) a LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (L@SF-P) s polymery. Tabulka uvádí následující parametry suspenzí: molární hmotnost polymerů  $M_w$ , koncentrace polymeru v neodstředěné suspenzi nanočástic  $c_{\text{poly}}$ , hmotnostní poměr polymeru a LSMO v neodstředěné suspenzi  $w = m_{\text{poly}}/m_{\text{LSMO}}$ , podíl supernatantu odstraněného po centrifugaci  $x_{\text{sup}}$ , koncentrace polymeru v odstředěné suspenzi nanočástic  $c_{\text{poly-odstř}}$ , hmotnostní poměr polymeru a LSMO v neodstředěné suspenzi  $w_{\text{odstř}}$ , příslušnou koncentraci Mn  $c_{\text{Mn}}$  a hydrodynamickou velikost  $r_{\text{DLS}}$ . Koncentrace jsou vypočítány z navážky polymerů, případně použitého objemu suspenze částic o známé koncentraci LSMO, a jejich ředění.

částice	polymer	$M_w$ [10 <sup>3</sup> g/mol]	$c_{\text{poly}}$ [mg/ml]	$w$	$x_{\text{sup}}$	$c_{\text{poly-odstř}}$ [mg/ml]	$c_{\text{Mn}}$ [mg/ml]	$w_{\text{odstř}}$	$r_{\text{DLS}}$ [nm]
L@S-P	dextran	70	8,0	20,2	87%	1,05	0,095	2,65	80
L@S-P	PVP K25	24	8,0	20,2	93%	0,59	0,095	1,49	80
L@S-P	PVP K90	360	8,0	20,2	92%	0,60	0,095	1,52	120
L@S-P	PEG	10	7,3	16,9	91%	0,68	0,103	1,59	74
L@S-P	PVA	66	8,0	20,2	91%	0,74	0,095	1,88	80
L@SF-P	PVP K25	24	8,0	20,2	95%	0,40	0,095	1,01	—

## 5 Výsledky a diskuze

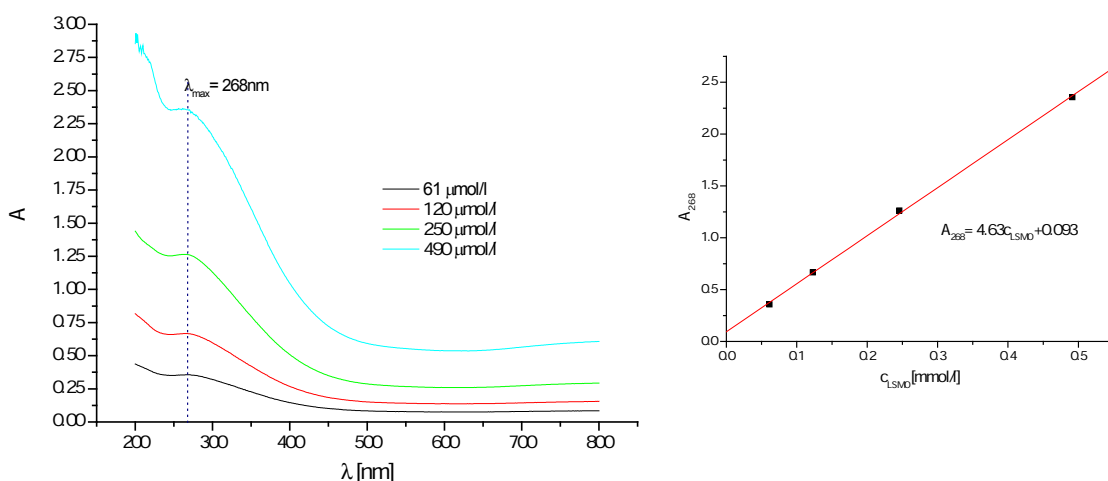
### 5.1 Příprava LSMO@SiO<sub>2</sub> a LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS

LSMO@SiO<sub>2</sub> a LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS byly připravovány podle postupů, které již dříve optimalizoval O. Kaman.<sup>[86–89]</sup> Příprava vycházela z nanočástic LSMO o střední velikosti krystalitů  $d_{\text{XRD}} = 20$  nm, které byly syntetizovány na FZÚ AV ČR. Morfologie a vlastnosti připravených materiálů byly ve shodě s částicemi připravenými O. Kamanem (Obr. 12, 15). Při přípravě LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS byl používán stejně jako v pokusech O. Kamana poměr látkových množství TEOS : APS 4 : 1. V rámci této práce byly připravovány LSMO@SiO<sub>2</sub> a LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS pouze jako referenční materiály a prekurzory pro další experimenty. Výtěžky obou preparací se pohybovaly v rozmezí 10–20 % a závisely zejména na provedení frakční centrifugace.

Detaily o množství použitého TEOS, případně APS, jsou uvedeny v Tab. 7.

### 5.2 Optické vlastnosti LSMO@SiO<sub>2</sub>

Vlastní LSMO je černý a všechny materiály odvozené od LSMO mají stejně jako mateřský materiál značnou absorpci světla. Koncentrovanější suspenze jak LSMO@SiO<sub>2</sub> ve vodě, tak LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS v EtOH jsou černé a neprůhledné. I všechny produkty připravené v rámci této práce byly ve větší koncentraci na pohled černé a neprůhledné (Obr. 37). Naměřená UV-Vis absorpční spektra LSMO@SiO<sub>2</sub> prokazují značnou absorpci daného materiálu v celém rozsahu měřených vlnových délek (200–800 nm) (Obr. 19). Absorpce světla je významně vyšší při vlnov-



Obr. 19: Vlevo absorpční spektra LSMO@SiO<sub>2</sub> (šarže 34.20 vyrobená O. Kamanem) při různých zředěních. V popisech jednotlivých křivek je vždy uvedena koncentrace LSMO v suspenzi. Graf vpravo znázorňuje lineární závislost souhrnné absorpance při 268 nm  $A_{268}$  na koncentraci LSMO  $c_{\text{LSMO}}$ .

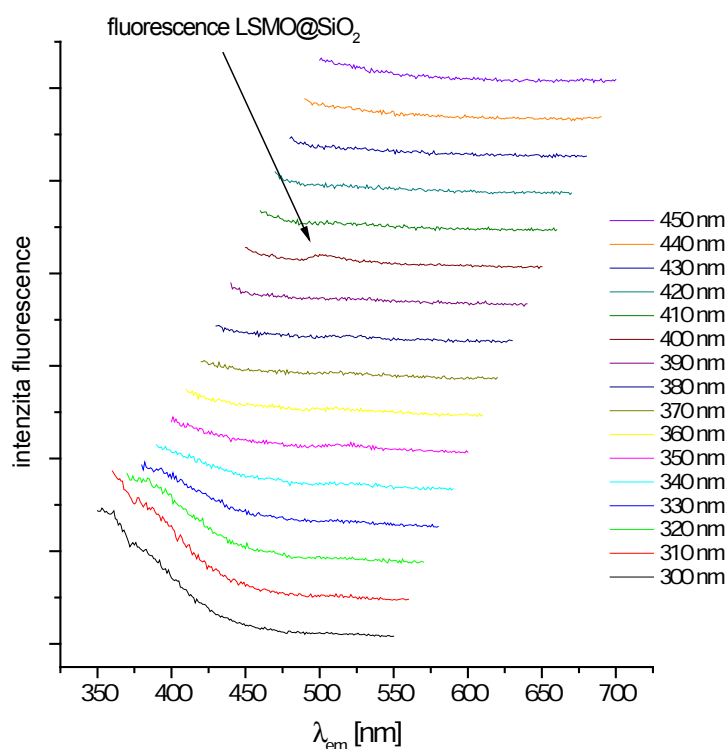
vých délkách nižších než přibližně 500 nm. Rozptyl světla je nepřímo úměrný pro zjednodušení  $\lambda^4$ . Při nízkých  $\lambda$  může tedy již mít značný vliv na naměřenou absorpci světla. Nejvýhodnějšími potenciálními fluorescenčními značkami budou tedy takové, jež poskytují excitační a emisní maxima v oblasti vlnových délek od 500 nm výše.

Materiál má absorpční maximum  $\lambda_{\max} = 268$  nm. Bylo ověřeno, že při této  $\lambda_{\max}$  v rozsahu koncentrací LSMO přibližně 0,06–0,5 mmol /l platí přímá úměrnost souhrnné absorbance na koncentraci LSMO (Obr. 19).

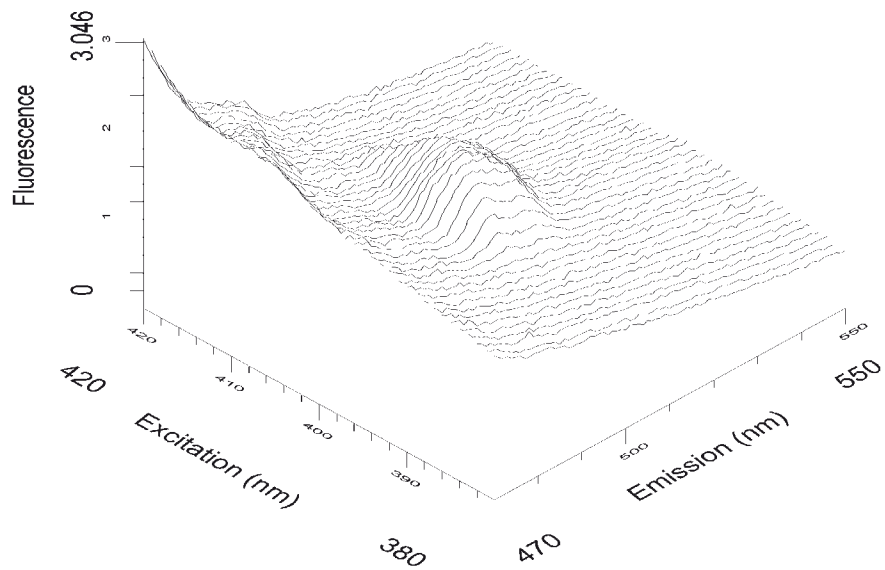
Byla detailně proměřena excitačně-emisní spektra LSMO (ve formě LSMO@SiO<sub>2</sub> a LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS). Byla odhalena vlastní slabá fluorescence materiálu. Vlnová délka excitačního maxima  $\lambda_{\text{exc}}$  je přibližně 400 nm, vlnová délka emisního maxima  $\lambda_{\text{em}}$  přibližně 500 nm (Obr. 20a,b, 21).

Zavedením aminopropylových skupin do křemičité vrstvy nebyly, dle očekávání, optické vlastnosti materiálu, nikterak ovlivněny.

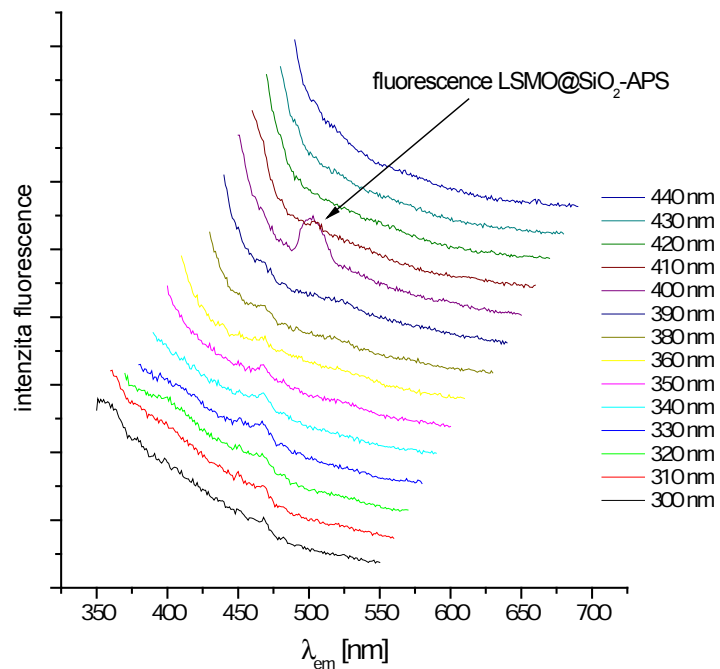
Tato luminiscence je velmi slabá a byla pozorována pouze při téměř maximálním technicky možném napětí na fotonásobiči (maximální citlivosti detektoru) luminiscenčního spektromet-



Obr. 20a: Emisní spektra LSMO@SiO<sub>2</sub> (šarže 34.20 vyrobená O. Kamanem) ve vodné suspenzi při různých  $\lambda_{\text{exc}}$ . Jedná se o nezředěnou suspenzi s koncentrací LSMO  $c_{\text{LSMO}} = 2,5$  mmol/l. V popisech jednotlivých křivek je vždy uvedena příslušná  $\lambda_{\text{exc}}$ . Napětí na detektoru bylo 1200 V, zjištěná fluorescence je tedy velmi málo intenzivní.



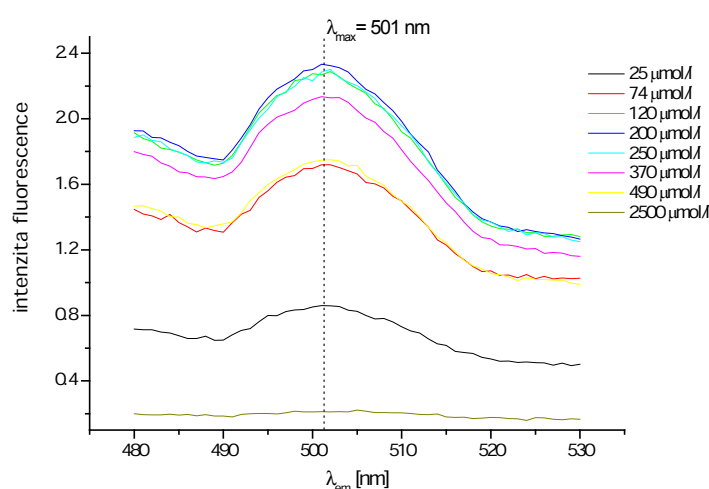
Obr. 20b: Excitačně–emisní spektrum zředěného LSMO@SiO<sub>2</sub> (šarže 34.20 vyrobená O. Kamanem) ve vodné suspenzi. Jedná se o sadu emisních spekter s  $\lambda_{\text{exc}}$  lišícími se o 1 nm. Napětí na detektoru bylo 1200 V, zjištěná fluorescence je tedy velmi málo intenzivní.



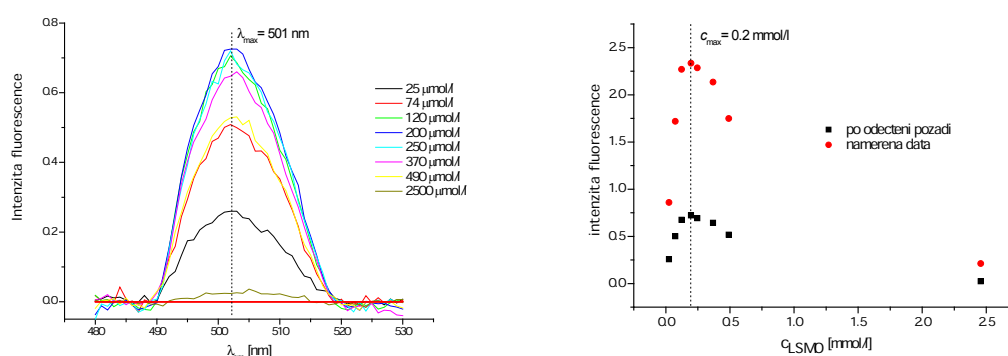
Obr. 21: Emisní spektra LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS (šarže 43.8) v EtOH suspenzi při různých  $\lambda_{\text{exc}}$ . Jedná se o nezředěnou suspenzi s koncentrací LSMO  $c_{\text{LSMO}} = 2,5$  mmol/l. V popisech jednotlivých křivek je vždy uvedena příslušná  $\lambda_{\text{exc}}$ . Napětí na detektoru bylo 1200 V, zjištěná fluorescence je tedy velmi málo intenzivní.

ru. Taková intenzita luminiscence však nedostačuje pro pozorování suspenze ve fluorescenčním mikroskopu, což bylo prakticky ověřeno při měření s různými dostupnými světelnými filtry. Pro případ, že by kombinace vlnových délek emisního a excitačního maxima materiálu byla nevhodná z hlediska běžně používaných světelných filtrů fluorescenčních mikroskopů, byl učiněn pokus vizualizovat LSMO@SiO<sub>2</sub> konfokálním mikroskopem, jenž pro excitaci používá lasery různých vlnových délek a umožňuje detekovat libovolnou vlnovou délku emise. Ani konfokálním mikroskopem ( $\lambda_{\text{ex.laser}} = 405 \text{ nm}$ ) se však nepodařilo částice LSMO vizualizovat.

Bylo prokázáno, že luminiscence materiálu je závislá na koncentraci (Obr. 22). Závislost vykazuje maximum při koncentraci LSMO přibližně 0,2 mmol/l (Obr. 23).



Obr. 22: Emisní spektra ( $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ ) suspenzí LSMO@SiO<sub>2</sub> (šarže 34.20 vyrobená O. Kamanem) různých koncentrací. V legendě je vždy uvedena příslušná koncentrace LSMO. Napětí na detektoru bylo 1200 V.

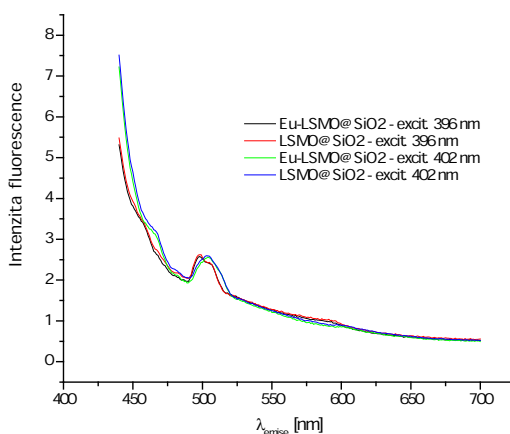


Obr. 23: Vlevo emisní spektra ( $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ ) suspenzí LSMO@SiO<sub>2</sub> (šarže 34.20 vyrobená O. Kamanem) s různou koncentrací po odečtení rozptylového pozadí (lineární interpolace v rozsahu 490–520 nm). V legendě je vždy uvedena příslušná koncentrace LSMO. Vpravo pak závislost intenzity fluorescence při  $\lambda_{\text{max}} = 501 \text{ nm}$  na koncentraci LSMO, pro porovnání zobrazeny hodnoty s i bez odečteného pozadí. Obě závislosti ukazují maximum při koncentraci LSMO cca 0,2 mmol/l. Napětí na detektoru bylo 1200 V.

### 5.3 Pokus o zvýšení fluorescence LSMO dopováním europiem

Sloučeniny  $\text{Eu}^{3+}$  jsou standardně využívány jako fluorescenční činidla. Protože byla nalezena slabá fluorescence částic LSMO, bylo předpokládáno, že by dopování LSMO europiem mohlo fluorescenční vlastnosti magnetického jádra zlepšit. Syntézu fluorescenčních manganitových nanočástic perovskitové struktury dopovaných Eu popisuje také Alemi *et al.*<sup>[96]</sup> Jeho produkt vykazoval excitaci při  $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$  a emisní maxima při 530, 547 a 611 nm.

O. Kaman připravil dvě frakce Eu-dopovaného manganitu (Eu-LSMO) se složením  $\text{La}_{0,74}\text{Eu}_{0,01}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$  a  $\text{La}_{0,65}\text{Eu}_{0,10}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$ . Materiál obohacený 1 % Eu byl také enkapsulován do  $\text{SiO}_2$  standardní citrátovou metodou a byl tedy plně srovnatelný se standardním  $\text{LSMO@SiO}_2$ . Autor této práce změřil optické charakteristiky produktů. Měřením UV-Vis a fluorescenčních spekter materiálu bylo zjištěno, že dopování LSMO europiem nemá na luminescenční vlastnosti žádný pozorovatelný efekt. Stejně jako nedopovaný materiál vykazovaly oba připravené  $\text{Eu-LSMO@SiO}_2$  jen velmi slabou luminiscenci s vlnovou délkou excitačního maxima  $\lambda_{\text{exc}} \sim 400 \text{ nm}$ , vlnová délka emisního maxima  $\lambda_{\text{em}} \sim 500 \text{ nm}$  (Obr. 24). Ani tento produkt se nepodařilo pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem. Podobnost v luminescenčních vlastnostech europiem dopovaného manganitu, jenž připravil Alemi *et al.*<sup>[96]</sup> a námi připraveného materiálu tak nebyla nalezena.



Obr. 24: Emisní spektra  $\text{LSMO@SiO}_2$  a  $\text{Eu-LSMO@SiO}_2$ ,  $\lambda_{\text{ex}}$  uvedeny v legendě. Obě suspenze zředěny na přibližně stejnou koncentraci. Napětí na detektoru bylo 1200 V, fluorescence je tedy velmi slabá.

Z uvedených měření vyplývá, že dopování větším množstvím Eu by pravděpodobně nepřineslo větší intenzitu fluorescence, naopak by větší množství Eu v perovskitové struktuře by pravděpodobně vedlo k nežádoucí změně magnetických vlastností. Iontový poloměr  $\text{Eu}^{3+}$  je v porovnání s  $\text{La}^{3+}$  výrazně menší<sup>[97]</sup> a nahrazení velkého podílu  $\text{La}^{3+}$  za  $\text{Eu}^{3+}$  v perovskitové struktuře povede ke snížení valenčního úhlu Mn–O–Mn a tím k porušení dvojité výměny elektronů. Důsledkem bude

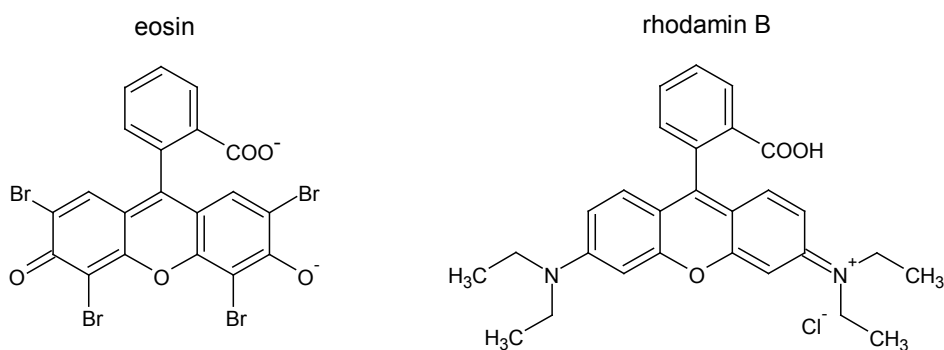


postupná destabilizace feromagnetického uspořádání. Při kompletním nahrazení La za Eu by se materiál stal feromagnetickým polovodičem s velmi nízkou  $T_C$ . Srovnatelné europité manganity  $\text{Eu}_{0,2}\text{Sr}_{0,8}\text{MnO}_3$  a  $\text{Eu}_{0,3}\text{Sr}_{0,7}\text{MnO}_3$  jsou feromagnetickými polovodiči s  $T_C \sim 120$  respektive  $160 \text{ K}$ .<sup>[98]</sup>

## 5.4 Pokus o nekovalentní navázání fluorescenčního barviva do vrstvy amorfního $\text{SiO}_2$

Byl učiněn pokus o nekovalentní navázání fluorescenční značky do vrstvy  $\text{SiO}_2$ . Pokud jsou při kondenzaci  $\text{SiO}_2$  v reakčním prostředí přítomny molekuly barviva, lze předpokládat, že jisté množství těchto molekul může zůstat uvězněno či absorbováno v dutinách vznikajícího amorfního  $\text{SiO}_2$ . Pokud by molekuly barviva zároveň měly kladný náboj, byla by jejich adsorpce k záporně nabitému  $\text{SiO}_2$  zesílena elektrostaticky.

Pro pokus byla tedy vybrána dvě fluorescenční barviva, záporně nabitý eosin a kladně nabitý rhodamin B (Obr. 25). Eosin byl zvolen, protože jde o derivát fluoresceinu (použitý v dalších kapitolách), ale jeho fluorescence je oproti fluoresceinu posunuta do červené oblasti<sup>[64]</sup> a proto je méně absorbována LSMO jádrem (viz kap. 5.2).



Obr. 25: Struktury rhodaminu B a eosinu

Vlastní příprava probíhala analogicky k přípravě standardního  $\text{LSMO@SiO}_2$ . V reakční směsi bylo rozpuštěno fluorescenční barvivo. Morfologie (TEM), hydrodynamická velikost i koloidní stabilita obou připravených materiálů se podle očekávání nelišily od standardního  $\text{LSMO@SiO}_2$  připraveného za obdobných podmínek.

Byla změřena luminiscenční spektra, jenž se nelišila od luminiscenčních spekter nemodifikovaného  $\text{LSMO@SiO}_2$ . V emisních ani excitačních spektrech produktů nebyly nalezeny žádné známky fluorescence příslušného barviva ani zesílení vlastní fluorescence LSMO. I přesto byl učiněn pokus pozorovat vzorky pod fluorescenčním mikroskopem s využitím dostupných světelných filtrů. Vzorky se však nepodařilo vizualizovat. Lze proto oprávněně tvrdit, že ani jedno z použitých

barviv nebylo ve vrstvě SiO<sub>2</sub> zachyceno v relevantním množství. Molekuly barviv, pokud vůbec ve vrstvě SiO<sub>2</sub> byly zachyceny, byly promýváním zcela odstraněny. Ani interakce mezi bazickým rhodaminem a kyselým SiO<sub>2</sub> nepřispěla k jeho zachycení.

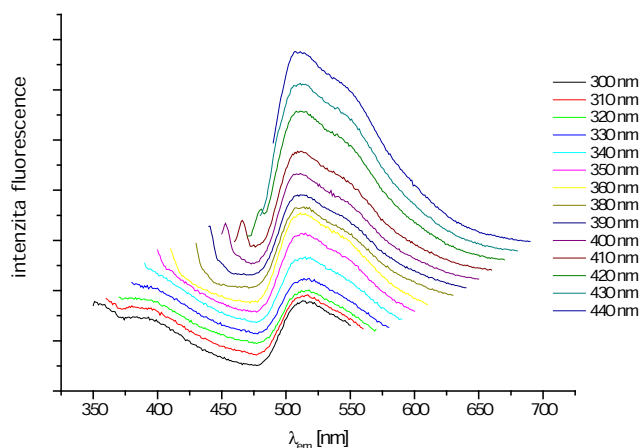
Nekovalentní navázání fluorescenčního barviva na částice SiO<sub>2</sub> však popisuje řada autorů. Matsumoto *et al.*<sup>[99]</sup> zpracoval podrobnou studii přípravy fluorescenčními barvivy značených mikročástic SiO<sub>2</sub> připravovaných emulzní metodou. Barviva byla rozpuštěna ve vodné fázi a ta byla následně použita ke kondenzaci SiO<sub>2</sub>. V částicích byla zachycena pouze bazická barviva (rhodamin B, krystalová violet, thioflavin) a barviva kyselá a nenabitá zachycena nebyla (fluorescein, eosin, erythrosin). Ačkoliv podle uvedených výsledků by měl být rhodamin v SiO<sub>2</sub> zachycen, toto navázání se dosáhnout nepodařilo. Důvodem může být použití TEOS místo methyltrimethoxysilanu, kteří použili autoři zmíněné práce pro kondenzaci SiO<sub>2</sub>. Bele *et al.*<sup>[100]</sup> však popisuje úspěšnou přípravu přibližně mikrometrových částic SiO<sub>2</sub>, značených rhodaminem 6G, Stöberovou metodou hydrolyzy TEOS, tedy velmi podobně jako v této práci. Podobně Heitsch *et al.*<sup>[101]</sup> enkapsuloval částice FePt do vrstvy SiO<sub>2</sub> mikroemulzní metodou. Vrstvu SiO<sub>2</sub> úspěšně označil pouhým přidáním Rubpy<sup>2+</sup> do kondenzační reakce.

Inkorporace kladně nabitých fluorescenčních barviv do SiO<sub>2</sub> je tedy ověřenou technikou. Množství zachyceného barviva však za podmínek provedených pokusů pravděpodobně nebylo dostatečné, aby příslušná fluorescence překonala značnou absorpci LSMO.

## 5.5 Navázání FITC na povrchové aminoskupiny LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS

Využití povrchových aminoskupin LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS bylo potenciálně velmi jednoduchým přístupem pro získání fluorescenčního materiálu. Částice LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS byly proto v bezvodém EtOH konjugovány s výrazným přebytkem FITC. Produkt však netvořil stabilní suspenze ve vodě a během několika minut po rozptýlení ve vodě se kompletně vysrážel. Produkt tvořil relativně stabilní suspenzi v EtOH. Důvodem pro takové chování je, že konjugací s FITC byly na povrch částic ve značné koncentraci navázány hydrofobní molekuly fluoresceinu. Výsledné nanočástice pak mají ve vodném prostředí značnou tendenci k aglomeraci.

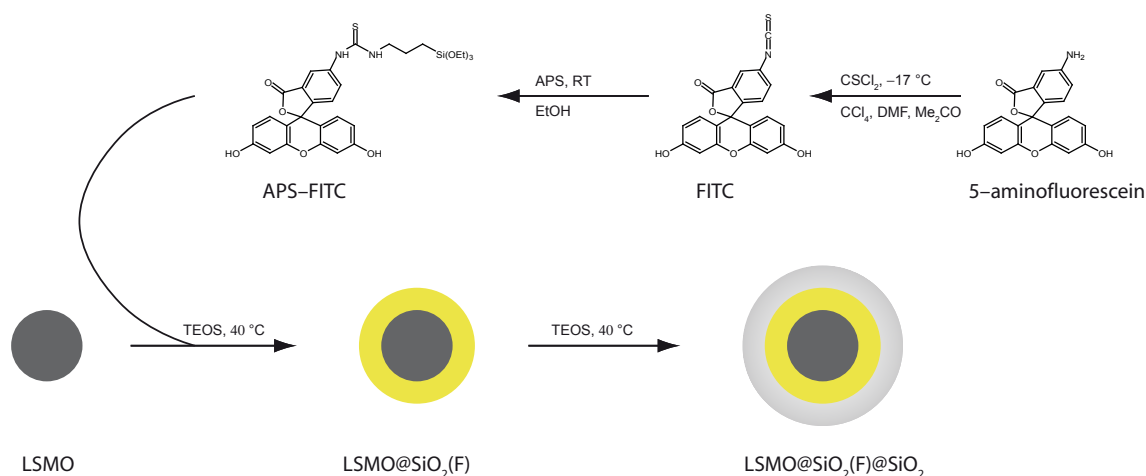
Úspěšné navázání fluorescenčních skupin bylo prokázáno pomocí fluorescenční spektroskopie. Stejně jako LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> vykazoval produkt emisi záření odpovídající emisi fluoresceinových skupin (viz Obr. 26). Produkt byl pozorovatelný fluorescenčním mikroskopem.



Obr. 26: Emisní spektra LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS s povrchově vázaným FITC v EtOH suspenzi při různých  $\lambda_{exc}$ . Jedná se o zředěnou suspenzi. V popisech jednotlivých křivek je vždy uvedena příslušná  $\lambda_{exc}$ . Napětí na detektoru bylo 1200 V.

## 5.6 Příprava a charakterizace LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>

Pouze nejkomplicovanější z původně navržených strategií přípravy fluorescenčně označených nanočástic LSMO vedla k materiálu požadovaných vlastností. Jako fluorescenční značka s reaktivní skupinou byl vzhledem ke snadné dostupnosti a relativně vhodným fluorescenčním vlastnostem zvolen FITC. Syntéza finálního produktu se skládala z několika kroků. Nejprve byl z fluoresceinaminu připraven FITC. Konjugací FITC s APS vznikl fluorescenční prekurzor APS-FITC pro kondenzaci křemičité vrstvy. Nanočástice LSMO pak byly obaleny vrstvou fluorescenčně označeného amorfního SiO<sub>2</sub>. Vzniklé nanočástice LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) však neposkytovaly stabilní suspenze ve vodě a tak je bylo nutno obalit další vrstvou čistého SiO<sub>2</sub> (Obr. 27). Takto získané částice již poskytovaly ve vodě stabilní suspenze.



Obr. 27: Schéma přípravy LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>

### 5.6.1 Příprava FITC

Triviální reakce spočívající v transformaci aminoskupiny na isothiokyanátovou skupinu byla prováděna podle československého patentu.<sup>[95]</sup> Výtěžky reakce se při opakovaných syntézách pohybují v přijatelném rozmezí 80–90 %. Hlavní příčinou ztrát produktu je značná adheze produktu v organické fázi k jakémukoliv povrchu. Navíc, malá část jemné suspenze produktu prochází i přes fritu S4.

### 5.6.2 Konjugace APS + FITC

Reakce byla prováděna v bezvodém prostředí, aby se zabránilo hydrolyze triethoxysilanové skupiny v reaktantu i produktu a zároveň aby nedocházelo k nežádoucí protonizaci aminové skupiny APS, která by negativně ovlivnila konjugaci s isothiokyanátovou skupinou FITC. Jako rozpouštědlo byl zvolen EtOH, protože i následná enkapsulace probíhá v prostředí EtOH a tak použití surové reakční směsi nezanese nežádoucí příměs (další rozpouštědlo) do enkapsulace.

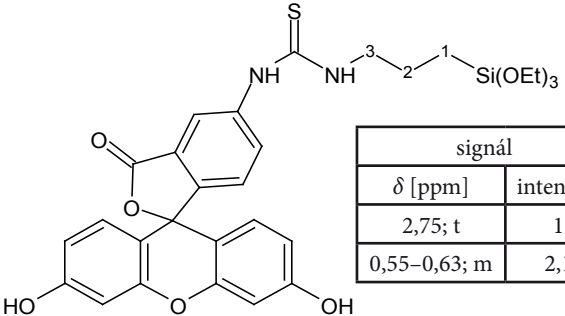
Reakce byla monitorována TLC a MS. MS potvrdilo přítomnost žádaného produktu. Na TLC však i po více než 20 h byly skvrny obou reaktantů a produktu podobných velikostí. Prodloužením reakční doby se již konverze APS významně neměnila, stejně jako přidáním většího nadbytku FITC. Na konverzi nemělo zásadní vliv ani krátkodobé (v řádu několika hodin) zvýšení teploty až na přibližně 45 °C.

Pro kondenzaci fluorescenční SiO<sub>2</sub> vrstvy, jež následovala bezprostředně po nyní zmiňované reakci, byla tedy používána surová, nijak nezpracovaná reakční směs. Přestože konverze APS na APS–FITC nebyla ohromující, výsledná reakční směs poskytovala po enkapsulaci dostatečně fluorescenční produkt. Konjugace nebyla proto dále optimalizována a nebyl separován čistý produkt (náročná práce za inertních podmínek).

Stupeň konverze byl zjištěn pomocí <sup>1</sup>H NMR částečně odpařené reakční směsi. Spektrum (**Obr. 17**) obsahovalo značné množství signálů, které příslušely nezreagovaným APS a FITC, konjugátu APS–FITC, zbylému EtOH a DMSO obsaženém DMSO–d<sup>6</sup>. Pro účely stanovení stupně konverze nebylo nutné spektrum kompletně interpretovat. S pomocí <sup>1</sup>H NMR spekter čistého APS a směsi APS + EtOH změřených za stejných podmínek byly ve spektru nalezeny a přiřazeny signály příslušející vodíkovým atomům navázaným na atomy uhlíku č. 1 a 3 (**Tab. 9**). Z poměru jejich intenzit byl stanoven stupeň konverze APS přibližně 50 % a tedy poměr APS–FITC:APS přibližně 1 : 1.

Obdobné konjugace APS s isothiokyanátovými deriváty fluorescenčních barev použité pro přípravu fluorescenčních nanočástic SiO<sub>2</sub> lze často najít v odborné literatuře. Reakce jsou běžně prová-

Tab. 9: Stanovení stupně konverze APS.



signál		přiřazení		
$\delta$ [ppm]	intenzita	poloha $^1\text{H}$	počet $^1\text{H}$	sloučenina
2,75; t	1	3	2	APS-FITC
0,55–0,63; m	2,1	1	2	APS-FITC, APS

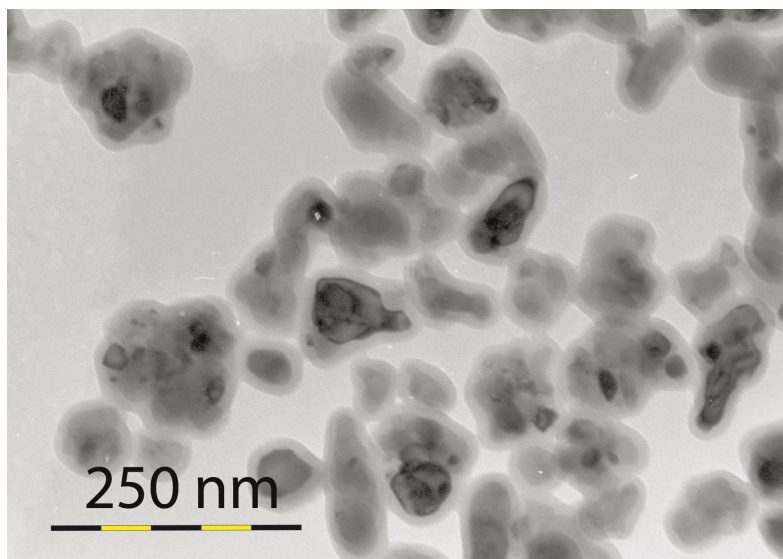
- poměr APS:APS-FITC: 52 : 48
- stupeň konverze APS: 48 %

děny v bezvodých rozpouštědlech (EtOH, cyklohexanol), většinou při laboratorní teplotě po dobu přibližně 24 h. Analýzy produktů této reakce však nejsou uváděny, otázka konverze APS nebývá řešena. Důvodem je, že jde vždy o práci s mnohonásobným nadbytkem APS oproti FITC nebo eosin-isothiokyanátu (uváděné molární poměry se pohybují v rozmezí přibližně 1 : 10<sup>[101–103]</sup>– 1 : 300<sup>[104]</sup>). V takto uspořádaných reakcích (velký nadbytek primárních aminoskupin) je konverze isothiokyanátů pravděpodobně velmi dobrá. V této práci byla však vzhledem ke značné absorpci světla perovskitovými jádry snaha navázat do nanočástice dostatečné množství fluorescenčního barviva, které by zajistilo dostatečnou intenzitu emitovaného záření, při co nejmenším množství volného APS, a proto byla snaha maximálně využít dostupné aminoskupiny.

### 5.6.3 Příprava a charakterizace LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)

Příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) částečně vycházela z O. Kamanem již optimalizované syntézy LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS.<sup>[86,87]</sup> Uvedená syntéza byla částečně modifikována. Ke kondenzaci vrstvy fluorescenčně derivatizovaného SiO<sub>2</sub> byla použita surová reakční směs předchozí reakce APS + FITC, obsahující konjugát APS-FITC a nezreagované FITC a APS, s TEOS. Reakce byla prováděna při 40 °C. Při této teplotě poskytovala reakce produkty s lepší morfologií, než při teplotě 30 °C, při které probíhá standardní příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS. Aby bylo možno kontrolovat tloušťku vrstvy SiO<sub>2</sub> a její vlastnosti, byla reakce prováděna s přesným množstvím TEOS a celkového APS (APS a konjugát APS-FITC). Oproti standardní přípravě LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS, kde molární poměr TEOS:APS je 4 : 1, byl pro tuto reakci zvolen poměr 10 : 1. Vzhledem k přibližně 50 % konverzi APS na APS-FITC byl molární poměr Si: fluorescenční značka, stejně jako poměr Si: aminoskupiny, přibližně 22 : 1.

Podle TEM snímků tvoří takto připravený LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) dobře oddělené jednotlivé částice



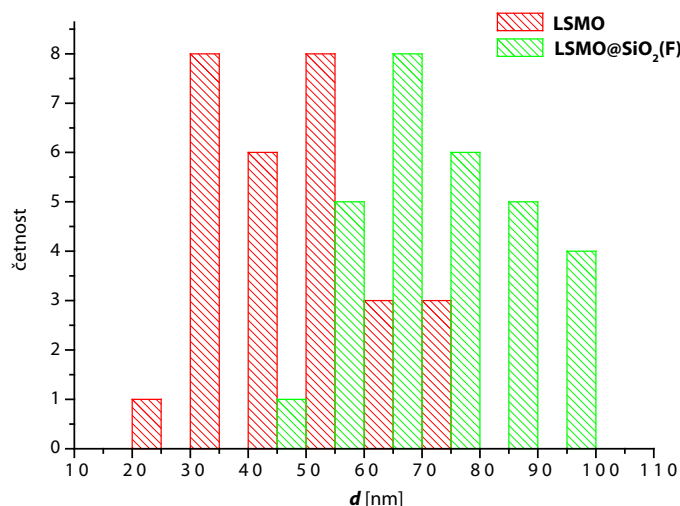
Obr. 28: TEM snímek LSMO@SiO<sub>2</sub>(F). Jedná se o šarži 43.6 s nepatrně silnější křemičitou vrstvou, než měl standardní meziprodukt LSMO@SiO<sub>2</sub>(F).

pokryté křemičitou slupkou jednotné tloušťky (Obr. 28).

Byla provedena jednoduchá obrazová analýza TEM snímků standardně připraveného meziproduktu LSMO@SiO<sub>2</sub>(F). S pomocí kulové aproximace naměřených částic byly stanoveny průměrné velikosti komplexních nanočástic i magnetických jader. Průměr magnetických jader byl 50 (14) nm, průměr celých částic pak 71 (14) nm. Síla křemičité vrstvy byla 10,6 (1,0) nm (Tab. 10, Obr. 29) a tato hodnota byla potvrzena ještě přímým měřením na mikroskopickém snímku. Vzhledem k nedostatku vhodných snímků bylo změřeno jen omezené množství částic (29) a tak průměrné rozměry a distribuce velikostí mohou být poněkud zkreslené, údaj o síle křemičité vrstvy by však neměl příliš utrpět.

Tab 10: Statistické vyhodnocení obrazové analýzy LSMO@SiO<sub>2</sub>(F). Jedná se o šarži 43.19, standardní meziprodukt pro další enkapsulaci. Data v jednotlivých řádcích představují změřenou plochu částic (*S*), cirkularitu (*C*), průměr částice spočítaný z kulové aproximace (*d*) a tloušťku vrstvy SiO<sub>2</sub> (*e*). Index L@SF označuje částice LSMO@SiO<sub>2</sub>(F), index LSMO pak příslušná jádra LSMO. Ve sloupcích je postupně aritmetický průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota a median souboru měřených částic.

	průměr	sm. odch. (±)	min	max	median
$S_{\text{LSMO}}$ [nm <sup>2</sup> ]	2115	1146	705	5021	1845
$C_{\text{LSMO}}$	0,76	0,08	0,57	0,89	0,76
$d_{\text{LSMO}}$ [nm]	50,2	13,6	30,0	80,0	48,5
$S_{\text{L@SF}}$ [nm <sup>2</sup> ]	4144	1630	1833	7474	3857
$C_{\text{L@SF}}$	0,83	0,05	0,70	0,90	0,84
$d_{\text{L@SF}}$ [nm]	71,3	14,1	48,3	97,6	70,1
$e_{\text{L@SF}}$ [nm]	10,6	1,0	8,5	12,2	10,9



Obr. 29: Distribuce velikostí částic LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) a příslušných magnetických jader LSMO získaná obrazovou analýzou. Vzhled je negativně ovlivněn malým souborem měřených částic (29). Jedná se o šarži 43.19.

LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) netvoří stabilní vodné suspenze za neutrálního pH. Po dispergaci částic ve vodě docházelo během již několika hodin k aglomeraci částic a jejich vysrážení a také k jisté degradaci křemičité slupky, jež se projevovala žlutým zbarvením supernatantu od uvolněných molekul fluoresceinových derivátů. Aglomerace ve vodných prostředích je důsledkem zejména přítomnosti kladně nabitých aminoskupin a hydrofobních fluoresceinových skupin na povrchu částice.

Přítomnost povrchových aminoskupin dokazuje naměřená titrační křivka závislosti povrchového  $\zeta$ -potenciálu na pH (Obr. 35). Částice LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) mají  $IEP=5,5$ , zatímco částice LSMO@SiO<sub>2</sub> mají  $IEP$  výrazně nižší a LSMO@SiO<sub>2</sub>-APS naopak poněkud vyšší. Koncentrace volných aminoskupin tedy odpovídá poměru TEOS:APS v reakční směsi; se zvyšujícím se podílem APS stoupá  $IEP$  výsledného produktu.  $\zeta$ -potenciál LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) při pH=7 dosahuje  $-20$  mV. Snižováním  $\zeta$ -potenciálu částic za neutrálního pH se snižují elektrostatické odpuzování jednotlivých částic a tím i koloidní stabilita za daného pH. Aglomeraci navíc výrazně podporují hydrofobní fluoresceinové skupiny. Částice neposkytovaly stabilní suspenze ani v EtOH, ke kompletnímu vysrážení produktu docházelo během několika hodin. Relativně stabilní suspenze byly získány dispergací částic v *i*PrOH.

V naměřených DRIFTS spektrech vysušeného produktu (Obr. 36) jasně dominují pásy příslušející vibracím amorfního SiO<sub>2</sub>: signály 1103 a 804 cm<sup>-1</sup> přísluší asymetrické a symetrické stretching vibraci Si-O-Si, maxima 946 a 472 cm<sup>-1</sup> přísluší bending vibracím Si-O-H a Si-O-Si. Je také velmi dobře patrný pás 620 cm<sup>-1</sup> příslušející LSMO, jehož výskyt souvisí s poměrně malou tloušťkou křemičité vrstvy. Ve spektru lze též pozorovat poněkud slabší pásy ukazující na přítomnost aminoskupin a methylenových skupin 3-aminopropylové skupiny: pás při 1475 cm<sup>-1</sup>

odpovídá symetrické deformační vibraci protonizovaných aminoskupin a pás při  $1384\text{ cm}^{-1}$ , který je možno přiřadit nůžkové vibraci methylenových skupin. Naměřené spektrum se tak tedy velmi podobá spektru standardně připravovaného  $\text{LSMO@SiO}_2\text{-APS}$ ,<sup>[86]</sup> v němž jsou ale díky vyššímu obsahu lépe patrné vibrační projevy 3-aminopropylové skupiny. Vibrace příslušející fluoresceinovým skupinám pozorovány nebyly, přítomnost fluoresceinových skupin však dokazují optické vlastnosti zmíněné dále.

Částice amorfního  $\text{SiO}_2$  fluorescenčně označené pomocí APS-FITC jsou v literatuře poměrně často popisované. APS-FITC je vždy směsí APS-FITC a značného množství přebytkového APS. Běžně jsou popisovány materiály tvořící stabilní koloidy. Pokud jsou zmiňovány ve vodě stabilní suspenze, bývá poměr TEOS:APS používáný k reakci mnohem větší než v této práci, aby byl dostatečně velký příslušný  $\zeta$ -potenciál. Liu *et al.*<sup>[104]</sup> v souladu s tímto faktem pozoroval klesající koloidní stabilitu FITC značených  $\text{SiO}_2$  nanočástic se zvyšujícím se podílem APS v reakční směsi. Imhof *et al.*<sup>[103]</sup> popisuje přípravu fluorescenčních částic  $\text{SiO}_2$  hydrolýzou a kondenzací různých výchozích poměrů TEOS:APS (molární poměr APS:FITC konstantně  $\sim 9:1$ ). Taktéž upozorňuje na snižování koloidní stability se vzrůstajícím podílem APS. Pro reakci s poměrem TEOS : APS  $\sim 8:1$  již udává, že vzniklé částice nejsou koloidně stabilní, pro poměr  $\sim 16:1$  udává stabilní částice ve směsi EtOH/amoniak (dostatečný  $\zeta$ -potenciál v bazickém prostředí); např. v DMF jsou suspenze opět nestálé. Solubilizace magnetických nanočástic enkapsulací do vrstvy fluorescenčního  $\text{SiO}_2$  připraveného ze směsi TEOS s APS-FITC je také v literatuře popisována (viz kap. 1.4.3).<sup>[51,52,72]</sup> Příslušní autoři sice popisují přípravu stabilních koloidů vhodných pro biologické použití, konkrétní poměr TEOS:APS:FITC ale neuvádí. Yoon *et al.*<sup>[53]</sup> sice uvádí pro enkapsulaci feritu  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  směs s poměrem TEOS : APS-FITC  $\sim 8:1$ , částice jsou ale dále solubilizovány pomocí vrstvy PEG.

#### 5.6.4 Příprava a charakterizace $\text{LSMO@SiO}_2(\text{F})@\text{SiO}_2$

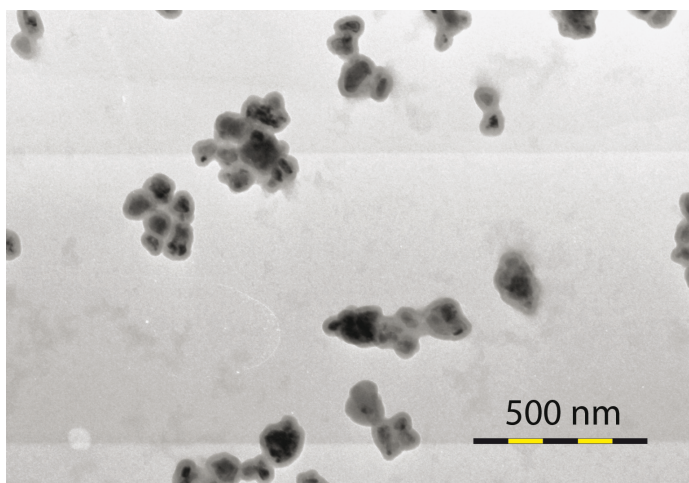
Enkapsulace  $\text{LSMO@SiO}_2(\text{F})$  do další vrstvy amorfního  $\text{SiO}_2$  byla provedena s ohledem na zvýšení koloidní stability fluorescenčně označených částic ve vodě.

Původní postup spočíval v separaci  $\text{LSMO@SiO}_2(\text{F})$  z reakční směsi, promytí ethanolem a rozptýlení v nové ethanolické reakční směsi pro další enkapsulaci. Preparace poskytla produkt tvořící stabilní vodné suspenze. To bylo potvrzeno změřením závislosti  $\zeta$ -potenciálu na pH (viz **Obr. 30**). Isoelektrický bod byl  $IEP = 2,5$  a  $\zeta$ -potenciál při  $\text{pH} = 7$  odpovídají příslušným hodnotám  $\text{LSMO@SiO}_2$ . Ačkoliv měření DLS ukazovalo přijatelnou distribuci částic a stanovená hydrodynamická velikost připravených částic byla  $r_{\text{DLS}} = 78\text{ nm}$ , morfologie částic zjištěná z TEM byla dost



špatná (Obr. 31). Produkt nebyl tvořen jednotlivými částicemi, nýbrž slepenci různých velikostí a jednotlivé částice na snímcích prakticky vůbec nebyly.

Pro zlepšení morfologie byly učiněny pokusy o sekundární enkapsulaci za jiných podmínek. Přestože v *i*PrOH tvoří LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) stabilnější suspenze než v EtOH, pokus enkapsulace v prostředí *i*PrOH také neposkytl oddělené částice. Naopak, výsledek byl významně



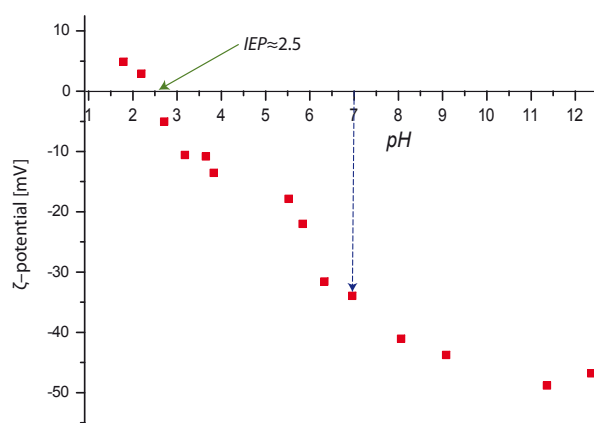
Obr. 31: TEM snímek LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> připraveného s postupem zahrnujícím separaci během preparace. Zřetelně je vidět, že částice jsou srostlé do větších útvarů. Jedná se o šarži 43.11.

horší, než v předchozím případě. Pokus zahrnující stabilizaci LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) pomocí PVP před vlastní kondenzací SiO<sub>2</sub> také poskytl značně aglomerované částice, produkt navíc obsahoval velké množství vyloučenin samotného SiO<sub>2</sub> narostlého částečně i na řetězcích PVP.

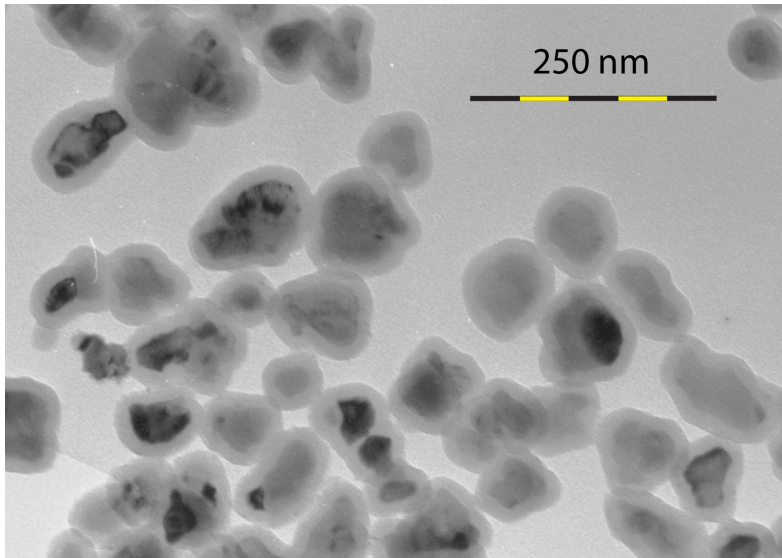
Jako metoda přípravy poskytl nejlepší produkt s nejlepší morfologií (Obr. 32) byl zhodnocen postup bez jakékoliv separace mezipro-

duktu LSMO@SiO<sub>2</sub>(F). Příprava LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> tudíž spočívala v kondenzaci další vrstvy SiO<sub>2</sub> v původní reakční směsi, v níž byl připravován LSMO@SiO<sub>2</sub>(F). V praxi šlo tedy pouze o přidání daného množství TEOS po uplynutí přibližně 6–12 h do původní reakční směsi. Tento velmi jednoduchý přístup byl překvapivě jediný z vyzkoušených, který poskytl částice přijatelné morfologie. Rozdělení přídavku TEOS na více dávek již nemělo na morfologii produktu významný vliv.

Reakce byla ovlivňována teplotou. Enkapsulace LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) prováděná bez separace při 30 °C poskytovala produkt s výrazně horší koloidní stabilitou než reakce prováděná při 40 °C. Enkapsulace při jiných teplotách testována nebyla.



Obr. 30: Naměřená závislost zeta-potenciálu LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (připraveného se separací v mezikroku) na pH. Jedná se o šarži 43.11.



Obr. 32: TEM snímek finálního LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>. Jedná se o šarži 43.20.

Enkapsulace poskytovala produkt tvořící dobře oddělené jednotlivé částice pokryté křemičitou slupkou jednotné tloušťky (Obr. 32).

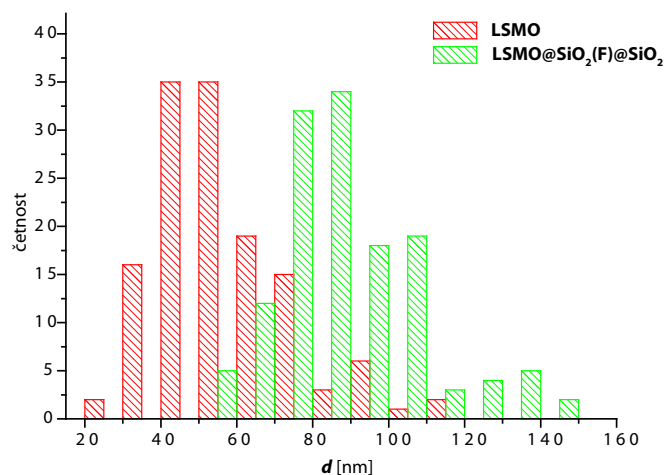
Byla provedena jednoduchá obrazová analýza snímků z TEM. S pomocí kulové aproximace naměřených částic byly stanoveny průměrné velikosti komplexních

nanočástic i magnetických jader. Průměr magnetických jader byl 57 (17) nm, průměr celých částic pak 89 (19) nm. Síla křemičité vrstvy byla 15,9 (1,5) nm (viz Tab. 11, Obr. 33) a tato hodnota byla potvrzena ještě přímým měřením na mikroskopickém snímku. Naměřená tloušťka křemičité vrstvy odpovídá přírůstku přibližně 5 nm během druhé enkapsulace.

Obrazovou analýzou zjištěné průměry magnetických jader částic LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> a LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> jsou 50 (14) nm, respektive 57 (17) nm. Vzhledem ke zjištěným směrodatným odchylkám, velmi omezenému analyzovanému statistickému souboru částic LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) a jisté nepřesnosti vyvolané kulovou aproximací částic je možno velikost magnetických jader pokládat za srovnatelnou.

Tab. 11: Statistické vyhodnocení obrazové analýzy LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>. Jedná se o šarži 43.20. Data v jednotlivých řádcích představují změřenou plochu částic (*S*), cirkularitu (*C*), průměr částice spočítaný z kulové aproximace (*d*) a tloušťku vrstvy SiO<sub>2</sub> (*e*). Index L@SFS označuje částice LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>, index LSMO pak příslušná jádra LSMO. Ve sloupcích je postupně aritmetický průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota a median souboru měřených částic.

	průměr	sm. odch. (±)	min	max	median
$S_{\text{LSMO}}$ [nm <sup>2</sup> ]	2787	1789	407	9828	2323
$C_{\text{LSMO}}$	0,73	0,10	0,48	0,92	0,74
$d_{\text{LSMO}}$ [nm]	57,0	17,4	22,8	111,9	54,4
$S_{\text{L@SFS}}$ [nm <sup>2</sup> ]	6457	2868	2268	17008	5831
$C_{\text{L@SFS}}$	0,828	0,052	0,634	0,911	0,839
$d_{\text{L@SFS}}$ [nm]	88,7	18,7	53,7	147,2	86,2
$e_{\text{L@SFS}}$ [nm]	15,9	1,5	12,4	20,1	15,7

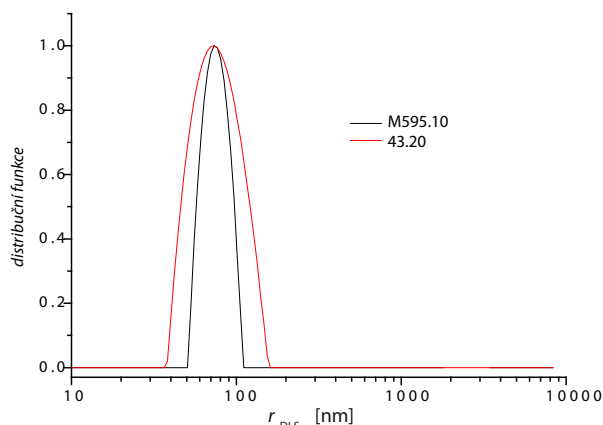


Obr. 23: Distribuce velikostí částic LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> a příslušných magnetických jader LSMO získaná obrazovou analýzou. Statistický soubor čítal 134 částic. Jedná se o šarži 43.20.

RTG difrakcí bylo potvrzeno fázové složení magnetického jádra LSMO; jádra byla identifikována jako La<sub>0,75</sub>Sr<sub>0,25</sub>MnO<sub>3</sub>, bez přítomnosti další fáze. Během enkapsulace se tedy povaha magnetického jádra neměnila. Byla stanovena střední velikost krystalitu LSMO  $d_{\text{XRD}} = 26$  nm. Tato hodnota je přibližně poloviční ve srovnání s průměrem jádra získaným obrazovou analýzou TEM snímků. Je tedy zřejmé, že magnetická jádra v enkapsulovaném produktu nejsou výhradně jednotlivé krystality, nýbrž také agregáty.

Je vhodné všimnout si zejména změny  $d_{\text{XRD}}$  během přípravy LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>. Východním materiálem byl LSMO s  $d_{\text{XRD}} = 20$  nm. Během enkapsulace tedy došlo k nárůstu  $d_{\text{XRD}}$  o 6 nm. Podobné zvětšení  $d_{\text{XRD}}$  popisuje při přípravě LSMO@SiO<sub>2</sub> také O. Kaman, jenž ho připisuje rozpouštění nejmenších částic LSMO v kyselém prostředí během aktivace LSMO pomocí HNO<sub>3</sub> a následné stabilizaci kyselinou citronovou. Při přípravě LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> je však použita stabilizace pomocí PVP a LSMO tak není vystaveno kyselinám, které by ho rozpouštěly. Při separaci PVP stabilizovaného LSMO z vodné suspenze před vlastní enkapsulací je ale i přes poměrně energetické odstředování vždy jisté množství materiálu ve vznosu a supernatant je tak poměrně tmavý. Naměřená hodnota dokazuje, že ve vznosu jsou zejména menší částice, lépe solubilizované PVP. Distribuce částic se tak změnila a hodnota střední velikosti krystalitu  $d_{\text{XRD}}$  se zvětšila. Se zvětšením  $d_{\text{XRD}}$  však koreluje zvětšení magnetizace (viz kap. 3.1). Částečný podíl na změně může mít i mnohonásobné odstředování čerstvě připraveného produktu LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> během separace a promývání. Pro účely použití produktu jako CA však jde o pozitivní změnu vlastností a není proto nutné se pokoušet zvýšení  $d_{\text{XRD}}$  zabránit variacemi v postupu.

LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> připravené popsáním způsobem tvoří za fyziologického pH ve vodě stabilní suspenze. Ani po delší době (1–2 týdny) neuvolňují suspenze LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>



Obr. 34: Distribuce částic LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> v závislosti na hydrodynamické velikosti  $r_{DLS}$ . Zobrazena data pro šarže M595.4 a M595.10.

buce částic a zvýší se jejich průměrná velikost; zvýší se tedy průměrná velikost částic získaná z TEM i  $r_{DLS}$ . Kladným důsledkem však bude zvýšení výtěžku preparace.

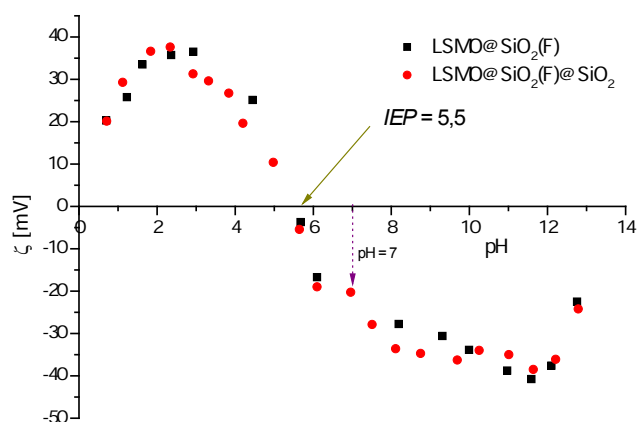
Výtěžek preparace se standardně pohyboval v rozmezí 8–13 % (viz Tab. 8), v závislosti na provedení separace produktu. Pokud by byla provedena opakovaná separace, případně separace za měkčích podmínek, která by vyloučila pouze největší aglomeráty, bylo by možno získávat větší podíl LSMO ve formě produktu. Současně s tím by však alespoň částečně rostla velikost částic. V této práci ale byla pro dosažení snadné reprodukovatelnosti prováděna pouze jednoduchá separace, kdy byl těžký podíl separován v jednom kroku.

Ačkoliv LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> poskytoval stabilní vodné suspenze, naměřená závislost  $\zeta$ -potenciálu na pH byla prakticky shodná se závislostí, kterou vykazoval LSMO@SiO<sub>2</sub>(F). Isoelektrický bod byl  $IEP = 5,5$  a  $\zeta$ -potenciál při pH = 7 byl v tomto případě kolem -20 mV (Obr. 35). Přestože tyto hodnoty nejsou zdaleka optimální z hlediska dlouhodobé stability připraveného materiálu, poskytoval připravený LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> natolik stabilní suspenze, že je bylo možno použít pro biologické účely.

Porovnáme-li naměřený průběh  $\zeta$ -potenciálu takto připraveného

fluorescenční barvivo. Hydrodynamická velikost  $r_{DLS}$  připravených částic se v závislosti na konkrétní šarži standardně pohybovala kolem 75 nm (Obr. 34).

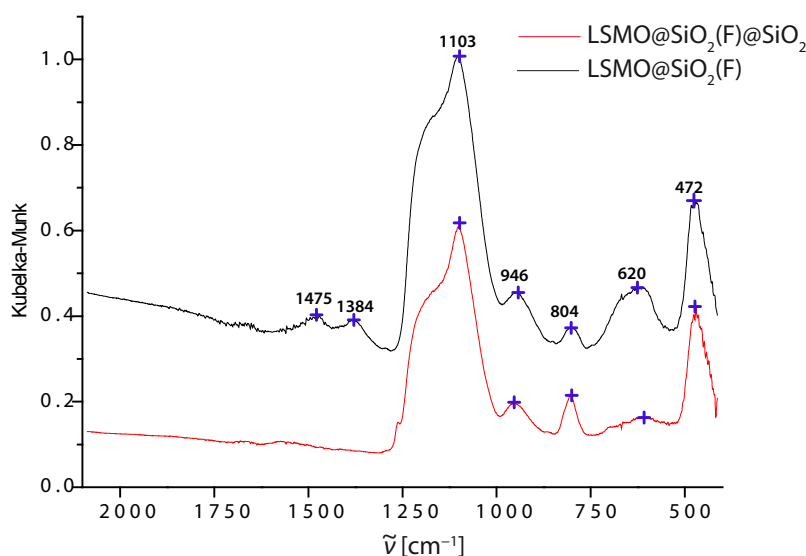
Je zřejmé, že veškeré parametry připraveného produktu týkající se velikosti výsledných částic jsou kriticky závislé na pečlivosti přípravy. Pokud se při odebírání supernatantu při frakční centrifugaci zvrší na dně usazené částice, bude následně produkt pravděpodobně obsahovat i větší partikule, případně různé aglomeráty a tím se zhorší distri-



Obr. 35: Závislost (titrační křivka)  $\zeta$ -potenciálu LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) a LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> na pH. Jedná se o šarže M595.4 a M595.10.

produktu a produktu, v jehož přípravě byl zahrnut promývací krok, je zřejmé, že na rozdíl od nevydařeného produktu připraveného s promývacím mezikrokem by měla vnější křemičitá vrstva finálního LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> obsahovat jisté množství aminoskupin. Literatura uvádí nižší reaktivitu při bazicky katalyzované hydrolyze a následné kondenzaci triethoxysilanových derivátů v porovnání s TEOS.<sup>[106]</sup> Pravděpodobně tedy triethoxysilanové deriváty nezkondenzují kompletně v první fázi reakce a z reakční směsi se během druhé fáze částečně vyloučí i do vnější křemičité vrstvy.

V naměřených DRIFTS spektrech vysušeného produktu LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (Obr. 36) však nejsou patrné vibrační projevy 3-aminopropylové skupiny jako je tomu ve spektrech LSMO@SiO<sub>2</sub>(F). Spektra tak obsahují pouze pásy příslušející vibracím amorfního hydratovaného SiO<sub>2</sub>: signály 1103 a 804 cm<sup>-1</sup> přísluší asymetrické a a symetrické stretching vibraci Si–O–Si, maxima 946 a 475 cm<sup>-1</sup> přísluší bending vibracím Si–O–H a Si–O–Si. Intenzita pásu 620 cm<sup>-1</sup> příslušející LSMO je výrazně menší než u LSMO@SiO<sub>2</sub>(F), což je dáno nárůstem křemičité vrstvy a díky tomu lepším stíněním LSMO. Naměřené spektrum je tedy velmi podobné spektru standardně připravovaného LSMO@SiO<sub>2</sub>.<sup>[86,88]</sup> Stejně jako u LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) nebyly pozorovány vibrace příslušející fluoresceinovým skupinám.



Obr. 36: DRIFTS spektra LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) a LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>. Jedná se o šarže M595.4 a M595.10.

Absence dobře patrných vibračních projevů 3-aminopropylové skupiny ukazuje na její nižší koncentraci v sekundární křemičité vrstvě. Výsledek měření  $\zeta$ -potenciálu ale ukazuje na to, že by koncentrace měla být podobná, jako u LSMO@SiO<sub>2</sub>(F). Vysvětlením tedy může být, že křemičitá vrstva je značně porézní a díky této porozitě je přístupné dostatečné množství aminoskupin z celého objemu vrstvy pro interakci s vodným prostředím. Povrchová křemičitá vrstva ale pravdě-

podobně vcelku dobře stíní tyto aminoskupiny pro měření DRIFTS. Tato hypotéza umožňuje též vysvětlit rozdíl v koloidní stabilitě LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) a LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>, přestože se naměřený  $\zeta$ -potenciál shoduje. Zvětšení koloidní stability po obalení další křemičitou vrstvou je tak s největší pravděpodobností možno přičíst snížení hydrofobicity povrchu překrytím další křemičitou vrstvou, ačkoliv elektrostatické odpuzování částic se v podstatě nezměnilo.

Stabilizace částic s křemičítým povrchem přídatnou povrchovou vrstvou čistého SiO<sub>2</sub> vytvořenou přidáním TEOS do původní reakční směsi je již v literatuře popsána. Lettinga *et al.*<sup>[102]</sup> takto stabilizuje křemičité částice derivatizované eosinem. Heitsch *et al.*<sup>[101]</sup> dokonce nejprve kondenzuje samotný APS–FITC na magnetitových nanočásticích a produkt až následně stabilizuje přidáním přibližně desetinásobného množství TEOS v porovnání s primární kondenzací fluorescenčního prekurzoru do reakční směsi.

### 5.6.5 Optické vlastnosti

Oba připravené produkty vykazovaly stejně jako LSMO@SiO<sub>2</sub> značnou absorpci světla. Derivatizace fluoresceinem se na jejich makroskopickém vzhledu nikterak neprojevila, jak LSMO@SiO<sub>2</sub>(F), tak LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> tvoří ve vyšších koncentracích na první pohled černé, neprůhledné suspenze (Obr. 37).

Absorpce světla LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> byla zkoumána UV-Vis spektrometrií. Oproti spektrům LSMO@SiO<sub>2</sub> se ve spektrech objevil slabý absorpční pás (490–500 nm) příslušející fluoresceinovým jednotkám. Ve spektrech LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> je stále dobře patrné absorpční maximum při 268 nm (Obr. 38). Stejně jako u LSMO@SiO<sub>2</sub> byla potvrzena lineární závislost mezi souhrnnou absorpencí při 268 nm a koncentrací LSMO (Obr. 39). Směrnice nalezené závislosti se však značně liší, je přibližně 1,6× větší, od směrnice nalezené pro LSMO@SiO<sub>2</sub>. Efekty rozptylu a případně rozdílné absorpce záření suspenzí s různou distribucí částic nelze tedy zanedbávat a pouhé měření úbytku světla není tedy vhodné ani pro orientační stanovení koncentrace různě obalených částic LSMO.

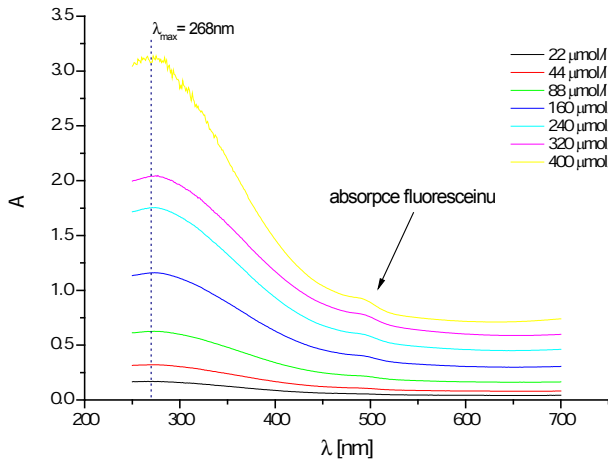
I přes malou intenzitu absorpčního pásu fluoresceinu byl učiněn pokus tento pás separovat ze spektra. Po odečtení rozptylového pozadí byla zjištěna absorpance příslušející fluoresceinovým jednotkám. Byla potvrzena lineární závislost této



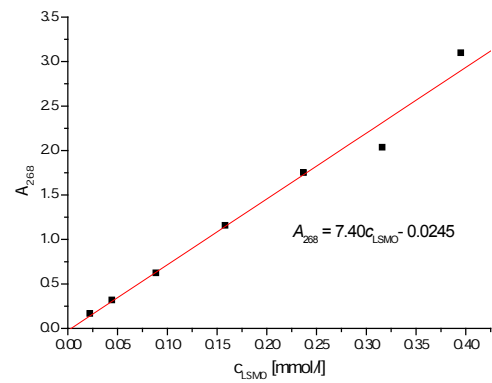
Obr. 37: Koncentrovaná suspenze LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>;  $c_{\text{LSMO}} \sim 2 \text{ mmol/l}$

absorbance na koncentraci nanočástic v suspenzi (Obr. 40a,b).

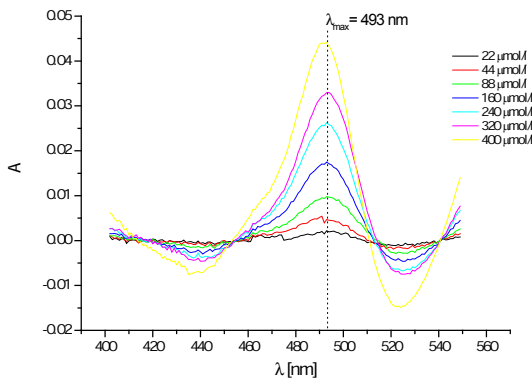
Sadou excitačně–emisních scanů byly prověřeny fluorescenční vlastnosti LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>. Excitační maximum materiálu je  $\lambda_{ex} = 492$  nm, tato hodnota koresponduje s absorpčním maximum fluoresceinového pásu  $\lambda_{max} = 492$  nm. Emisní maximum je  $\lambda_{em} = 514$  nm (Obr. 41). Hodnoty



Obr. 38: Absorpční UV-Vis spektra LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže M595.10) při různých zředěních; pro každé zředění je uvedena příslušná koncentrace LSMO. Oproti spektrům LSMO@SiO<sub>2</sub> je možno vidět slabý absorpční pás fluoresceinu mezi 490–500 nm.



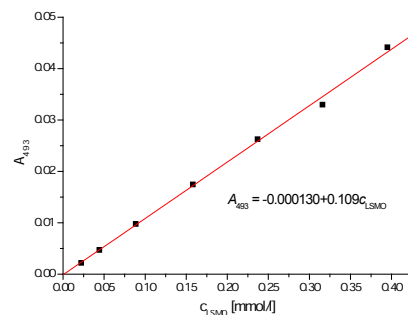
Obr. 39: Závislost souhrnné absorbance LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> při 268 nm na koncentraci.

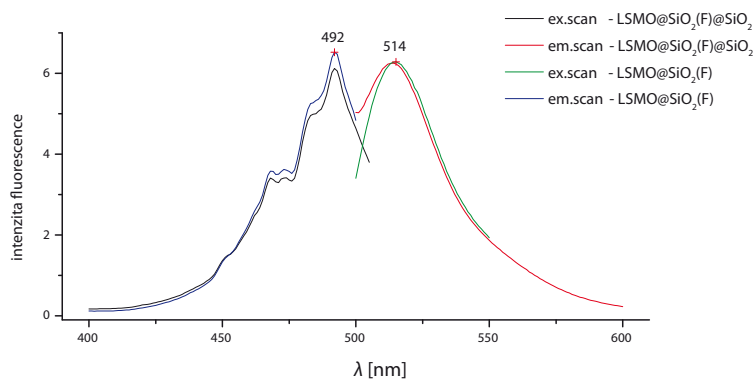


Obr 40a,b: Lineární závislost intenzity fluoresceinového pásu na koncentraci LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> v UV-Vis spektru LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>. Absorpce fluoresceinu byla separována od absorpce LSMO následujícím způsobem: jednotlivá spektra LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> při různých koncentracích byla v intervalu 400–550 nm (s výjimkou intervalu 475–520 nm) proložena polynomem 3. stupně. Křivka polynomu byla pak odečtena od spektra. Naměřená data nebylo možno proložit, funkcí ve tvaru

$$A = \frac{a}{b + \lambda^4}$$

která by odpovídala vztahu pro turbidanci. V daném rozsahu však průběh dat dobře vystihoval použitý polynom 3.stupně. Spektra s odečteným pozadím jsou vlevo ukazují maximum absorpce při 493 nm; vpravo je závislost  $A_{493}$  na koncentraci LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>.





Obr. 41: Excitační a emisní maxima LSMO@SiO<sub>2</sub>(F) a LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>.

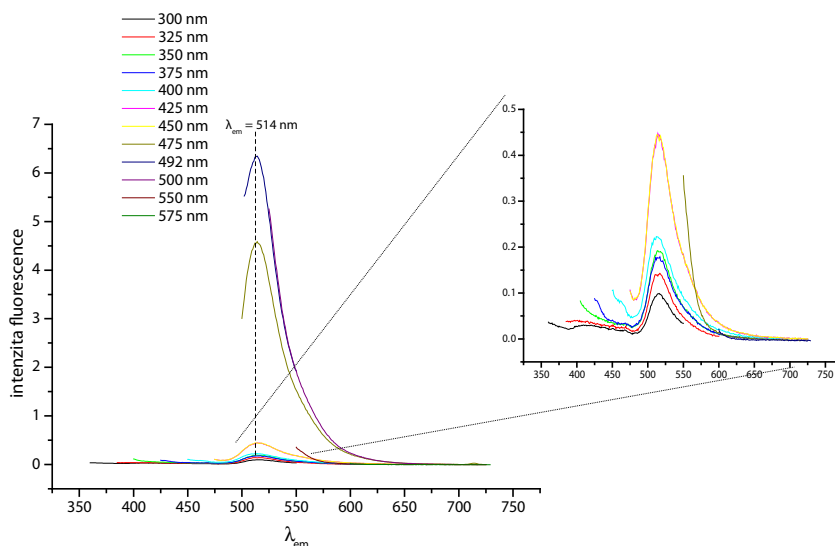
naprosto odpovídají literárním údajům o fluorescenčních vlastnostech fluoresceinu a jeho derivátů.<sup>[64]</sup>

Produkt však emituje světlo i při excitaci zářením o menší vlnové délce než 492 nm (Obr. 42). S klesající vlnovou délkou excitace sice klesá intenzita emise, fluorescence je však přesto dobře detekovatelná i při excitaci 300 nm zářením (Obr. 43).

Fluorescence LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> je závislá na koncentraci. Závislost má velmi podobný průběh jako závislost intenzity fluorescence LSMO@SiO<sub>2</sub> na koncentraci. Maximální fluorescence nastává při koncentraci LSMO ~0,25 mmol/l (Obr. 44a,b).

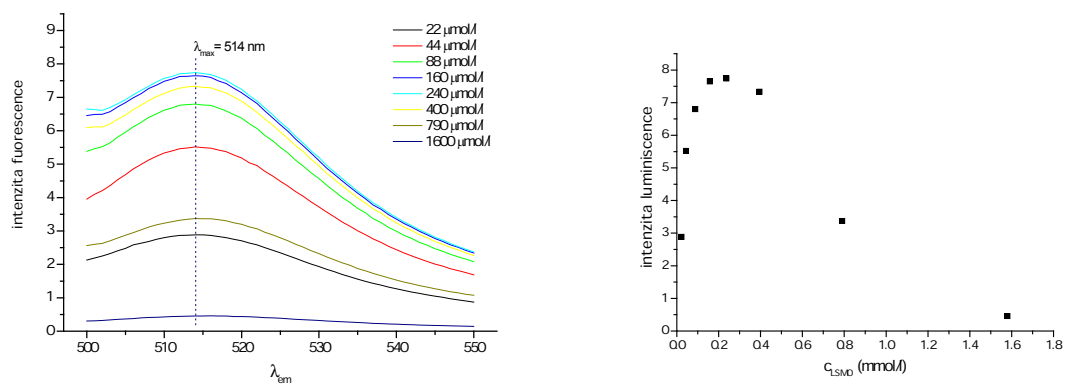


Obr. 42: Suspenze (20% zředění) LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> při (M595.10) v kyvetě při ozařování 366 nm UV světlem



Obr. 43: Emisní spektra LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> na při různých  $\lambda_{ex}$ . Z obrázku je vidět, že maximum emise při  $\lambda_{em} = 514$  nm je nezávislé na použité  $\lambda_{ex}$ , mění se pouze intenzita fluorescence, jež značně roste s přibližováním použité  $\lambda_{ex}$  k hodnotě 492 nm. Měřeno při napětí detektoru 700 V.





Obr. 44a,b: Závislost intenzity fluorescence LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> na koncentraci, vyjádřené formou koncentrace LSMO. Měřeno při napětí na detektoru 700 V.

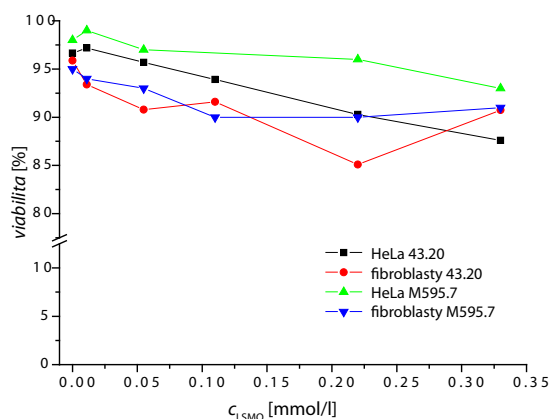
## 5.7 Biologické experimenty s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>

Připravené částice (šarže 43.14, 43.20, M595.7, viz Tab. 7) byly podrobeny sérii *in vitro* testů jejich vlivu na buněčné kultury a Langerhansovy ostrůvky. Inkubace rMSC a Langerhansových ostrůvků s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> byly prováděny s cílem ověřit konkrétní prakticky využitelné možnosti značení příslušných buněk (ostrůvků), inkubace s HeLa buňkami a fibroblasty byla provedena pouze pro zjištění případného toxického působení na buňky. Základní koncentrace zvolená pro inkubace byla  $c_{\text{LSMO}} = 0,11$  mmol/l. Tato koncentrace byla již v minulosti P. Jendelovou standardně využívána při stanovování viability rMSC inkubovaných s LSMO@SiO<sub>2</sub>. Ostatní používané koncentrace byly vždy násobky této koncentrace (0,1; ½; 2; 3).

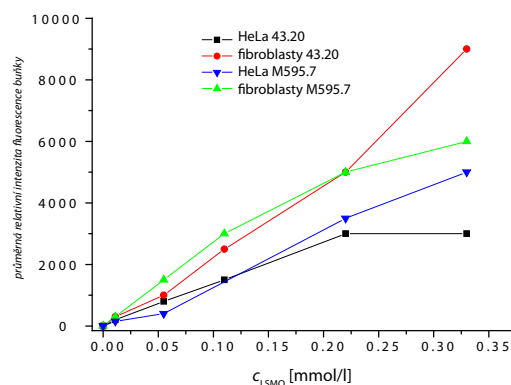
Vzhledem k charakteru biologického materiálu a velmi omezenému počtu provedených pokusů je srovnávání výsledků viability z jednotlivých pokusů poněkud zavádějící; zejména pro rMSC a Langerhansovy ostrůvky, jež jsou pro každou sérii pokusů čerstvě izolovány z jiného zvířete a už proto se mohou lišit. V rámci provedených experimentů je vhodné tedy porovnávat pouze obecné trendy a nikoliv přesné číselné hodnoty; ty se můžou při opakování pokusu s jinými buňkami stejného druhu poněkud lišit. Pro dobře porovnatelné výsledky by bylo třeba provést větší množství biologických experimentů a jejich výsledky statisticky zpracovat. Výsledky biologických pokusů uvedené v této práci jsou proto podrobněji porovnávány jen v rámci jednoho pokusu provedeného na jedné skupině buněk, s jedinou šarží komplexních nanočástic.

### 5.7.1 HeLa buňky a fibroblasty

Byly provedeny dvě sady inkubací připraveného LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> s HeLa nádorovými buňkami a kožními fibroblasty. Jednalo se o zjištění viability v koncentračním rozmezí 0,011–0,33 mmol/l LSMO u dvou různých šarží produktu LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>: první sada inkubací s šarží 43.20, následně pak s šarží M595.7. Viabilita HeLa buněk byla v obou testovaných souborech nepatrně vyšší, než viabilita fibroblastů. V celém zkoumaném rozmezí byla viabilita obou typů buněk velmi dobrá a pohybovala se nad 85 %. Na rozdíl od kmenových buněk vykazovala viabilita se vzrůstající koncentrací pozvolný pokles (Obr. 45, Tab. 12). Průtokovým cytometrem byla také změřena průměrná relativní fluorescence buněk v kanále FITC z jednotlivých inkubací. Měření prokázalo, že úměrně se vzrůstající koncentrací LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> v kultivačním médiu stoupá intenzita fluorescence označených buněk, příslušně tedy stoupá množství internalizovaného materiálu (Obr. 46, Tab. 12). Z grafu je zřejmé, že fibroblasty internalizují LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> poněkud více než HeLa buňky. Uspořádání pokusu nedovolovalo, tak jako u inkubací rMSC, stanovit i absolutní hodnotu celkového počtu buněk, nýbrž pouze poměr živých a mrtvých buněk.



Obr. 45: Viability HeLa buněk a fibroblastů; výsledky dvou sad inkubací LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže 43.20 a M595.7).



Obr. 46: Relativní průměrná fluorescence buněk ve FITC kanále; výsledky dvou sad inkubací LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže 43.20 a M595.7) s HeLa buňkami a fibroblasty.

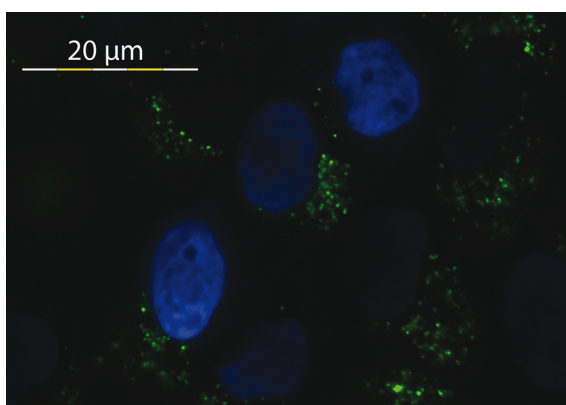
Tab. 12: Výsledky inkubací HeLa buněk a fibroblastů s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>; šarže 43.20 a M595.7.

buněk	c <sub>LSMO</sub> [mmol/l]	c <sub>Mn</sub> [mg/ml]	M595.7			43.2		
			viabilita [%]	viabilita (poměr ke kontrolě) [%]	relativní střední fluores- cence	viabilita [%]	viabilita (poměr ke kontrolě) [%]	relativní střední fluores- cence
HeLa	0	0	98	100	2	97	100	1
	0,011	0,604	99	101	150	97	101	200
	0,055	3,022	97	99	400	96	99	800
	0,11	6,044	—	—	—	94	97	1500
	0,22	12,09	96	98	3500	90	93	3000
	0,33	18,13	93	95	5000	88	91	3000
fibroblasty	0	0	95	100	6	96	100	1
	0,011	0,604	94	99	300	93	97	300
	0,055	3,022	93	98	1500	91	95	1000
	0,11	6,045	90	95	3000	92	96	2500
	0,22	12,09	90	95	5000	85	89	5000
	0,33	18,13	91	96	6000	91	95	9000

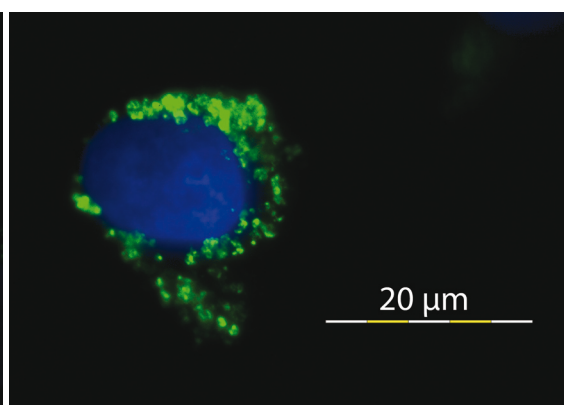
Morfologie buněk pozorovaná fluorescenčním mikroskopem není zdaleka tak výrazně ovlivněna, jako v případě rMSC. Je vcelku přirozené, že nádorové a kožní buňky budou odolnější, než buňky kmenové. Snímky z fluorescenčního mikroskopu (Obr. 47–50) také ukazují, že materiál je internalizován do vnitřních membránových váčků, pozdních endozómů/lyzozómů. I při zkoumání pod mikroskopem jsou snadno patrné rozdíly v intenzitě fluorescenčního značení u buněk kultivovaných v médiu s různou koncentrací LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>.

Srovnání viabilit HeLa buněk a fibroblastů inkubovaných s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> s viabilitami v prostředí LSMO@SiO<sub>2</sub>, které uvádí O. Kaman,<sup>[86-88]</sup> ukazuje naprostou porovnatelnost materiá-

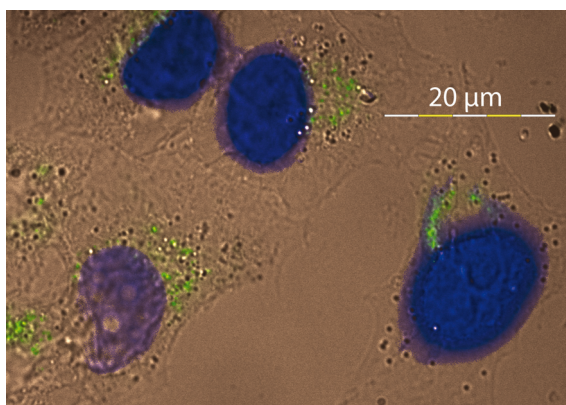
lů, viability jsou také velmi vysoké. V případě LSMO@SiO<sub>2</sub> jsou ale z hlediska viability poněkud odolnější fibroblasty, než HeLa buňky, rozdíl je ale velmi malý a vzhledem k počtu provedených pokusů prakticky bezvýznamný. Dále je výsledky vhodné porovnat s prací Bhayaniho *et al.*,<sup>[85]</sup> jenž studoval viabilitu tří typů nádorových buněk v přítomnosti LSMO ( $x = 0,3$ ) nekovalentně pokrytého dextranem či BSA. Ač používá jiné nádorové buňky, uvádí velmi porovnatelné viability, přesahující 80 %, pro podobné koncentrace.



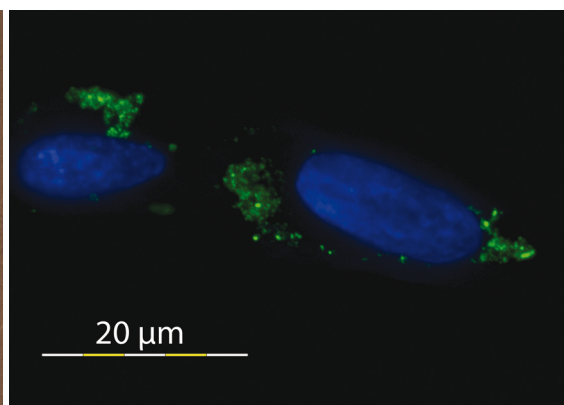
Obr. 47: Snímek (fluorescenční mikroskop) HeLa buněk kultivovaných v médiu s  $c_{\text{LSMO}} = 0,011$  mmol/l. Modré skvrny: buněčná jádra označená DAPI, zelené skvrny: LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>.



Obr. 48: Snímek (fluorescenční mikroskop) HeLa buňky kultivované v médiu s  $c_{\text{LSMO}} = 0,33$  mmol/l. Modrá skvrna: buněčné jádro označená DAPI, zelené skvrny: LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>.



Obr. 49: Snímek HeLa buněk kultivovaných v médiu s  $c_{\text{LSMO}} = 0,011$  mmol/l. Překryv snímků z fluorescenčního a nativního módu mikroskopu. Modré skvrny: buněčná jádra označená DAPI, zelené skvrny: LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>.



Obr. 50: Snímek (fluorescenční mikroskop) fibroblastů kultivovaných v médiu s  $c_{\text{LSMO}} = 0,33$  mmol/l. Modré skvrny: buněčná jádra označená DAPI, zelené skvrny: LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>.

### 5.7.2 Kmenové buňky

Inkubace rMSC s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> byla provedena pouze jedenkrát. Počet sklizených buněk ani jejich viabilita v závislosti na stoupající koncentraci v rámci testovaného koncentračního rozpětí LSMO 0,011–0,33 mmol/l překvapivě neklesaly, naopak zůstávaly víceméně konstantní (viz **Tab. 17**). Viabilita dosahovala přibližně 90 %, což je hodnota srovnatelná s údaji, které uvádí O. Kaman pro inkubace s LSMO@SiO<sub>2</sub>. Počet sklizených buněk se pohyboval v rozmezí 50–80 % počtu sklizeného v kontrolním vzorku. Mikroskopické snímky (**Tab. 18**) ukazují morfologii označených buněk. Snímky z fluorescenčního mikroskopu (**Tab. 18**) dokazují možnost fluorescenční vizualizace buněk, přičemž poskytují také informace o jejich morfologii. Ukazují, že LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> se u zdravých buněk dostává víceméně do celého objemu buňky s výjimkou jádra.

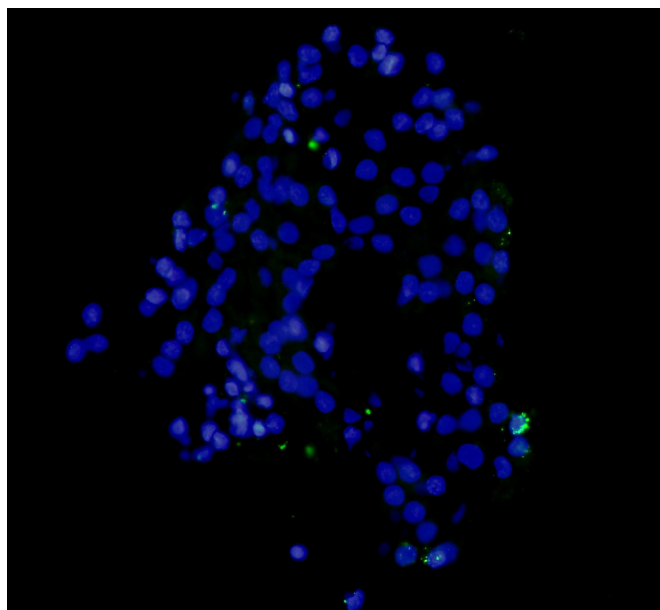
Stejně jako v případě inkubací s LSMO@SiO<sub>2</sub><sup>[86–88]</sup> je však problémem poměrně velký podíl neadherovaných kulatých buněk, který svědčí o jistém negativním působení těchto částic na buňky. Zdravé kmenové buňky jsou standardně přisedlé na podložce.<sup>[107,108]</sup>

### 5.7.3 Langerhansovy ostrůvky

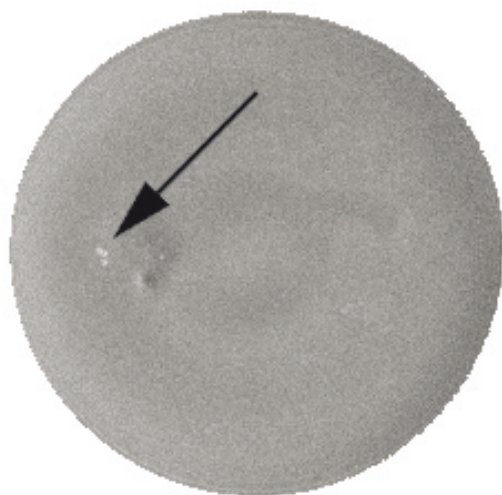
Pokus o inkubaci pankreatických Langerhansových ostrůvků s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže 43.20) byl proveden při standardní koncentraci  $c_{\text{LSMO}} = 0,11$  mmol/l. Oproti pokusům s buňkami byla doba inkubace změněna na 24 h.

Vitalita ostrůvků byla ve dvou různých pokusech stanovena na 75 a 82,5 %. Statické inkubace poskytly stimulační indexy (viz kap. 4.3.3.2) ve dvou stanoveních  $SI_1 = 2,33$  a  $SI_2 = 4,94$ . Pokusy ukazují, že Langerhansovy ostrůvky inkubované s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> z větší části přežívají a neztrácejí schopnost produkovat inzulin. Tyto výsledky ve srovnání s výsledky  $SI \sim 15$  a vitalitami vyššími než 90 %, které recentně publikovali pracovníci stejného pracoviště pro Langerhansovy ostrůvky značené klinicky používaným SPIO (ferucarbotran)<sup>[109,110]</sup> nevyznívají příliš dobře. Uvedeme-li však, že dřívější publikace Jiráka *et al.*<sup>[111]</sup> uvádí pro ferucarbotran  $SI \sim 1,5$ , jedná se o vcelku přijatelný výsledek. Je pravděpodobné, že případnými optimalizacemi na straně přípravy produktu a na straně protokolu značení je možno dosáhnout s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> mnohem lepších výsledků, než dosud; možná i porovnatelných se soudobými studiemi s ferucarbotranem.

Snímek z fluorescenčního mikroskopu (**Obr. 51**) ukazuje, že fluorescence je přítomna pouze velmi omezeně. Pouze malé množství LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> tedy bylo při inkubaci internalizováno do ostrůvků. MR obrazy (**Obr. 52a,b**) však ukazují, že i toto malé množství internalizovaných částic poskytuje dostatečný kontrast k MR zobrazení ostrůvků.



Tab. 51: Snímek Langerhansova ostrůvku označeného LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@ SiO<sub>2</sub>. Modré skvrny: buněčná jádra označená DAPI, zelené skvrny: LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>.



Obr. 52a: MR snímek Petriho misky s označenými Langerhansovými ostrůvky (bílé skvrny, ke kterým směřuje šipka). Tloušťka řezu 0,5 mm.



Obr. 52b: MR snímek Petriho misky s označenými Langerhansovými ostrůvky (bílé skvrny, ke kterým směřuje šipka). Tloušťka řezu 0,85 mm.

## 5.8 Biologické experimenty s nanočásticemi pokrytými polymery

Viabilita rMSC inkubovaných s částicemi LSMO@SiO<sub>2</sub> při standardně používané koncentraci ( $c_{\text{LSMO}} = 0,11 \text{ mmol/l}$ ) dosahuje běžně hodnot přes 90 % (viz kap. 3.2). Bylo také ukázáno, že viabilita rMSC inkubovaných s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> v dosti širokém rozmezí koncentrací se také

pohybuje kolem 90 % (viz kap. 5.7.2) Problémem však jsou v obou případech morfologické změny na části inkubovaných buněk – buňky sice přežívají, ale nejsou přisedlé na dně kultivační nádoby, jak by měly zdravé buňky být,<sup>[107,108]</sup> nýbrž plavou v živném médiu. Je evidentní, že ačkoliv použité nanočástice buňky přímo nezabíjí, jistý negativní vliv mají.

Proto bylo navrženo další obalení nanočástic organickým polymerem. Takový postup se standardně používá pro zlepšení koloidní stability a biokompatibility magnetických nanočástic. Obalené nanočástice by díky odlišným povrchovým vlastnostem a lepší koloidní stabilitě mohly mít méně negativní vliv na buňky. Kovalentní navázání polymeru bývá dosti náročné. Je však možno využít adsorpce organického polymeru na povrch nanočástice a tak pokrýt částice nekovalentně.

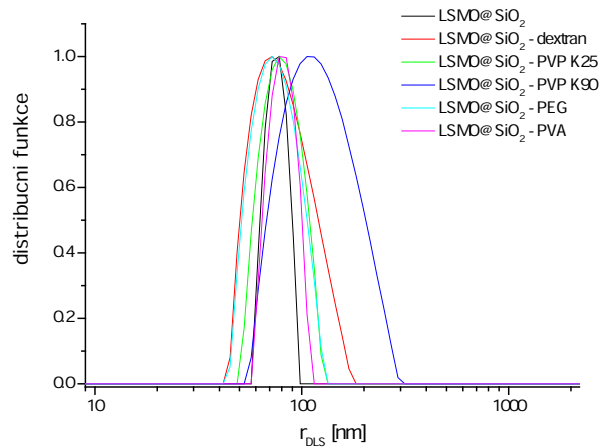
Jako modelový materiál byl pro prvotní studie vybrán relativně snadněji připravitelný LSMO@SiO<sub>2</sub>. Předpokladem experimentu tedy bylo, že se po adsorpci vhodného polymeru na povrch LSMO@SiO<sub>2</sub> se mohou změnit povrchové vlastnosti takových nanočástic a to by se mohlo projevit při inkubaci nanočástic s buňkami.

### 5.8.1 Příprava suspenzí LSMO@SiO<sub>2</sub> s rozpustnými polymery

Sorpce polymerů na povrch nanočástic LSMO@SiO<sub>2</sub> byla prováděna za podobného poměru polymer:LSMO jako při stabilizaci LSMO PVP metodou před enkapsulací do SiO<sub>2</sub> (viz kap. 4.4.3.3), tedy přibližně 20 mg polymeru/1 mg LSMO. Suspenze pravděpodobně obsahovaly značné množství neadsorbovaných polymerů. Proto byly odstředěny a supernatant s přebytečným polymerem odstraněn. Vzhledem k malé hustotě (ve srovnání s nanočásticemi) použitých polymerů a jejich víceméně lineárním molekulám lze předpokládat, že odstředěním se na dně centrifugační zkumavky koncentrují nanočástice řádově rychleji, než volné molekuly polymerů. Při výpočtu zbylých množství polymeru v odstředěných roztocích tak bylo zanedbáno případné koncentrování polymerů na dně centrifugačních zkumavek (**Tab. 8**). Odstředěné suspenze byly následně zředěny vodou na původní objemy a byly tak získány roztoky zbavené přebytečného polymeru. Pokud se však polymer neadsorboval na částice dostatečně silně, byl tímto krokem z větší části z povrchu nanočástic odstraněn.

Po přibližně 12 h stání připravených suspenzí při laboratorní teplotě nebyly na suspenzích vizuálně patrné žádné známky agregace a srážení. Ani změření DLS odstředěných a resuspendovaných vzorků suspenzí LSMO@SiO<sub>2</sub> s polymery po tomto stání (bez rozptýlení ultrazvukem) neukázalo žádné známky agregace, pouze mírné zvýšení hydrodynamických velikostí  $r_{DLS}$  oproti  $r_{DLS}$  čerstvě sonifikovaných částic LSMO@SiO<sub>2</sub> (viz **Obr. 53**). Výjimkou byla suspenze s PVP K90. Částice LSMO@SiO<sub>2</sub> (šarže 43.14) měly hydrodynamickou velikost  $r_{DLS}=75$  nm, částice v sus-

penzích polymery přibližně  $r_{DLS} = 80$  nm (viz Tab. 8). V suspenzi s PVP K90 měly částice  $r_{DLS} = 120$  nm. Vzhledem k přítomnosti pouze jediného peaku a opakovaně dosažitelným stejným výsledkům při měření to ukazuje na skutečné zvýšení  $r_{DLS}$  vlivem adsorpce vysokomolekulárního PVP na povrch, nikoliv aglomeraci částic způsobenou přidavkem polymeru. Připravené suspenze vykazovaly velmi dobrou koloidní stabilitu, ani během několika týdnů nejevily aspoň dle vizuálního pozorování známky výrazné sedimentace či aglomerace.



Obr. 53: Distribuce částic polymerů obalených částic LSMO@SiO<sub>2</sub> v závislosti na hydrodynamické velikosti  $r_{DLS}$ .

### 5.8.2 Stanovení nejvhodnějšího polymeru pro obalování LSMO@SiO<sub>2</sub>

V první fázi tedy byly připraveny testovací suspenze částic LSMO@SiO<sub>2</sub> s vybranými polymery (viz Tab. 8), které jsou běžně používány pro podobné účely. S připravenými suspenzemi byly inkubovány rMSC. Taktéž byly inkubovány rMSC s roztoky samotných polymerů o stejné koncentraci. Použitá koncentrace nanočástic odpovídala vždy standardní koncentraci  $c_{LSMO} = 0,11$  mmol/l.

rMSC s polymery samotnými byly inkubovány při stejné koncentraci polymeru, jaká byla v neodstředěné suspenzi nanočástic, tedy 8 mg/ml (Tab. 8). Viability buněk za přítomnosti polymerů byly víceméně srovnatelné a přesahovaly 97 % (viz Tab. 13, Obr. 54). Počtem sklizených

Tab. 13: Viability a počty sklizených buněk při inkubaci rMSC s polymery o koncentraci 8 mg/ml (PEG 7,3 mg/ml). Poslední dva sloupce uvádí hodnoty vztažené na viabilitu a počet sklizených buněk v kontrolním vzorku bez přidavku polymerů.

polymer	sklizeno [10 <sup>3</sup> buněk]	viabilita [%]	sklizeno (poměr ke kontrole) [%]	viabilita (poměr ke kontrole) [%]
dextran	185	98	97	99
PVP K25	145	97	76	98
PVP K90	125	97	66	98
PEG	110	99	58	100
PVA	130	97	68	98
kontrola	190	99	100	100



buněk převyšoval ostatní polymery dextran, jehož výsledky jsou prakticky stejné, jako u kontrolního vzorku bez polymerů. Z inkubací s ostatními polymery byla sklizena srovnatelná množství buněk, odpovídající přibližně 60–75 % buněk sklizených v kontrolním vzorku.

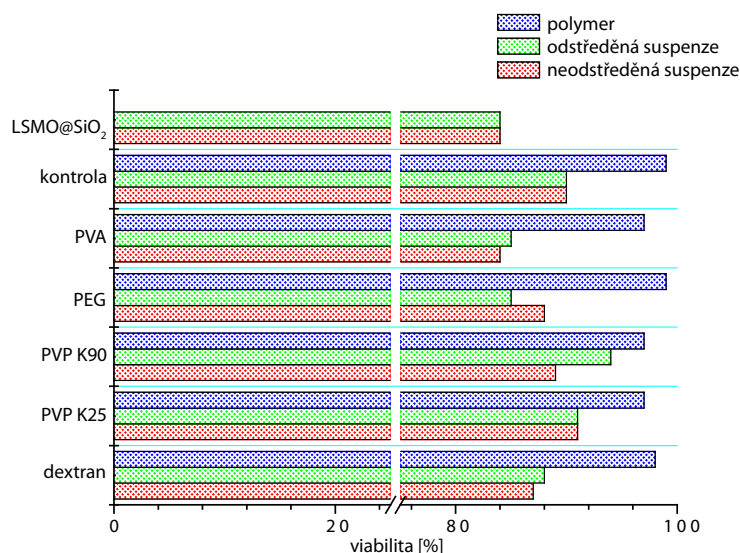
Pokus s neodstředěnými suspenzemi ukázal (viz **Tab. 14, Obr. 54**), že nejméně vhodné jsou pro daný účel z vybraného setu PEG a PVA. Z inkubací suspenzí s těmito polymery bylo sklizeno dosti malé množství buněk, odpovídající přibližně polovině sklizených buněk z kontrolního vzorku. Zároveň byla u PVA nejnižší viabilita (84 %). Jako nejperspektivnější se ukázal PVP, ideálně PVP K25, který kromě nejvyšší viability (91 %) poskytl také nejvíce sklizených buněk (122 % oproti kontrolnímu vzorku).

Inkubace s odstředěnými částicemi přinesla velmi zajímavý výsledek. S výjimkou PVP byly výsledky ostatních polymerů srovnatelné a dokonce srovnatelné s neobalenými částicemi – sklizeno přibližně 60 % v porovnání s kontrolním vzorkem, viability kolem 85 %. Takový výsledek může souviset s tím, že dané polymery se na křemičitý povrch nanočástic příliš pevně nevážou a protože většina polymeru byla (přibližně 90 %) byla odstraněna po odstředění společně se supernatantem, inkubace tak v podstatě mohla probíhat stejně jako v jejich nepřítomnosti. Z této série opět vyčnívá PVP a zejména PVP K25, jenž má dokonce výrazně větší počet sklizených buněk, než kontrolní vzorek (166 %). Viabilita je přibližně stejná jako u kontrolního vzorku (91%) (**Tab. 14, Obr. 54**).

Mikroskopické snímky inkubovaných buněk ukazují značné zastoupení kulatých neadherovaných buněk v případech inkubace buněk se samotnými částicemi LSMO@SiO<sub>2</sub> a částicemi obalenými dextranem, PEG a PVA. Obrázky buněk inkubovaných s PVP bez ohledu na M<sub>w</sub> a odstředění

**Tab. 14:** Viability a počty sklizených buněk při inkubaci rMSC se suspenzemi LSMO@SiO<sub>2</sub> s polymery. Výsledky pro odstředěné a neodstředěné suspenze. Tabulka uvádí i srovnání výsledků jednotlivých suspenzí s kontrolním vzorkem a se vzorkem LSMO@SiO<sub>2</sub> bez přídavku polymeru.

	polymer	sklizeno [10 <sup>3</sup> buněk]	viabilita [%]	sklizeno (poměr ke kontrolě) [%]	viabilita (poměr ke kontrolě) [%]	sklizeno (poměr k LSMO@SiO <sub>2</sub> ) [%]	viabilita (poměr LSMO@SiO <sub>2</sub> ) [%]
neodstředěné	dextran	70	87	78	97	127	104
	PVP K25	110	91	122	101	200	109
	PVP K90	85	89	94	98	155	106
	PEG	55	88	61	98	100	105
	PVA	40	84	44	93	73	100
odstředěné	dextran	55	88	61	98	100	105
	PVP K25	145	91	161	101	264	109
	PVP K90	85	94	94	104	155	112
	PEG	55	85	61	94	100	102
	PVA	50	85	56	94	91	101
LSMO@SiO <sub>2</sub>		55	84	61	93	100	100
kontrola		90	90	100	100	164	108

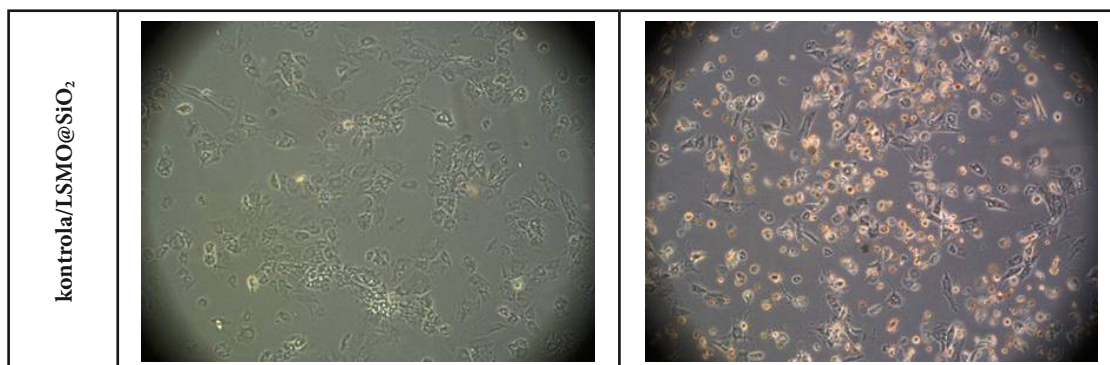


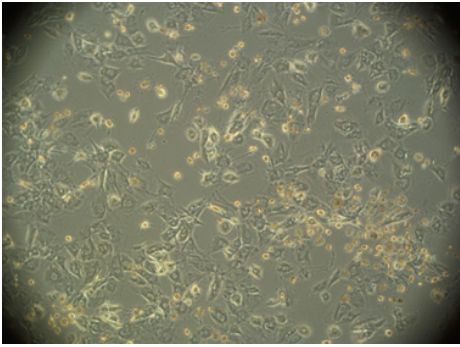
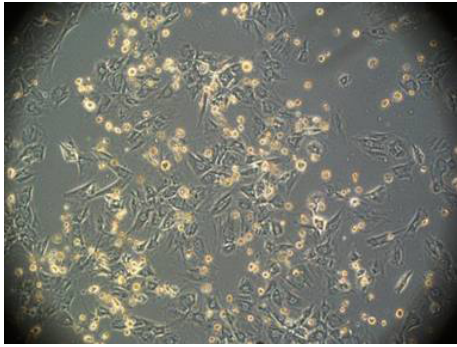
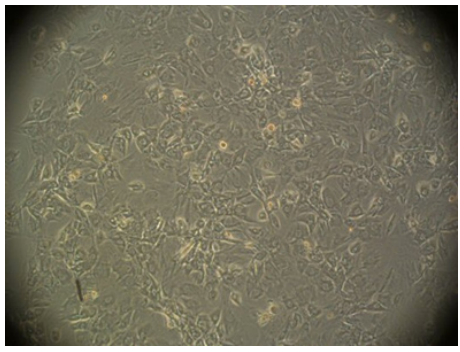
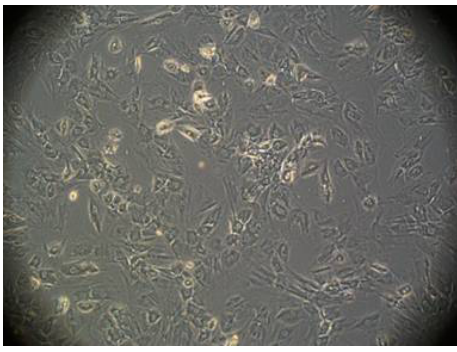
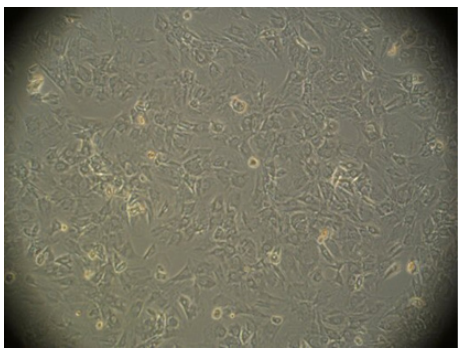
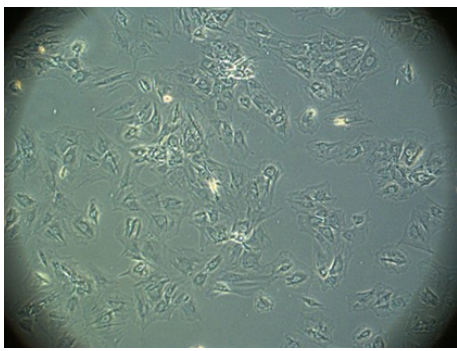
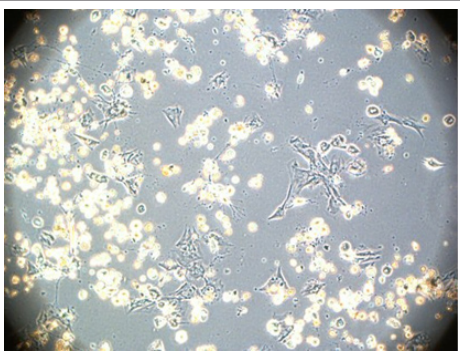
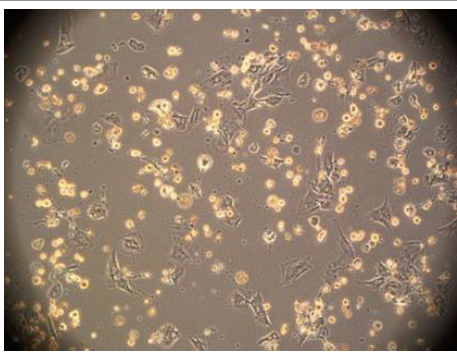
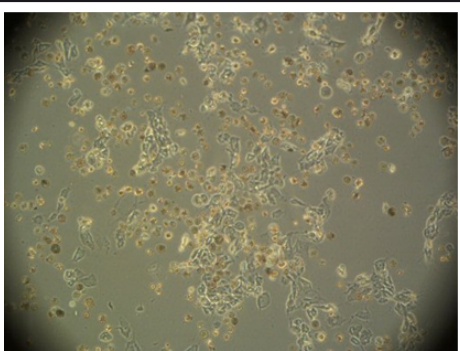
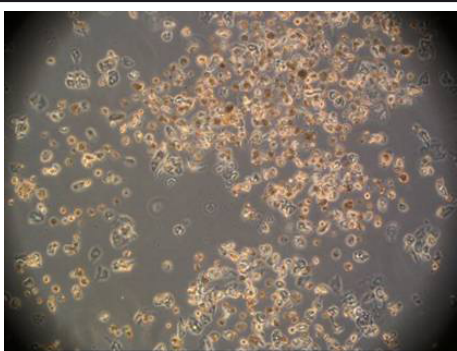
Obr. 54: Viability a při inkubaci rMSC s roztoky polymerů a se suspenzemi LSMO@SiO<sub>2</sub> s polymery. Výsledky pro odstředěné a neodstředěné suspenze. Inkubace s roztoky polymerů byly prováděny s jinou buněčnou linií, je proto třeba srovnávat vždy s příslušnou kontrolou.

naopak ukazují kultury zdravých dobře prosperujících buněk (viz Tab. 15).

Nejvhodnějším polymerem z testované série polymerů pro pokrývání LSMO@SiO<sub>2</sub> pro buněčné značení se tedy ukázal být PVP K25. Ačkoliv množství sklizených rMSC ani jejich viabilita nikterak výrazně nepřevyšovaly hodnoty ostatních polymerů při inkubaci samotným PVP K25, po obalení LSMO@SiO<sub>2</sub> tímto polymerem bylo sklizeno výrazně více buněk než v kontrolním vzorku. Počet sklizených buněk v přítomnosti zbylých polymerů byl výrazně nižší. Viabilita byla srovnatelná s kontrolním vzorkem, oproti dalším polymerům byla jen nepatrně větší (Tab. 14, Obr. 54). Mikroskopem pozorovaná morfologie buněk byla též velmi dobrá, ve vzorcích s PVP bylo velmi malé množství neadherovaných buněk.

Tab. 15: Mikroskopické snímky rMSC inkubovaných se suspenzemi LSMO@SiO<sub>2</sub> s polymery. Odstředěné a neodstředěné suspenze.



polymer	neodstředěná suspenze	odstředěná suspenze
dextran		
PVP K25		
PVP K90		
PEG		
PVA		

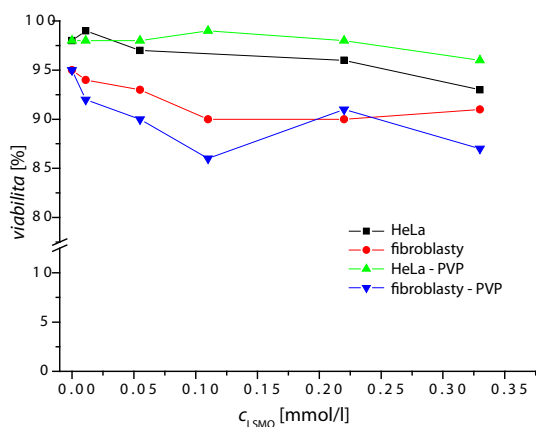
### 5.8.3 Buněčné studie s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> obaleným PVP

V této fázi byly obaleny na základě výsledků předchozího pokusu fluorescenční částice LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže M595.7) pomocí PVP K25. Byl zachován poměr polymer:LSMO i postup přípravy. Inkubace byly prováděny při různých koncentracích; pro srovnání byly provedeny i kultivace s nanočásticemi bez polymeru. Inkubovány byly jak rMSC, tak HeLa buňky a fibroblasty. K pokusům byla použita odstředěná suspenze bez přebytečného polymeru (podrobnosti viz Tab. 8).

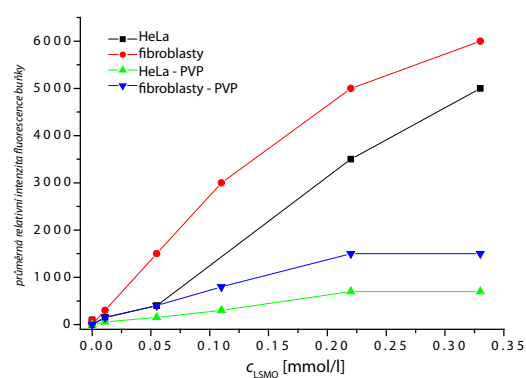
Inkubace částic LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> obalených PVP K25 (a odstředěných) s HeLa buňkami a fibroblasty poskytla srovnatelné viability buněk jako inkubace s neobalenými částicemi. Viabilita se ani v jednom případě (obalené/neobalené) s koncentrací příliš nemění (Obr. 55, Tab. 16). Hodnoty relativní střední fluorescence jedné buňky, které korespondují s množstvím internalizovaných fluorescenčních částic jsou u buněk inkubovaných s PVP pokrytými částicemi výrazně nižší než u inkubací s nepokrytými částicemi. Buňky tedy internalizují PVP pokryté částice

Tab. 16: Výsledky inkubací HeLa buněk a fibroblastů s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže M595.7) obaleným i neobaleným v PVP K25. Vzorky s nulovou koncentrací představují kontrolní vzorky.

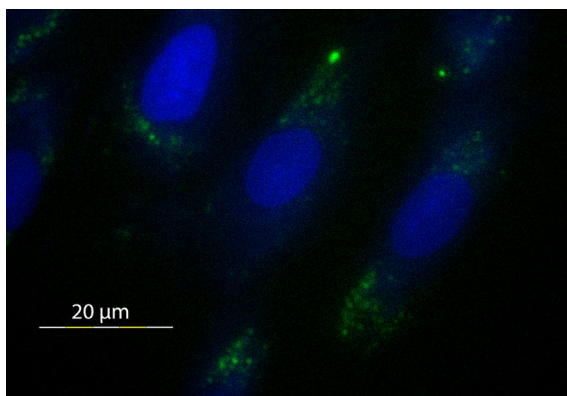
	buňky	C <sub>LSMO</sub> [mmol/l]	C <sub>Mn</sub> [mg/ml]	viabilita [%]	viabilita (poměr ke kontrole) [%]	relativní střední fluorescence buňky
neobalené PVP	HeLa	0	0	98	100	2
		0,011	0,60	99	100	150
		0,055	3,0	97	99	400
		0,22	12,1	96	98	3500
		0,33	18,1	93	95	5000
	fibroblasty	0	0	95	100	6
		0,011	0,60	94	99	300
		0,055	3,0	93	98	1500
		0,11	6,0	90	95	3000
		0,22	12,1	90	95	5000
		0,33	18,1	91	96	6000
	obalené PVP	HeLa	0	0	98	100
0,011			0,60	98	100	60
0,055			3,0	98	100	150
0,11			6,0	99	100	300
0,22			12,1	98	100	700
0,33			18,1	96	98	700
fibroblasty		0	0	95	100	6
		0,011	0,60	92	97	150
		0,055	3,0	90	95	400
		0,11	6,0	86	91	800
		0,22	12,1	91	96	1500
		0,33	18,1	87	91	1500



Obr. 55: Viability HeLa buněk a fibroblastů při inkubaci s PVP K25 obaleným a neobaleným LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže M595.7).



Obr. 56: Relativní průměrná fluorescence buněk ve FITC kanále; výsledky inkubací s PVP K25 obaleným a neobaleným LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže M595.7).



Obr. 57: Snímek (fluorescenční mikroskop) fibroblastů kultivovaných v médiu s PVP K25 obaleným LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>,  $c_{\text{LSMO}} = 0,33$  mmol/l. Modré skvrny: buněčná jádra označená DAPI, zelené skvrny: LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub>.

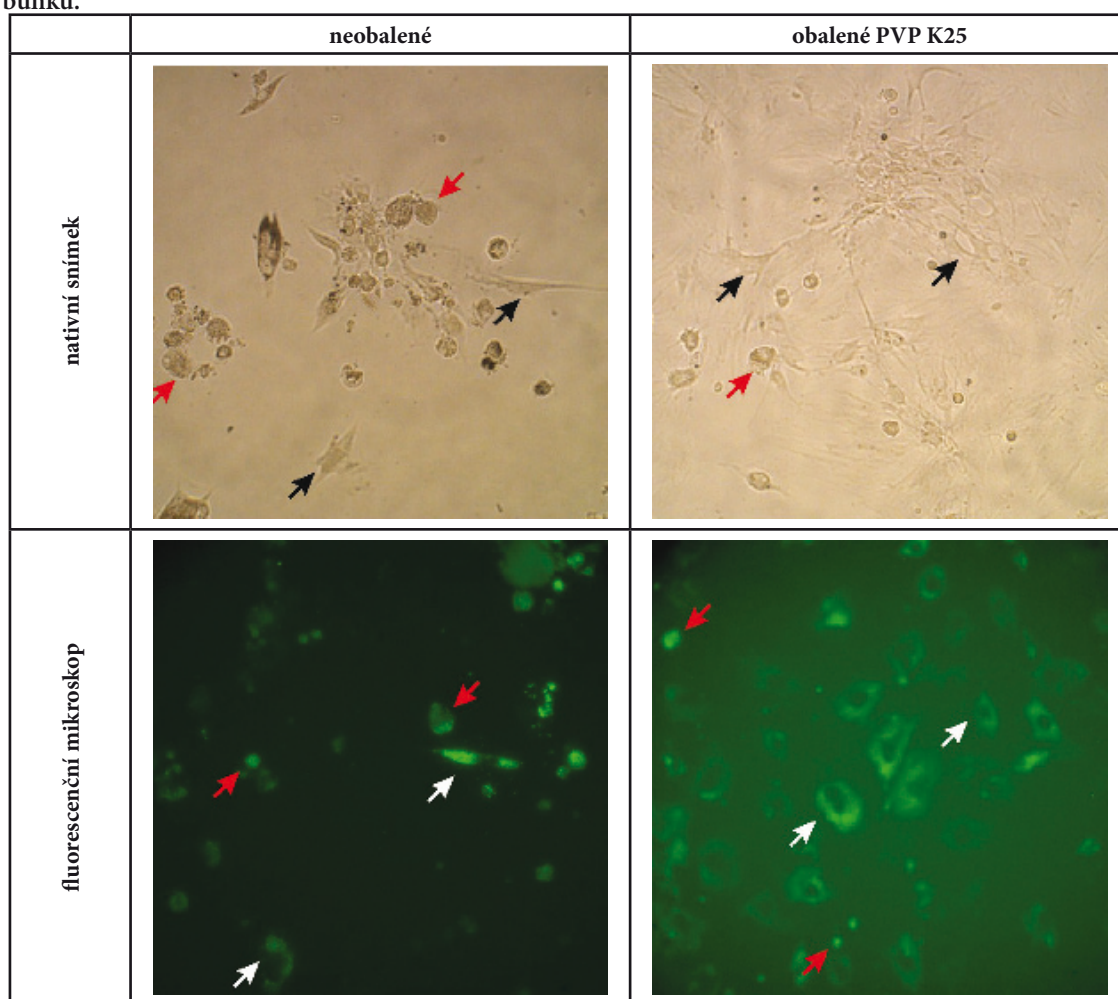
výrazně hůře, než nepokryté. U pokrytých nanočástic je navíc vidět jakási saturace, kdy zvýšení koncentrace nanočástic v živném médiu nevede k zvýšení internalizace těchto částic (Obr. 56, Tab. 16). Morfologie buněk pozorovaná fluorescenčním mikroskopem se nezměnila (Obr. 57).

Dále byla též provedena inkubace rMSC s LSMO@SiO<sub>2</sub>F@SiO<sub>2</sub> obaleným PVP K25 při různých koncentracích. Viability a zejména množství sklizených buněk byly v případě PVP obaleného produktu výrazně lepší, než v případě neobaleného (Tab. 17). Mikroskopické snímky ukazují, že při použití PVP obalených částic dostáváme jen velmi málo neadherovaných buněk, zatímco při použití neobalených částic je těchto buněk značné množství (Tab. 18). Připravené LSMO@SiO<sub>2</sub>F@SiO<sub>2</sub> částice mají tedy významně menší negativní vliv na rMSC, jsou-li dále obaleny PVP. Na základě pokusu s HeLa buňkami a fibroblasty je však možno se domnívat, že za omezením tohoto negativního vlivu pravděpodobně aspoň z části stojí snížená internalizace PVP obaleného produktu do buněk.

Tab. 17: Výsledky inkubací rMSC s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže M595.7) obaleným i neobaleným v PVP K25.

	$c_{\text{LSMO}}$ [mmol/l]	$c_{\text{Mn}}$ [mg/ml]	sklizeno [10 <sup>3</sup> buněk]	viabilita [%]	sklizeno (poměr ke kontrole) [%]	viabilita (poměr ke kontrole) [%]
neobalené PVP	0,011	0,60	50	88	50	90
	0,055	3,0	70	85	70	87
	0,11	6,0	80	89	80	91
	0,22	12,1	80	90	80	92
	0,33	18,1	60	89	60	91
obalené PVP	0,011	0,60	120	98	120	100
	0,055	3,0	110	96	110	98
	0,11	6,0	140	96	140	98
	0,22	12,1	100	92	100	94
	0,33	18,1	90	96	90	98
kontrola	0	0	100	98	100	100

Tab. 18: Mikroskopické (nativní a fluorescenční) snímky rMSC inkubovaných s LSMO@SiO<sub>2</sub>(F)@SiO<sub>2</sub> (šarže M595.7) obaleným i neobaleným v PVP K25. Snímky zobrazují buňky inkubované při  $c_{\text{LSMO}} = 0,11$  mmol/l. Černé a bílé šipky značí zdravé adherované buňky, červené šipky značí neadherované buňku.



## 6 Závěr

V rámci této diplomové práce byly nejprve změřeny optické vlastnosti nanočástic perovskitového manganitu  $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$  enkapsulovaného do křemičité vrstvy, které již dříve připravil O. Kaman.<sup>[86,88]</sup> Byla zjištěna velmi slabá fluorescence materiálu s  $\lambda_{\text{ex}} = 400$  nm a  $\lambda_{\text{em}} = 500$  nm. Pro použití ve fluorescenční mikroskopii byla intenzita fluorescence nedostatečná a ani dopováním perovskitové fáze europiem se jí nepodařilo zvýšit. Bylo tak nutno přistoupit k zabudování externí fluorescenční značky do křemičité vrstvy.

Částice  $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$  byby enkapsulovány PVP-metodou za využití směsi tetraethoxysilanu a triethoxysilanového fluoresceinového konjugátu. Molekuly fluoresceinu byly tedy kovalentně navázány do křemičitého obalu magnetického jádra. Vzniklé částice byly dále stabilizovány vytvořením další povrchové křemičité vrstvy, tentokrát již jen za použití tetraethoxysilanu.

Morfologie a velikost připravených fluorescenčních magnetických nanočástic byla charakterizována transmisí elektronovou mikroskopií a rozptylem světla. Velikost částic stanovená elektronovou mikroskopií byla přibližně 90 nm, hydrodynamická velikost určená rozptylem světla přibližně 150 nm. Tloušťka křemičité vrstvy byla 16 nm. Částice byly dále charakterizovány infračervenou spektroskopií. Optické vlastnosti byly zkoumány pomocí UV-Vis a luminiscenční spektroskopie; produkt vykazoval silnou fluorescenci způsobenou fluoresceinovými skupinami,  $\lambda_{\text{ex}} = 492$  nm a  $\lambda_{\text{em}} = 514$  nm. Povrchový náboj částic pomocí měření  $\zeta$ -potenciálu. RTG difrakce prokázala, že magnetické jádro během enkapsulace nepodléhá chemické změně a že během preparace dochází v důsledku použité enkapsulační techniky k odstranění nejmenších perovskitových částic a tím ke zvýšení střední velikosti krystalitu  $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$  z 20 na 26 nm.

Byly provedeny základní biologické testy připravené duální kontrastní látky. Inkubace s HeLa nádorovými buňkami a lidskými fibroblasty poskytly velmi dobré viability testovaných buněk přesahující 90 % a zejména prokázaly dobrou internalizaci materiálu do buněk. Inkubace s krysími mesenchymálními kmenovými buňkami, jako model pro potenciální značení lidských kmenových buněk, poskytly také dobré viability testovaných buněk přesahující 85 %, ačkoliv byly zjištěny jisté, dosud nevysvětlené morfologické změny části testovaných buněk. Inkubací pankreatických Langerhansových ostrůvků s připraveným materiálem byla zjištěna vitalita ostrůvků přibližně 80 %, statickými inkubacemi bylo prokázáno, že ostrůvky neztratily schopnost produkovat inzulin. Množství internalizovaného materiálu bylo dostatečné pro MR zobrazení *in vitro* vzorku ostrůvků.

Pro zlepšení biokompatibility vyrobených částic byl proveden pokus o adsorpci ve vodě rozpustných polymerů na povrch částic. Z vybrané sady polymerů poskytl nejlepší výsledky v oblas-

ti viability a změny morfologie kmenových buněk polyvinylpyrrolidon. Následné experimenty potvrdily též dobrou viabilitu HeLa buněk a fibroblastů. Zároveň však ukázaly na zmenšení internalizace polyvinylpyrrolidonem obalených částic do buněk.

Předkládaná diplomová práce byla již částečně prezentována na konferenci EuroNanoForum 2009 v Praze (viz příloha).



## 7 Seznam zkratek

APS	3-aminopropyltriethoxysilan
CA	kontrastní látka (Contrast Agent)
CLIO	sesíťované železité oxidy (Cross-linked Iron Oxide)
CMR	kolosální magnetorezistance
DLS	dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering)
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSA	<i>meso</i> -2,3-dimerkaptojantarová kyselina
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DRIFTS	infračervená spektra difúzní reflektance (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectra)
DTPA	diethylentriamin - <i>N,N,N',N',N''</i> -pentaoctová kyselina
EtOH	ethanol
FITC	fluoresceinisothiokyanát
<i>i</i> PrOH	<i>isopropanol</i>
LSMO	$\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$
MFH	magnetická fluidní hypertermie
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Imaging)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectroscopy)
NIR	blízká infračervená oblast (Near Infrared)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PEG	polyethylenglykol
PMI	<i>N</i> -(2,6-di- <i>isopropylfenyl</i> )-perylene-3,4-dikarboximid
PSA	polysialová kyselina
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
QD	kvantové tečky (Quantum Dots)

RITC	rhodaminisothiokyanát
rMSC	kryší mesenchymální kmenové buňky (Rat Mesenchymal Stem Cells)
SPIO	superparamagnetické nanočástice železitých oxidů (Superparamagnetic Iron Oxide)
SWNT	jednovrstvé uhlíkové nanotuby (Single Wall Nanotubes)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEOS	tetraethoxysilan
TLC	tenkovrstevná chromatografie (Thin Layer Chromatography)
USPIO	ultramalé superparamagnetické nanočástice železitých oxidů (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide)
UV-Vis	spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti

## 8 Literatura

- [1] G. Rose, *Annalen der Physik* **1839**, 124, 551.
- [2] J. H. Bernard, R. Rost, a kol., *Encyklopedický přehled minerálů*, Academia, Praha **1992**.
- [3] [www.mindat.org](http://www.mindat.org)
- [4] <http://wikis.lib.ncsu.edu/index.php/Perovskite>
- [5] F. A. Cotton, G. Wilkinson, *Anorganická chemie*, Academia, Praha **1973**
- [6] Y. Tokura, Y. Tomioka, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, 200, 1.
- [7] D. G. Porob, P. A. Maggard, *Journal of Solid State Chemistry* **2006**, 179, 1727.
- [8] C. R. Kagan, D. B. Mitzi, C. D. Dimitrakopoulos, *Science* **1999**, 286, 945.
- [9] M. Nikl, *Physica Status Solidi a-Applied Research* **2000**, 178, 595.
- [10] [http://en.wikipedia.org/wiki/Perovskite\\_\(structure\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Perovskite_(structure))
- [11] J. M. D. Coey, M. Viret, S. von Molnar, *Advances in Physics* **1999**, 48, 167.
- [12] R. Vonhelmolt, J. Wecker, B. Holzapfel, L. Schultz, K. Samwer, *Physical Review Letters* **1993**, 71, 2331.
- [13] [http://en.wikipedia.org/wiki/Collosal\\_magnetoresistance](http://en.wikipedia.org/wiki/Collosal_magnetoresistance)
- [14] R. M. Kusters, J. Singleton, D. A. Keen, R. McGreevy, W. Hayes, *Physica B* **1989**, 155, 362.
- [15] R. Sharma, C. J. Chen, *Journal of Nanoparticle Research* **2009**, 11, 671.
- [16] V. Uskokovic, A. Kosak, M. Drofenik, *International Journal of Applied Ceramic Technology* **2006**, 3, 134.
- [17] E. Pollert, K. Knizek, M. Marysko, P. Kaspar, S. Vasseur, E. Duguet, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, 316, 122.
- [18] S. Vasseur, E. Duguet, J. Portier, G. Goglio, S. Mornet, E. Hadova, K. Knizek, M. Marysko, P. Veverka, E. Pollert, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2006**, 302, 315.
- [19] A. Asamitsu, Y. Moritomo, Y. Tokura, *Physical Review B* **1996**, 53, R2952.
- [20] P. C. Lauterbur, *Nature* **1973**, 242, 190.
- [21] <http://nobelprize.org>
- [22] A. Filler, *Nature Precedings* **2009**, <<http://dx.doi.org/10.1038/npre.2009.3267.5>>
- [23] J. W. Akitt, B. E. Mann, *NMR and chemistry: An introduction to modern NMR spectroscopy*, Stanley Thornes Publisher, Cheltenham **2000**.
- [24] A. E. Merbach, E. Toth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Chichester **2001**.

- [25] E. Klarreich, *Nature* **2003**, 424, 873.
- [26] B. Driehuys, *Science* **2006**, 314, 432.
- [27] [www.celsense.com](http://www.celsense.com)
- [28] S. Aime, S. G. Crich, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, L. Tei, E. Terreno, *Coordination Chemistry Reviews* **2006**, 250, 1562.
- [29] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubicek, I. Lukes, *Dalton Transactions* **2008**, 3027.
- [30] S. K. Morcos, *European Journal of Radiology* **2008**, 66, 175.
- [31] <http://www.imaging.bayerhealthcare.com/index.html>
- [32] <http://md.gehealthcare.com>
- [33] <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
- [34] Y. X. J. Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin, *European Radiology* **2001**, 11, 2319.
- [35] Y. W. Jun, J. H. Lee, J. Cheon, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, 5122.
- [36] <http://www.mr-tip.com/serv1.php>
- [37] C. Corot, P. Robert, J. M. Idee, M. Port, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 1471.
- [38] A. H. Lu, E. L. Salabas, F. Schuth, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, 1222.
- [39] C. W. Jung, P. Jacobs, *Magnetic Resonance Imaging* **1995**, 13, 661.
- [40] D. Horak, M. Babic, P. Jendelova, V. Herynek, M. Trchova, K. Likavcanova, M. Kapcalova, M. Hajek, E. Sykova, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, 321, 1539.
- [41] M. Babic, D. Horak, M. Trchova, P. Jendelova, K. Glogarova, P. Lesny, V. Herynek, M. Hajek, E. Sykova, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, 19, 740.
- [42] M. Rohrer, H. Bauer, J. Mintorovitch, M. Requardt, H. J. Weinmann, *Investigative Radiology* **2005**, 40, 715.
- [43] G. H. Simon, J. Bauer, O. Saborovski, Y. J. Fu, C. Corot, M. F. Wendland, H. E. Daldrup-Link, *European Radiology* **2006**, 16, 738.
- [44] M. Babic, D. Horak, P. Jendelova, K. Glogarova, V. Herynek, M. Trchova, K. Likavcanova, P. Lesny, E. Pollert, M. Hajek, E. Sykova, *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20, 283.
- [45] D. Horak, M. Babic, P. Jendelova, V. Herynek, M. Trchova, Z. Pientka, E. Pollert, M. Hajek, E. Sykova, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, 18, 635.
- [46] F. Bertorelle, C. Wilhelm, J. Roger, F. Gazeau, C. Menager, V. Cabuil, *Langmuir* **2006**, 22, 5385.

- [47] A. Aqil, S. Vasseur, E. Duguet, C. Passirani, J. P. Benoit, A. Roch, R. Muller, R. Jerome, C. Jerome, *European Polymer Journal* **2008**, *44*, 3191.
- [48] H. L. Ma, X. T. Qi, Y. Maitani, T. Nagai, *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *333*, 177.
- [49] I. Rabias, H. Pratsinis, G. Drossopoulou, M. Fardis, T. Maris, N. Boukos, N. Tsotakos, D. Kletsas, E. Tsilibary, G. Papavassiliou, *Biomicrofluidics* **2007**, *1*, 12.
- [50] H. W. He, H. J. Liu, K. C. Zhou, W. Wang, P. F. Rong, *Journal of Central South University of Technology* **2006**, *13*, 6.
- [51] Y. S. Lin, S. H. Wu, Y. Hung, Y. H. Chou, C. Chang, M. L. Lin, C. P. Tsai, C. Y. Mou, *Chemistry of Materials* **2006**, *18*, 5170.
- [52] J. Kim, H. S. Kim, N. Lee, T. Kim, H. Kim, T. Yu, I. C. Song, W. K. Moon, T. Hyeon, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 8438.
- [53] T. J. Yoon, K. N. Yu, E. Kim, J. S. Kim, B. G. Kim, S. H. Yun, B. H. Sohn, M. H. Cho, J. K. Lee, S. B. Park, *Small* **2006**, *2*, 209.
- [54] S. J. Cho, B. R. Jarrett, A. Y. Louie, S. M. Kauzlarich, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 640.
- [55] T. A. Larson, J. Bankson, J. Aaron, K. Sokolov, *Nanotechnology* **2007**, *18*.
- [56] J. M. Shin, R. M. Anisur, M. K. Ko, G. H. Im, J. H. Lee, I. S. Lee, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 321.
- [57] M. D. Shultz, S. Calvin, P. P. Fatouros, S. A. Morrison, E. E. Carpenter, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *311*, 464.
- [58] J. Lu, S. L. Ma, J. Y. Sun, C. C. Xia, C. Liu, Z. Y. Wang, X. N. Zhao, F. B. Gao, Q. Y. Gong, B. Song, X. T. Shuai, H. Ai, Z. W. Gu, *Biomaterials* **2009**, *30*, 2919.
- [59] J. Giri, P. Pradhan, V. Somani, H. Chelawat, S. Chhatre, R. Banerjee, D. Bahadur, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2008**, *320*, 724.
- [60] J. T. Jang, H. Nah, J. H. Lee, S. H. Moon, M. G. Kim, J. Cheon, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 1234.
- [61] S. Maenosono, T. Suzuki, S. Saita, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2008**, *320*, L79.
- [62] J. H. Gao, G. L. Liang, J. S. Cheung, Y. Pan, Y. Kuang, F. Zhao, B. Zhang, X. X. Zhang, E. X. Wu, B. Xu, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 11828.
- [63] Y. H. Xu, H. M. Bai, J. P. Wang, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *311*, 131.
- [64] [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)
- [65] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, London **2008**.

- [66] J. Kim, Y. Piao, T. Hyeon, *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, 372.
- [67] S. A. Corr, Y. P. Rakovich, Y. K. Gun'ko, *Nanoscale Research Letters* **2008**, 3, 87.
- [68] L. Josephson, M. F. Kircher, U. Mahmood, Y. Tang, R. Weissleder, *Bioconjugate Chemistry* **2002**, 13, 554.
- [69] Y. Q. Ge, Y. Zhang, S. Y. He, F. Nie, G. J. Teng, N. Gu, *Nanoscale Research Letters* **2009**, 4, 287.
- [70] V. Holzapfel, M. Lorenz, C. K. Weiss, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailander, *Journal of Physics-Condensed Matter* **2006**, 18, S2581.
- [71] O. Veiseh, C. Sun, J. Gunn, N. Kohler, P. Gabikian, D. Lee, N. Bhattarai, R. Ellenbogen, R. Sze, A. Hallahan, J. Olson, M. Q. Zhang, *Nano Letters* **2005**, 5, 1003.
- [72] C. W. Lu, Y. Hung, J. K. Hsiao, M. Yao, T. H. Chung, Y. S. Lin, S. H. Wu, S. C. Hsu, H. M. Liu, C. Y. Mou, C. S. Yang, D. M. Huang, Y. C. Chen, *Nano Letters* **2007**, 7, 149.
- [73] J. H. Lee, Y. W. Jun, S. I. Yeon, J. S. Shin, J. Cheon, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 8160.
- [74] C. Xu, J. Xie, D. Ho, C. Wang, N. Kohler, E. G. Walsh, J. R. Morgan, Y. E. Chin, S. Sun, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, 173.
- [75] S. T. Selvan, P. K. Patra, C. Y. Ang, J. Y. Ying, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, 2448.
- [76] M. Nahrendorf, H. W. Zhang, S. Hembrador, P. Panizzi, D. E. Sosnovik, E. Aikawa, P. Libby, F. K. Swirski, R. Weissleder, *Circulation* **2008**, 117, 379.
- [77] H. Lee, M. K. Yu, S. Park, S. Moon, J. J. Min, Y. Y. Jeong, H. W. Kang, S. Jon, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 12739.
- [78] J. Wu, Z. Q. Ye, G. L. Wang, J. L. Yuan, *Talanta* **2007**, 72, 1693.
- [79] J. H. Choi, F. T. Nguyen, P. W. Barone, D. A. Heller, A. E. Moll, D. Patel, S. A. Boppart, M. S. Strano, *Nano Letters* **2007**, 7, 861.
- [80] J. S. Choi, Y. W. Jun, S. I. Yeon, H. C. Kim, J. S. Shin, J. Cheon, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 15982.
- [81] J. Guo, W. L. Yang, C. C. Wang, J. He, J. Y. Chen, *Chemistry of Materials* **2006**, 18, 5554.
- [82] [http://en.wikipedia.org/wiki/Surface\\_plasmon\\_resonance](http://en.wikipedia.org/wiki/Surface_plasmon_resonance)
- [83] Y. W. Duan, X. L. Kou, J. G. Li, *Physica B-Condensed Matter* **2005**, 355, 250.
- [84] R. Rajagopal, J. Mona, S. N. Kale, T. Bala, R. Pasricha, P. Poddar, M. Sastry, B. L. V. Prasad, D. C. Kundaliya, S. B. Ogale, *Applied Physics Letters* **2006**, 89.

- [85] K. R. Bhayani, S. N. Kale, S. Arora, R. Rajagopal, H. Mamgain, R. Kaul-Ghanekar, D. C. Kundaliya, S. D. Kulkarni, R. Pasricha, S. D. Dhole, S. B. Ogale, K. M. Paknikar, *Nanotechnology* **2007**, 18.
- [86] O. Kaman, *Disertační práce*, Praha **2009**.
- [87] O. Kaman, *ústní sdělení*, Praha **2009**.
- [88] O. Kaman, E. Pollert, P. Veverka, M. Veverka, E. Hadova, K. Knizek, M. Marysko, P. Kaspar, M. Klementova, V. Grunwaldova, S. Vasseur, R. Epherre, S. Mornet, G. Goglio, E. Duguet, *Nanotechnology* **2009**, 20.
- [89] W. Stober, A. Fink, E. Bohn, *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, 26, 62.
- [90] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Oxford **1988**.
- [91] W. Rasband, *ImageJ, version 1.37a* **2006** National Institute of Metal Health, Bethesda.
- [92] J. Berčík, D. Bustin, J. Čerňák, J. Garaj, J. Štefanec, M. Traiter, *Fyzikálne a fyzikálno-chemické analytické metódy*, Alfa, Bratislava **1977**
- [93] J. Rodriguez-Carvajal 2008 FullProf.2k (Version 4.30-Apr2008-ILL JRC).
- [94] *Inorganic Crystal Structure Database, version 2008* **2008** National Institute of Standards and Technology (NIST) and Fachinformationszentrum Karlsruhe (FIZ).
- [95] J. Pitra, V. Zoula, *ČS patent 201892*, Praha **1980**.
- [96] A. Alemi, E. Karimpour, H. Shokri, *Bulletin of Materials Science* **2008**, 31, 967.
- [97] R. D. Shannon, *Acta Crystallographica Section A* **1976**, 32, 751.
- [98] Y. Tadokoro, Y. J. Shan, T. Nakamura, S. Nakamura, *Solid State Ionics* **1998**, 108, 261.
- [99] T. Matsumoto, M. Miki, K. Kojima, N. Wada, *Journal of Materials Research* **2008**, 23, 1443.
- [100] M. Bele, O. Siiman, E. Matijevic, *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, 254, 274.
- [101] A. T. Heitsch, D. K. Smith, R. N. Patel, D. Ress, B. A. Korgel, *Journal of Solid State Chemistry* **2008**, 181, 1590.
- [102] M. P. Lettinga, M. van Zandvoort, C. M. van Kats, A. P. Philipse, *Langmuir* **2000**, 16, 6156.
- [103] A. Imhof, M. Megens, J. J. Engelberts, D. T. N. de Lang, R. Sprik, W. L. Vos, *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 1408.
- [104] A. Vanblaaderen, A. Vrij, *Langmuir* **1992**, 8, 2921.

- [105] M. Liu, Z. Y. Liu, Q. Lu, H. Yuan, L. Ma, J. H. Li, Y. B. Bai, T. J. Li, *Chinese Journal of Chemistry* **2005**, *23*, 875.
- [106] H. Schmidt, H. Scholze, A. Kaiser, *Journal of Non-Crystalline Solids* **1984**, *63*, 1.
- [107] J. E. Brinchmann, *Journal of the Neurological Sciences* **2008**, *265*, 127.
- [108] P. J. Reddig, R. L. Juliano, *Cancer and Metastasis Reviews* **2005**, *24*, 425.
- [109] Z. Berkova, J. Kriz, P. Girman, K. Zacharovova, T. Koblas, E. Dovolilova, F. Saudek, *Transplantation Proceedings* **2005**, *37*, 3496.
- [110] Z. Berkova, D. Jirak, K. Zacharovova, J. Kriz, A. Lodererova, P. Girman, T. Koblas, E. Dovolilova, M. Vancova, M. Hajek, F. Saudek, *Transplantation* **2008**, *85*, 155.
- [111] D. Jirak, J. Kriz, V. Herynek, B. Andersson, P. Girman, M. Burian, F. Saudek, M. Hajek, *Magnetic Resonance in Medicine* **2004**, *52*, 1228.





# Fluorescent magnetic nanoparticles for bimodal cellular labelling



M. Kačenka<sup>1,2\*</sup>, O. Kaman<sup>1,2</sup>, J. Kotek<sup>2</sup>, I. Řehoř<sup>2</sup>, L. Falteisek<sup>3</sup>, J. Černý<sup>3</sup>, J. Kupčík<sup>4</sup>, P. Jendelová<sup>5</sup>, I. Lukes<sup>2</sup>, E. Pollert<sup>1</sup>

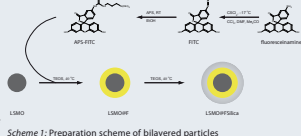
<sup>1</sup>Institute of Physics AS CR, v.v.i., Cukrovarnická 10, 162 53 Prague 6, Czech Republic  
<sup>2</sup>Department of Inorganic Chemistry, Charles University in Prague, Hlavova 8, 128 40 Prague 2, Czech Republic  
<sup>3</sup>Department of Cell Biology, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic  
<sup>4</sup>Institute of Inorganic Chemistry AS CR, v.v.i., Řež 1901, 250 68 Řež u Prahy, Czech Republic  
<sup>5</sup>Institute of Experimental Medicine AS CR, v.v.i., Viděňská 1983, 142 20 Prague 4, Czech Republic

\*corresponding author: kacenka@fzu.cz

Silica coated magnetic nanoparticles of perovskite phase  $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$  (LSMO@SiO<sub>2</sub>) are promising material for magnetically induced hyperthermia due to the high heating efficiency, adjustability of the Curie temperature and the stable shell that separates magnetic oxide core from the biological system. Besides, the relaxometric studies of LSMO@SiO<sub>2</sub> suspension revealed high values of relaxivity  $r_{2\rho}$  related to the final contrast in MRI, exceeding the one of iron oxide nanoparticles.<sup>[1,2]</sup> Modifying such magnetic particles with fluorescent dyes is leading to bimodal fluorescent-MRI contrast agents suitable for cellular labelling. Labelled cells can be investigated *in vitro* by means of fluorescence microscopy and after injection to an organism tracked *in vivo* by MRI.

### Synthesis

Fluorescein isothiocyanate (FITC) was prepared by treating fluoresceinamine with  $\text{CSCl}_2$  in a cold mixture of  $\text{CCl}_4$ , DMF and acetone. Resulting FITC was conjugated with 1 eq. of 3-aminopropyltriethoxysilane (APS) in anhydrous EtOH. Conversion of APS was determined by <sup>1</sup>H NMR being approx. 50 %. Magnetic nanoparticles  $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$  (LSMO) prepared by previously described procedure<sup>[2]</sup> were encapsulated in two steps employing PVP method. The encapsulation occurred in a mixture of EtOH and aqueous ammonia. Fluorescent layer was formed during the first step, involving condensation of a mixture of TEOS, complex triethoxysilane APS-FITC and unreacted APS. Resulting intermediate LSMO@F was thereafter subject to the further encapsulation performed by TEOS addition into the original reaction mixture after several hours. This was leading to the final product LSMO@FSilica with pure silica layer on the surface of particles.



Scheme 1: Preparation scheme of bilayered particles

### Size, morphology and colloidal stability

TEM of both LSMO@F (Fig. 1) and LSMO@FSilica (Fig. 2) shows well separated individual particles coated with shell of uniform thickness. LSMO@F has magnetic cores covered by approx. 12 nm thick fluorescent shell, whereas the total thickness of the whole shell of LSMO@FSilica is approx. 20 nm. DLS measurement (Fig. 4) of LSMO@FSilica revealed narrow distribution of hydrodynamic radius with the mean value approx. 71 nm. LSMO@FSilica forms colloiddally very stable

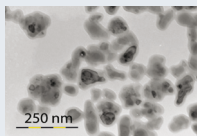


Fig. 1: LSMO@F - TEM image

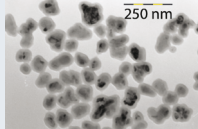


Fig. 2: LSMO@FSilica - TEM image

water suspensions. This is confirmed by the dependence of  $\zeta$ -potential on pH (Fig. 3).  $\zeta$ -potential at physiological pH is nearly -40 mV while isoelectric point (IEP) lies near  $\text{pH} \approx 2.5$ . On the contrary LSMO@F does not exhibit good colloidal stability neither in water nor in EtOH. While noticeable fluorescein leaching from LSMO@F occurs within several hours

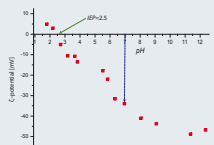


Fig. 3: pH dependence of  $\zeta$ -potential of LSMO@FSilica

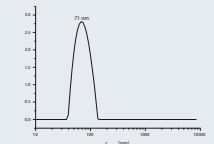


Fig. 4: Distribution of hydrodynamic radii obtained from DLS

no such leaching from LSMO@FSilica was observed even after one week of storage. That indicates good durability of the outer silica shell. DRIFTS IR spectra confirm presence of silica surface layer. LSMO@F also shows significant LSMO band. LSMO@FSilica possess considerably weaker LSMO band indicating thicker silica layer shielding LSMO core (Fig 5).

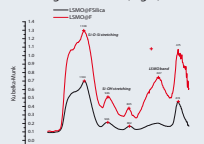


Fig. 5: DRIFTS spectra

### Optical properties

Coating of black LSMO particles by transparent silica (Fig. 6) does not affect absorbing properties significantly. Therefore high load of fluorescent dye is necessary for obtaining sufficient fluorescence. Presence of fluorescein moiety was indicated by weak absorption band of fluorescein in the UV-Vis spectrum of the LSMO@FSilica (Fig. 7). Fluorescent properties were investigated by luminescence spectroscopy. Spectra of both LSMO@F and LSMO@FSilica were almost identical possessing typical FITC-conjugate parameters: excitation max. 492 nm and emission max. 515 nm (Fig. 8).



Fig. 6: LSMO@FSilica water suspension,  $c_{\text{LSMO}} = 1.5 \text{ mmol/l}$

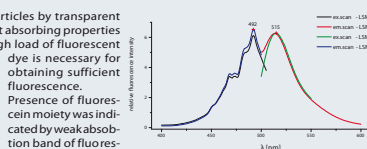


Fig. 8: Excitation and emission spectra of LSMO@F and LSMO@FSilica

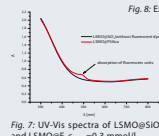


Fig. 7: UV-Vis spectra of LSMO@SiO<sub>2</sub> and LSMO@F,  $c_{\text{LSMO}} = 0.3 \text{ mmol/l}$

### Biological experiments

HeLa cells and normal human skin fibroblasts were cultivated for 48 h in DMEM medium containing different concentrations of LSMO@FSilica. At the end of incubation time, the medium with dead and unadherent cells was collected. Adherent cells were harvested quantitatively using trypsin/EDTA solution. The vital staining with propidium iodide was performed and dead/living cells ratio was determined by flow cytometry. Viability (dead/living cells ratio) of both cell types was high even in high concentration of the LSMO@FSilica. (Fig. 9, Table 1). Average relative nanoparticles fluorescence intensity in one cell was also determined by flow cytometry. It increases with increasing concentration of LSMO@FSilica in cultivation media and therefore the cellular uptake is obviously proportional to nanoparticle concentration. Additionally, the uptake by fibroblasts is significantly higher than the uptake of HeLa cells (Fig. 10). Fluorescence microscopy confirmed the observed relation between uptake and concentration as well as showed that the nanoparticles seem to be accumulated in organelles with late endosomal/lysosomal pattern.

Figure 9: Cell viabilities in the presence of various concentrations of LSMO@FSilica

$c_{\text{LSMO}}$ (mmol/l)	$c_{\text{LSMO}}$ (µg/ml)	HeLa viability	fibroblasts viability
0	0	97%	96%
0.011	0.6	96%	93%
0.055	3.0	94%	91%
0.11	6.0	90%	92%
0.22	12.1	88%	85%
0.33	18.1	85%	91%

Table 1: Cell viabilities in the presence of various concentration of LSMO@FSilica

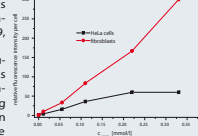


Fig. 10: Average intensity of cell fluorescence of cells cultivated in the presence of various concentrations of LSMO@FSilica

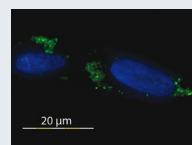


Figure 11: Fluorescence microscopy image of labelled fibroblasts - cultivated in 0.055 mmol/l LSMO. Blue spots - DAPI stained nuclei, green spots - LSMO@FSilica

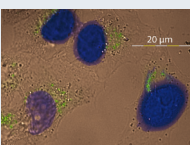


Figure 12: Overlap of fluorescence microscopy image and bright field microscopy image of labelled HeLa cells - cultivated in 0.011 mmol/l (upper image) and 0.33 mmol/l (lower image) LSMO. Blue spots - DAPI stained nuclei, green spots - LSMO@FSilica

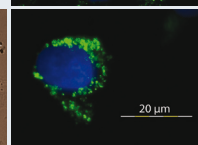


Figure 13: Fluorescence microscopy image of labelled HeLa cells - cultivated in 0.011 mmol/l (upper image) and 0.33 mmol/l (lower image) LSMO. Blue spots - DAPI stained nuclei, green spots - LSMO@FSilica

### Conclusions

The new two step procedure of encapsulation of oxide nanoparticles leading to the fluorescent and colloiddally stable particles were developed. It involves formation of the fluorescent shell in the first step. The resulting particles, however, exhibit low colloidal stability in water at neutral pH due to the fluorescein and particularly due to the presence of free amino-groups. Therefore the particles are subsequently coated in the second step by a thin secondary silica layer. The resulting product exhibits high colloidal stability in water with  $\zeta$ -potential dependence similar to that of the silica nanoparticles. TEM and DLS showed good morphology of the product. The IR, UV-Vis and luminescence spectra proved expected chemical nature of the product and all the expected moieties. Furthermore, HeLa cells and fibroblasts were cultivated in presence of LSMO@FSilica at different concentration and according to flow-cytometry proved high viability. LSMO internalization was confirmed by fluorescence microscopy.

### References

[1] Pollert E., Křížek K. et al., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2007**, 316, 122  
 [2] Kaman O., Pollert E. et al., *Nanotechnology*, **2009**, (in print)

### Acknowledgement

The support by projects AS CR KAN20020061, KAN201110651 and KAN20110651 is gratefully acknowledged.

## Poděkování

Závěrem své práce bych rád poděkoval všem, kteří jakkoliv přispěli k jejímu vytvoření, a dále všem ostatním, kteří trpěli jejím tvořením. Dvojnásob si to zaslouží ti, kteří se ocitli v obou zmíněných skupinách.

Především děkuji svému konzultantovi Ondrovi Kamanovi za to, že mě zasvětil do tajů přípravy nanočástic. Děkuji za strhující spolupráci, za četné rady, připomínky a konzultace v kteroukoliv denní či noční dobu.

Děkuji svému školiteli Honzovi Kotkovi zejména za přívětivé vedení a spoustu podnětných nápadů a konzultací.

Děkuji svým dvěma nejvyšším šéfům, prof. Lukešovi a doc. Pollertovi, za vytvoření záze-  
mí pro moji práci a za nespočetné rady a připomínky k témuž.

Děkuji Dr. Jaroslavu Kupčíkovi za měření TEM.

Děkuji Lukáši Falteiskovi provedení buněčných pokusů a rady z oblasti mikroskopie.

Děkuji Danu Jirákovu za inkubace Langerhansových ostrůvků a jejich MR zobrazení.

Děkuji Dr. Pavle Jendelové za provedení pokusů s kmenovými buňkami.

Děkuji Dagmar Zemanové za obětavé rozklady perovskitů prováděných za krajně nezávi-  
děňhodných podmínek.

Děkuji Dr. Karlu Knížkovi za měření RTG difrakce.

Děkuji Mirkovi za měření MS spekter.

Děkuji Borisovi za množství rad v oblasti obrazové analýzy a počítačové grafiky poskyto-  
vaných dnem i nocí.

Zároveň děkuji i výše nejmenovanému osazenstvu laboratoří „19“ na PřF a „LOM“ na FZÚ za  
přátelskou atmosféru a zejména za toleranci k pozůstatkům mojí práce nacházeným v přísluš-  
ných laboratořích.

Také děkuji všem svým kamarádům, kteří mi během mé práce obětavě pomáhali v zaplňování  
prázdných stránek v pasu a tím pečovali o moje duševní zdraví.

Za trpělivost a shovívavost s vrtochy bláznivého chemika též děkuji tajemné kamarádce E.

Na závěr bych rád poděkoval svým rodičům za všestrannou podporu, trpělivost a pochopení.