

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Příprava multimodálních biokompatibilních nanokompozitů

Autor práce: Bc. Jindřich Fleišmann  
Vedoucí práce: Ing. Xenie Popovič, Ph.D.  
Konzultant: doc. Ing. Václav Čuba, Ph.D.  
Školní rok: 2021/2022

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl veškerou použitou literaturu.

V Praze dne

.....

Tímto bych rád poděkoval Ing. Xenii Popovič, Ph.D. za veškerý čas a úsilí, které mi věnovala při tvorbě této diplomové práce, ať už ve formě hodnotných konzultací či ve formě pomoci a rad při laboratorní práci a zpracování dat. Nemalé poděkování patří i doc. Ing. Václavu Čubovi, Ph.D., Ing. Janu Bártovi, Ph.D. a Ing. Ivetě Terezii Hošnové za přínosné konzultace. Sluší se poděkovat i Ing. Ivu Jakubcovi, CSc. a Ing. Mgr. Ondřeji Kamanovi, Ph.D. za pořízení snímků na elektronovém mikroskopu a Ing. Lence Prouzové Procházkové, Ph. D. za změření radioluminiscenčních spekter a pomoc při jejich interpretaci. Ing. Kateřině Fialové a Ing. Marii Skálové děkuji za změření infračervených spekter, dík náleží i francouzskému institutu INSERM za provedení toxikologických studií.

Tato diplomová práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (číslo grantu: GA20-06374S), Studentskou grantovou soutěží (číslo grantu: SGS20/185/OHK4/3T/14) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (číslo grantu: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000778).

*Název práce:* Příprava multimodálních biokompatibilních nanokompozitů

*Autor:* Bc. Jindřich Fleišmann

*Obor:* Jaderně chemické inženýrství

*Druh práce:* Diplomová práce

*Vedoucí práce:* Ing. Xenie Popovič, Ph.D.

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

*Abstrakt:*

Fotochemickou metodou byly připraveny nanočástice  $\text{Lu}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$  dopované  $\text{Pr}^{3+}$  ( $\text{LuAG:Pr}^{3+}$ ), které byly dále modifikovány vrstvou  $\text{SiO}_2$ , protoporfyrinu IX (PpIX) a biokompatibilními sloučeninami polyethylenglykolem (PEG), resp. kyselinou listovou (FA). Pozornost byla zaměřena na optimalizaci syntézy nanokompozitu, a to především z hlediska způsobu oddělení gelu z ozařovaného roztoku a teploty kalcinace prekurzoru. Připravený nanokompozit byl charakterizován za pomoci několika metod. Rentgenová difrakce (XRD) potvrdila fázovou čistotu nanočástic, která byla zachována i po modifikaci povrchu těchto nanočástic. Přítomnost obalových materiálů ( $\text{SiO}_2$ , PEG, PpIX) na povrchu nanočásticového jádra byla prokázána za použití infračervené spektroskopie (FTIR). Snímky morfologie připraveného nanokompozitu poskytla transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Dále byl zkoumán vliv modifikace povrchu nanočástic na intenzitu radioluminiscence jako klíčové vlastnosti pro případnou aplikaci ve fotodynamické terapii buzené rentgenovým zářením (X-PDT). Zároveň byl proveden experiment studující vymývání fotosenzitivního PpIX z povrchu nanokompozitu.

*Klíčová slova:* LuAG, biokompatibilizace, pegylace, X-PDT

*Title:* Preparation of multimodal biocompatible nanocomposites

*Author:* Bc. Jindřich Fleišmann

*Abstract:*

Lu<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub> doped Pr<sup>3+</sup> (LuAG:Pr<sup>3+</sup>) nanoparticles were synthesised using photochemical method. These nanoparticles were further modified with SiO<sub>2</sub>, protoporphyrin IX (PpIX) and poly(ethylene)glycol (PEG) or folic acid (FA). The main focus of the thesis was the optimalization of the synthesis, especially in terms of separation procedure of the gel from the irradiated solution and the precursor calcination temperature. The prepared nanocomposite was characterised using various methods - X-Ray diffraction (XRD) confirmed phase purity of the nanoparticles which was not altered by surface modification; the presence of coating materials (SiO<sub>2</sub>, PpIX, PEG) was proven using infrared spectroscopy (FTIR); morphology of the prepared materials was observed through transmission electron microscopy (TEM). The effect of coating on the radioluminescence of the nanocomposite was examined as well as the washing out of the PpIX from the surface in the physiological conditions.

*Key words:* LuAG, biocompatibilization, pegylation, X-PDT

## Seznam zkratek

ALA	kyselina 5-aminolevulová
APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
ATR	attenuated total reflectance (zeslabený úplný odraz)
BGO	$\text{Bi}_4\text{Ge}_3\text{O}_{12}$
DMSO	dimethylsulfoxid
DOTA	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
DTG	diferenciální termogravimetrie
DTPA	kyselina diethylentriaminpentaoctová
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid
EPR	enhanced permeability and retention
FA	folic acid (kyselina listová)
FL	fotosenzitivní látka
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
FWHM	full width at half maximum (šířka v polovině výšky)
ISC	intersystem crossing (mezisystémový přechod)
LuAG:Pr <sup>3+</sup> @SiO <sub>2</sub> -PpIX-PEG	Lu <sub>3</sub> Al <sub>5</sub> O <sub>12</sub> dopovaný Pr <sup>3+</sup> obalený SiO <sub>2</sub> , PpIX a PEG
NHS	N-hydroxysukcinimid
NIR	blízká infračervené oblasti
NOTA	kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová
PBS	fosfátový pufr
PDT	fotodynamická terapie
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PpIX	protoporfyrin IX
RES	retikuloendoteliální systém
RL	radioluminiscence
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TEA	triethylamin

TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEOS	tetraethylortosilikát
TETA	triethylentetraamin
TG	termogravimetrie
THF	tetrahydrofuran
X-PDT	fotodynamická terapie buzená rentgenovými paprsky
XRD	prášková difrakce

# Obsah

Seznam zkratk	8
Obsah	10
1. Úvod	12
2. Teoretická část	14
2.1. Nanočásticové jádro	14
2.2. Fotosenzitivní látka	15
2.2.1. Protoporfyrin IX	15
2.2.2. Jiné fotosenzitivní látky	17
2.3. Biokompatibilita	18
2.3.1. Pegylace	18
2.3.2. Další způsoby biokompatibilizace	20
2.4. Cílení	21
2.4.1. Pasivní cílení	21
2.4.2. Aktivní cílení	22
2.5. Využití nanokompozitu	22
2.5.1. Fotodynamická terapie	22
2.5.2. Další možnosti využití	23
3. Experimentální část	25
3.1. Kalcinace	25
3.2. Lyofilizace	25
3.3. Mletí vzorků	26
3.4. Rentgenová difrakce	26
3.5. Termoanalýza	27
3.6. Radioluminiscence	27
3.7. Infračervená spektroskopie	28
3.8. Elektronová mikroskopie	28
3.9. UV/VIS spektrofotometrie	29
3.10. Měření povrchů	29
3.11. Příprava nanokompozitu	29
3.11.1. Nanočásticové jádro	29
3.11.2. Obalování vrstvou SiO <sub>2</sub>	30
3.11.3. Funkcionalizace nanokompozitu navázáním PpIX	31
3.11.4. Biokompatibilizace	31



3.12. Určení míry vymývání PpIX ve fyziologickém prostředí.....	31
4. Výsledky a jejich diskuze.....	32
4.1. Optimalizace syntézy .....	32
4.1.1. Intenzita radioluminiscence.....	32
4.1.2. Fázová čistota .....	33
4.1.3. Velikost částic .....	33
4.2. Modifikace povrchu nanočásticového jádra.....	35
4.2.1. Fázová čistota .....	35
4.2.2. Transmisní elektronová mikroskopie .....	36
4.2.3. Infračervená spektroskopie .....	36
4.2.4. Intenzita radioluminiscence.....	38
4.2.5. Termoanalýza .....	39
4.2.6. Měrné povrchy .....	42
4.3. Stanovení míry vymývání PpIX ve fyziologickém prostředí.....	44
4.3.1. UV/VIS spektrofotometrie .....	44
4.4. Toxicita nanokompozitu.....	45
5. Závěr.....	47
6. Literatura .....	49
7. Seznam chemikálií .....	54
8. Přílohy .....	55

# 1. Úvod

V posledních několika dekádách se předmětem vědeckého zájmu stávají nanočástice a jejich aplikace v různých odvětvích běžného života či v medicíně. Zde se značná část pozornosti obrací na vývoj tzv. *multimodálních nanokompozitů*. Jedná se o upravené nanočásticové jádro, jehož povrch je modifikovatelný několika způsoby přímo v závislosti na zamýšlené aplikaci nanokompozitu. Tyto modifikace pak umožňují použití takového materiálu pro terapeutické, diagnostické i teranostické účely (Daems *et al.*, 2021; Montaseri *et al.*, 2021).

Významnou roli ve vývoji takových nanokompozitů hrají anorganické nanočástice, ať už se jedná o kovy či oxidy kovů, které v mnoha případech disponují vhodnými vlastnostmi (chemická i teplotní stabilita, vhodné luminiscenční vlastnosti, volitelná velikost, nižší míra degradace v porovnání s organickými nanočásticemi atd.) (Montaseri *et al.*, 2021). Nicméně nanočástice jako takové mohou na organismus působit toxicky. Dalším faktorem ovlivňujícím chování nanočástic v organismu je jejich velikost, která rozhoduje o době zdržení látky v těle a tím i o jejím teranostickém účinku (Jayanta *et al.*, 2021).

Dosažení požadovaných vlastností je možné díky modifikaci povrchu nanočásticového jádra vhodnými látkami. Tímto způsobem lze zajistit sníženou toxicitu, zvýšenou biokompatibilitu či aktivní cílení na požadované lokality v organismu. Navázání fotosenzitivní molekuly na povrch nanokompozitu a následná aplikace vnějšího záření indukuje v ideálním případě vznik reaktivních forem kyslíku (ROS) a vyvolává cytotoxický efekt v oblasti nádoru. Zajištění diagnostického, terapeutického či teranostického účinku lze dosáhnout i označením nanokompozitu příslušným radionuklidem (Daems *et al.*, 2021).

Nanokompozit se obvykle skládá z několika vrstev: anorganické jádro; vrstva materiálu snižujícího tendenci k aglomeraci nanočástic, která zároveň poskytuje vazebná místa pro další molekuly; biokompatibilní materiál, jehož primárním úkolem je snížení toxicity nanokompozitu a zvýšení doby zdržení v organismu, zároveň však může sloužit jako další vazebné místo; vrstva dalších molekul ovlivňujících vlastnosti kompozitu – fotosenzitivní molekuly nezbytné pro aplikaci ve fotodynamické terapii; cílicí molekuly nebo radionuklidy (Hu *et al.*, 2015).

Tato diplomová práce navazuje na předchozí výzkum v oblasti multimodálních nanokompozitů, konkrétně se jedná o studium anorganických nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup> a modifikací jejich povrchu. Hlavním cílem práce byla příprava a analýza vlastností nanokompozitu pro rentgenem buzenou fotodynamickou terapii (X-PDT). Pozornost je upřena

na optimalizaci postupu přípravy kompozitu tak, aby bylo dosaženo co nejvhodnějšího poměru mezi velikostí nanočástic a intenzitou luminiscence. Dále je studován vliv modifikací povrchu nanočástic na dvě klíčové vlastnosti, velikost částic a luminiscenci. V této práci je popsáno i chování připraveného nanokompozitu ve fyziologických podmínkách z hlediska stálosti nanokompozitu a tendence protoporfyrinu IX (PpIX) k vymývání právě v tomto prostředí. Poslední částí práce je i první toxikologická studie provedená na spolupracujícím pracovišti INSERM v Grenoblu.

## 2. Teoretická část

Tato diplomová práce se zabývá přípravou nanokompozitu pro aplikaci v rentgenem buzené fotodynamické terapii. Základem nanokompozitu je nanočásticové jádro modifikované vrstvou SiO<sub>2</sub>. Toto jádro je v dalším kroku funkcionalizováno fotosenzitivní látkou zajišťující cytotoxický charakter kompozitu. V posledním kroku je nanokompozit modifikován vrstvou biokompatibilní látky. V teoretické části je věnována pozornost jednotlivým složkám tvořícím nanokompozit LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX-PEG. Zároveň jsou zmíněny další alternativní materiály.

### 2.1. Nanočásticové jádro

Jeden z materiálů použitelných pro aplikaci v X-PDT je Lu<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub> dopovaný ionty Pr<sup>3+</sup> (LuAG:Pr<sup>3+</sup>), který lze syntetizovat fotochemickou metodou. V té je připraven roztok několika výchozích látek o známé koncentraci, který je poté za přesně daných podmínek po určitou dobu ozařován UV zářením. Vzniklý gel je odseparován, vysušen a kalcinován (Bárta *et al.*, 2012). Teplota kalcinace musí přesáhnout alespoň 900 °C, aby došlo k vytvoření čisté krystalické fáze LuAG (Uhlich *et al.*, 2007). V literatuře jsou popsány i jiné metody přípravy, jako například reakce příslušných oxidů v pevné fázi či srážecí reakce, avšak většina těchto metod je zdlouhavá, pracná nebo nevede k uspokojivým produktům (Boukerika *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2010).

Velkou výhodou tohoto materiálu je jeho vysoká chemická a mechanická stabilita, vhodné optické vlastnosti a vysoká hustota 6,73 g/cm<sup>3</sup>. Optické vlastnosti jsou do značné míry určeny dopací této matrice kovy vzácných zemin, v případě požadavku na vazbu s porfyrinovými deriváty jsou velmi vhodné zejména ionty Pr<sup>3+</sup>. Dopací ionty Pr<sup>3+</sup> jsou do materiálu zavedeny nové energetické hladiny, díky kterým jsou zajištěny specifické spektrální vlastnosti (Kumar *et al.*, 2019). Díky jejich přítomnosti se v emisním spektru nanočástic objevuje široký intenzivní pás mezi 300 a 400 nm odpovídající 5d-4f přechodu Pr<sup>3+</sup> (Boukerika *et al.*, 2015) a úzké méně intenzivní pásy způsobené přechody mezi hladinami 4f-4f (nad 480 nm) (Vondrášková *et al.*, 2016). Tyto vlastnosti předurčují LuAG:Pr<sup>3+</sup> k aplikaci např. v optoelektronice či v pevnolátkových laserových technologiích (Kumar *et al.*, 2019). Kromě toho lze LuAG:Pr<sup>3+</sup> v kombinaci s vhodnou fotosenzitivní látkou využít jako materiál vyvolávající fotodynamický efekt ve fotodynamické terapii (PDT) nádorových onemocnění.

Vlastnosti materiálu jsou do značné míry ovlivněny teplotním režimem žíhání prekursoru. V literatuře byl popsán trend, v němž s rostoucí teplotou kalcinace dochází

k nárůstu velikosti krystalitů, naproti tomu mikrostrukturální napětí klesá (Boukerika *et al.*, 2015). Teplota opracování má vliv i na luminiscenční vlastnosti. S rostoucí teplotou totiž roste i intenzita luminiscence – důvodem je vyšší krystalinita a menší počet povrchových defektů u materiálů žíhaných na vyšší teplotu (Popovich *et al.*, 2020).

Důležitou roli z hlediska luminiscenčních vlastností materiálu hraje i množství nadopovaného kovu vzácných zemin. Bylo ukázáno, že nejvyšší intenzity luminiscence  $\text{Pr}^{3+}$  je dosaženo při molární koncentraci 1 % (Wang *et al.*, 2010; Vondrášková *et al.*, 2016), tj.  $\text{Lu}_{2,97}\text{Pr}_{0,03}\text{Al}_5\text{O}_{12}$ .

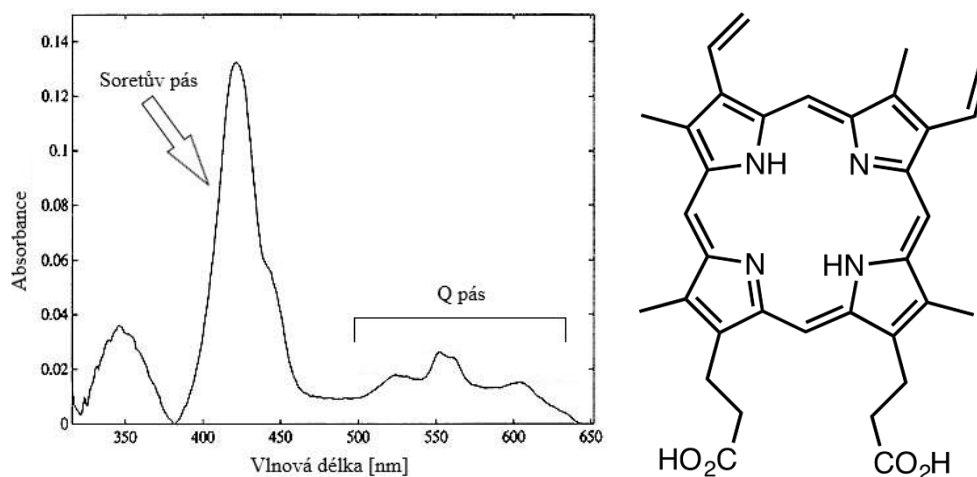
## 2.2. Fotosenzitivní látka

Fotosenzitivní látka (FL) slouží k přenosu energie z vnějšího zdroje, případně energie emitované nanočásticovým jádrem po jeho ozáření, na molekuly  $\text{O}_2$ , což vede ke vzniku cytotoxických ROS včetně  $^1\text{O}_2$ . FL mohou být aktivovány elektromagnetickým zářením v rozsahu od UV oblasti až do NIR oblasti. Použití UV záření není v klasické fotodynamické terapii vhodné kvůli jeho schopnosti negativně působit na biologický materiál a nízké pronikavosti tkání, fotosenzibilizátory s absorpčním pásem v oblasti NIR naopak vykazují nízké kvantové výtěžky  $^1\text{O}_2$  (Choi *et al.*, 2018).

Velkým problémem většiny FL je jejich hydrofobní chování, vedoucí k aglomeraci a urychlenému vyloučení z organismu. Další nevýhodou je nízká nebo žádná specifita cílení, která je příčinou zvýšené zátěže okolních a zdravých tkání. Z těchto důvodů se FL podávají jako součást určitého nanokompozitu. Vlnové délky používané v běžné PDT se většinou pohybují v rozmezí 600–850 nm (tzv. fototerapeutické okno). Světlo kratších vlnových délek totiž nedisponuje průnikem do dostatečné hloubky, vyšší vlnové délky naopak neaktivují FL s takovou účinností. Alternativně lze k aktivaci použít rentgenové záření, které excituje nanočásticové jádro, na němž je navázána FL. Jádro deexcituje emisí záření o vlnové délce v oblasti UV/VIS tak, že je jím aktivována FL. Mezi materiály schopné takovéto konverze energie, tedy luminofory, patří např. oxidy kovů vzácných zemin dopované lanthanoidy (Montaseri *et al.*, 2021).

### 2.2.1. Protoporfyrin IX

Jeden z nejčastěji studovaných fotosenzibilizátorů představuje PpIX, jehož použití je hojně zmiňováno v literatuře (Rossi *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2009). Jedná se o organickou molekulu, jejíž jádro je tvořeno tetrapyrrolovým makrocyklem. V lidském organismu se



Obr. 1: Absorpční spektrum PpIX. Vpravo struktura PpIX

vyskytuje přirozeně jako poslední prekurzor při biosyntéze hemu. Ten vzniká chelatací atomu železa tímto tetrapyrrolovým makrocylem.

Absorpční spektrum PpIX se vyznačuje dvěma typickými pásy – intenzivním úzkým pásem v UV oblasti (Soretův pás) a Q-pásem tvořeným více píky s výrazně menší intenzitou v oblasti zhruba od 500 do 630 nm (Obr. 1). Po absorpci záření může dojít k přenosu energie na kyslík, v důsledku čehož vznikají ROS. Tyto formy jsou velmi reaktivní a poškozují biomolekuly, jako jsou proteiny, lipidy či DNA (Josefsen *et al.*, 2008).

Zvýšené množství PpIX v organismu je toxické (Sachar *et al.*, 2016). Vzhledem k tomu, že se jedná o relativně velkou hydrofobní molekulu nerozpustnou ve vodě, dochází k jeho exkreci z těla především pomocí jater a žlučníku. Vysoká koncentrace PpIX právě v játrech může způsobit tak velké poškození, že je nutná jejich transplantace. Nadměrná přítomnost PpIX mimo to negativním způsobem ovlivňuje koloběh žluči.

Poté, co byl pozorován fotodynamický efekt v erythrocytech pacientů trpících zvýšeným množstvím PpIX v těle, začalo se o PpIX uvažovat jako o vhodné fotosenzitivní látce pro PDT. V současnosti se PpIX používá při léčbě rakoviny jícnu či průdušek a dalších onemocnění (akné, Bowenova nemoc atd.). Využití nalézá PpIX i v diagnostice, a to díky jeho červené fluorescenci (Sachar *et al.*, 2016).

Nutnou podmínkou použití PpIX jako fotosenzitivní látky v X-PDT (více v kap. 2.5.1) je dostatečný překryv jeho absorpčního spektra s emisním spektrem nanočásticového jádra. Tato podmínka je v případě jádra LuAG dopovaného Pr<sup>3+</sup> splněna. Navázání PpIX na nanočásticový kompozit navíc řeší i problém s nízkou rozpustností PpIX ve vodě. V případě volného PpIX by totiž mohlo docházet nejen k nežádoucím toxickým účinkům, ale navíc by

molekuly v důsledku nízké rozpustnosti agregovaly, čímž by byly narušeny fotochemické i fyzikální vlastnosti fotosenzibilizátoru a byl by snižován celkový účinek léčby (snížená produkce  $^1\text{O}_2$  a dalších ROS) (Couleaud *et al.*, 2010).

Porfyrin a jeho deriváty (označovány jako FL první generace) mají několik nedostatků – především se jedná o jejich hydrofobní vlastnosti a toxicitu. Z tohoto hlediska jsou výhodnější tzv. fotosenzibilizátory druhé generace, kam se řadí např. kyselina 5-aminolevulová (ALA) a její estery, které mají výrazné menší vedlejší efekty a mnohem efektivnější produkci ROS (díky absorpci delších vlnových délek, které pronikají hlouběji do tkáně). Navázáním fotosenzibilizátoru první nebo druhé generace na určitý nosič (např. nanočástice) vzniká třetí generace fotosenzitivních látek, která se vyznačuje zvýšenou schopností akumulovat se v požadovaných lokalitách organismu (Montaseri *et al.*, 2021).

### 2.2.2. Jiné fotosenzitivní látky

Nejčastěji používanou fotosenzitivní látkou v dnešní době je Photofrin, který byl představený dr. Doughertym již v 70. letech. Jeho největší nevýhodou je to, že způsobuje zvýšenou světelnou citlivost kůže, která může trvat až po několik měsíců. Dalším negativem je nízká intenzita absorpčního píku při 630 nm, což výrazně snižuje efektivitu léčby především větších nádorů, kde nastávají problémy s pronikavostí světla (Abrahamse *et al.*, 2016).

Největší skupina fotosenzitivních látek je založena na tetrapyrrolovém kruhu. V závislosti na počtu dvojných vazeb lze tuto skupinu rozdělit na porfyriny, chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny. S úbytkem dvojných vazeb dochází k posunu Q-pásmu směrem k delším vlnovým délkám. S výjimkou bakteriochlorinů podléhají fotosenzibilizátory v této skupině fotochemické reakci II. typu (více v kap. 2.5.1). Nejvýznamnějším zástupcem je již výše zmíněný Photofrin, což je směs oligomerů a dimerů na bázi porfyriu. Dlouhodobě užívanou látkou je ALA používaná jako bioprekurzor fotosenzitivního PpIX (Kennedy *et al.*, 1996; Khaing *et al.*, 2008). Choi *et al.* zvolil jako fotosenzitivní látku chlorin e6 disponující širokým absorpčním pásem mezi 350 až 450 nm a vysokým kvantovým výtěžkem pro  $^1\text{O}_2$  (Choi *et al.*, 2018). Stejnou látkou byly modifikovány i nanočástice  $\text{TiO}_2$  a  $\text{SiO}_2$  (Youssef *et al.*, 2018). Další látkou na bázi chlorinu je přípravek s komerčním názvem Foscan (m-tetrahydroxyfenylchlorin) používaný např. v kombinaci s nanočásticemi maghemitu  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (Primo *et al.*, 2007). Nejznámějším zástupcem skupiny bakteriochlorinů je fotosenzibilizátor s názvem TOOKAD. Stuchinskaya *et al.* zvolila jako fotosenzibilizátor derivát ftalocyaninu (Stuchinskaya *et al.*, 2011).

Poslední dobou je pozornost věnována i uměle připraveným fotosenzitivním látkám, za zmínku stojí např. fenothiazinové soli (methylenová modř, toluidinová modř) či deriváty xanthenu (bengálská červeň) (Abrahamse *et al.*, 2016). Tyto látky jsou však využívány spíše pro antimikrobiální účely než pro účely PDT.

## 2.3. Biokompatibilita

Podmínkou úspěšné aplikace nanokompozitu je zajištění dostatečné biokompatibility s organismem. Podstata nekompatibility nanokompozitu spočívá především v jeho nepřiměřených rozměrech a vyvolání imunogenní reakce, což vede k rozpoznání látky imunitním systémem a vyloučení z organismu často před dosažením kýženého účinku (Naahidi *et al.*, 2013).

To se děje hlavně v ledvinách, játrech a retikuloendoteliálním systému (RES). Ledviny filtrují krevní plazmu a na základě svých vlastností (např. velikost a náboj glomerul) odstraňují spíše nanočástice s kladným povrchovým nábojem. Naopak játra rozpoznávají hydrofobní částice a RES se soustředí na nanočástice s příliš velkými rozměry a vysokými povrchovými náboji. Eliminace je způsobena činností makrofágů, uvnitř nichž jsou vytvářeny ROS, které tak rozkládají cizorodé částice (Kobayashi *et al.*, 2014).

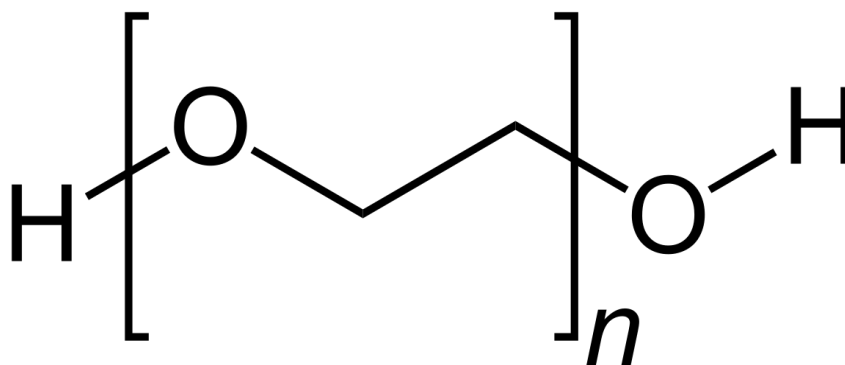
Dalším faktorem ovlivňujícím biokompatibilitu nanokompozitů je adsorpce proteinů krevní plazmy na jeho povrch. Ta opět způsobuje rozpoznání kompozitu makrofágy, eliminaci a tím značné zkrácení doby zdržení v organismu. V neposlední řadě hraje roli i tendence nanočástic ke shlukování a následný nárůst rozměru nanokompozitu, vedoucí ke stejnému závěru, tedy příliš rychlému vyloučení z krevního oběhu (Zhang *et al.*, 2002).

Řešení těchto problémů je možné díky *biokompatibilizaci*. Při té je nanokompozit obalen vhodnou látkou, čímž dojde k zamezení jeho nežádoucích interakcí s imunitním systémem a v důsledku toho i prodloužení doby zdržení kompozitu v těle (Zhang *et al.*, 2002).

### 2.3.1. Pegylace

Jedním z nejčastěji používaných způsobů zajištění biokompatibility nanokompozitu je pegylace. Jedná se o proces navázání, ať už kovalentní či nekovalentní vazbou, organického polymeru polyethylenglykolu (PEG) na požadovanou molekulu za účelem prodloužení doby cirkulace látky v krevním oběhu. To je způsobeno snížením aglomerace nanočástic a zabráněním adsorpce proteinů na povrch nanočástic vedoucí k vyloučení z krevního řečiště makrofágy. Pegylace kromě toho ovlivňuje hydrodynamickou velikost částice, její hydrofobní





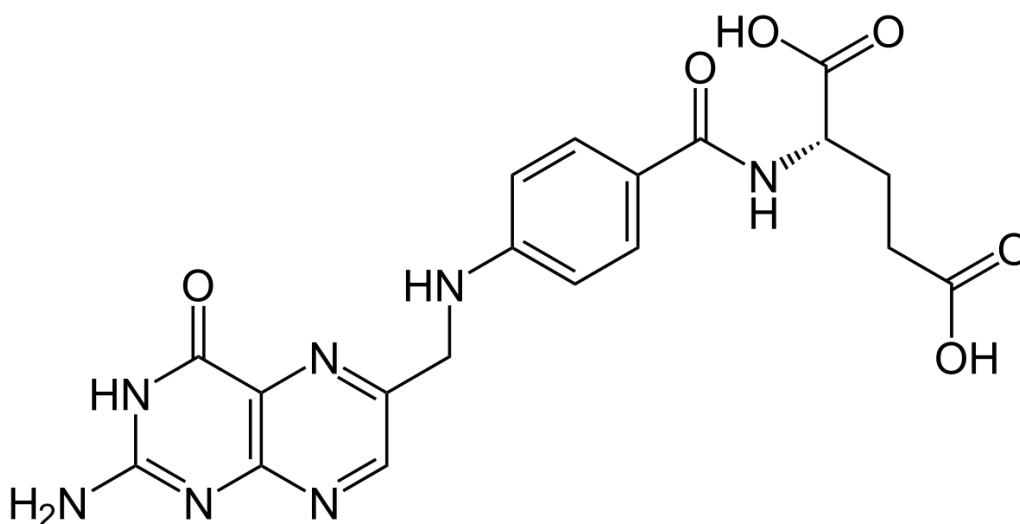
Obr. 2: Struktura PEG.

vlastnosti a zlepšuje průnik skrz buněčnou membránu (Zhang *et al.*, 2002). Pro úspěšné navázání PEG na požadovanou molekulu jsou používány různé deriváty – homobifunkční se dvěma stejnými funkčními skupinami na obou koncích polymeru anebo heterobifunkční s různými funkčními skupinami.

PEG je relativně jednoduchá molekula, která je rozpustná ve vodě a velkém množství organických rozpouštědel (např. toluen). Jedná se o hojně využívaný materiál především v biomedicíně, a to díky netoxickým vlastnostem a schopnosti zabraňovat adsorpci proteinů na povrch materiálů obalených PEG. Kromě toho je velkou výhodou jeho existence v mnoha variantách lišících se délkou řetězce (molární hmotností) a jeho rozvětvením či funkčními skupinami. Právě to umožňuje použít PEG jako linker pro navázání např. cílicích molekul. Modifikace PEG navíc nijak nebo jen velmi málo ovlivňuje chemické vlastnosti samotného modifikovaného materiálu, snad jen s výjimkou změny rozpustnosti a zvýšení velikosti (Harris, 1992). Potenciální nevýhodou PEG může být fakt, že při druhé aplikaci pegylovaných nanočástic došlo k vytvoření anti-PEG protilátek, což zvýšilo rychlost vyloučení z organismu a snížilo tak míru vstupu nanokompozitu do buněk (Montaseri *et al.*, 2021).

V literatuře lze narazit i na jiná pojmenování tohoto polymeru, jako jsou např. poly(oxyetylen), poly(oxiran) nebo poly(ethylenoxid) (PEO). PEO je používán pro označení polymeru s molární hmotností vyšší než 20000, polymery s nižší molární hmotností jsou označovány jako PEG (Harris, 1992).

Shin *et al.* (Shin *et al.*, 2008) použil pro pegylaci povrchu nanočástic oxidu křemičitého UV fotopolymerizační metodu. Modifikace povrchu vedla k zabránění aglomerace nanočástic, zároveň došlo ke snížení záporného zeta potenciálu nanočástic, což je důležité hlavně z hlediska stability suspenze v roztoku. Měřením míry adsorpce vody na povrch nanočástic byly zjištěny



Obr. 3: Struktura kyseliny listové.

hydrofobní vlastnosti nanokompozitu. Sníženou aglomeraci nanočástic po provedení pegylace zaznamenal i Tristantini (Tristanini *et al.*, 2011).

Zhang *et al.* modifikoval povrch superparamagnetických nanočástic  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  pegylací a prokázal snížený příjem takto upravených nanočástic makrofágy. Navíc byl zjištěn výrazný nárůst příjmu nanočástic rakovinnými buňkami BT20 v porovnání s nemodifikovanými nanočásticemi. Přítomnost nanočástic uvnitř buněk (jak makrofágů, tak BT20) navíc nevedla k vyšší smrtnosti v porovnání s kontrolními buňkami (Zhang *et al.*, 2002).

### 2.3.2. Další způsoby biokompatibilizace

Mezi další látky s potenciálem pro zvýšení biokompatibility nanokompozitu se řadí např. kyselina listová. Jedná se o nažloutlou sloučeninu patřící do rodiny vitamínů B, které výrazným způsobem ovlivňují mnoho tělesných procesů (slouží např. jako koenzym pro tvorbu DNA nebo jako součást systému koenzymů při syntéze aminokyselin). Struktura kyseliny listové (Obr. 3) je tvořena pteridinovým kruhem, kyselinou *p*-aminobenzoovou a kyselinou glutamovou (jiné označení kyseliny listové je kyselina pteroylglutamová) (Vora *et al.*, 2002).

Jedním ze způsobů, kterým mohou nanočástice vstupovat do buněčného prostoru, je receptorem řízená endocytóza (Zhang *et al.*, 2019). Tímto způsobem lze významně zlepšit vstup do buněk u nanokompozitů modifikovaných právě kyselinou listovou, jejíž receptor se velmi často nachází na rakovinných buňkách. Velkou výhodou kyseliny listové oproti různým protilátkám je její nízká molekulová hmotnost a menší rozměry, které usnadňují průnik skrz buněčnou membránu. Dalším přínosem je její stabilita a nízká tendence vyvolávat imunitní

reakci (imunogenicita). Kyselina listová tak může nabývat dvojího významu – jako materiál zajišťující biokompatibilitu a jako cílicí molekula.

Kyselinu listovou použil pro modifikaci superparamagnetických nanočástic  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  Zhang, který zaznamenal významný nárůst v příjmu nanočástic rakovinnými buňkami BT20. Naopak vliv modifikace kyselinou listovou na interakci s makrofágy zaznamenán nebyl. Podobně jako u pegylace nebyl ani v tomto případě pozorován nárůst smrtnosti buněk oproti kontrolním buňkám (Zhang *et al.*, 2002).

Dalšími alternativami k PEG mohou být např. kyselina hyaluronová, pozornost se obrací i k použití červených krvinek (Montaseri *et al.*, 2021).

## 2.4. Cílení

Dosažení nádorové tkáně může proběhnout jak pasivně, tak aktivně. Aktivní cílení samozřejmě významně zvyšuje efektivitu léčby díky zvýšené koncentraci léčiva v nádoru a tím i jeho zvýšenému vstupu do buněk. Navíc je snížen negativní dopad léčiva na okolní zdravé tkáně.

### 2.4.1. Pasivní cílení

V závislosti na velikosti nanočástic dochází k jejich vyloučení z těla – pokud jsou nanočástice příliš malé, jsou vyloučeny ledvinami; pokud je jejich rozměr příliš velký, jsou rozpoznány a zachyceny RES. Vylučování z těla však neprobíhá pouze na základě velikosti. Játra vylučují hydrofobní látky, RES zase molekuly s vysoce nabitým povrchem. Existují však rozměry, které není imunitní systém schopen rozeznat. Nanočástice těchto rozměrů pak cirkulují po dlouhou dobu cévami a mohou pronikat do nádorů. Ty jsou totiž typické svou vysokou propustností a umožňují tak pasivní průnik nanočástic a dalších látek do nádorového ložiska (Kobayashi *et al.*, 2014).

Tento proces průniku do nádorových cév a následně do samotného nádoru se nazývá efekt zvýšené permeability a retence (Enhanced Permeability and Retention – EPR) (Kobayashi *et al.*, 2014). Pronikání do nádoru je navíc podpořeno zhuštěným cévním zásobením v nádorové oblasti, které je esenciální pro růst nádoru. Snížené lymfatické odvodňování nádorů pak napomáhá delšímu zadržování nanočástic v této oblasti. Opačným směrem naopak působí zvýšený vnitřní tlak.

## 2.4.2. Aktivní cílení

V tomto případě je cílení zajištěno navázáním ligandu nebo protilátky specifické pro nádorové buňky na povrch nanočástice. Základním předpokladem tohoto způsobu transportu nanočástic je, že vlastnosti buňky nebo receptory na buněčném povrchu, na které je cíleno, jsou typické především pro rakovinné buňky, aby tak bylo zabráněno poškození zdravých buněk (Zhang *et al.*, 2019).

K aktivnímu transportu léčiva do nádoru byly využity např. nanočástice oxidu železitého, na jejichž povrchu byla navázána kyselina hyaluronová, která se váže na receptor CD44 vyskytující se na rakovinných buňkách. Akumulaci v rakovinné tkáni zde však přispívalo i aplikované vnější magnetické pole spolu s EPR (Wang *et al.*, 2018). Vnějšího magnetického pole využil i Ding *et al.* při aktivním cílení nanočástic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> navázaných na dextran a chlorin e6. Tyto nanočástice kromě PDT sloužily i k zobrazování pomocí magnetické rezonance (Ding *et al.*, 2017). Jako cílicí molekula byla zaznamenána i kyselina listová vázající se na folátový receptor, který se nachází na některých rakovinných buňkách (Hong *et al.*, 2016). Kromě výše zmíněných cílicích molekul byl použit např. i epidermální růstový faktor (cílení na buňky nemalobuněčného karcinomu plic) (Román *et al.*, 2016).

## 2.5. Využití nanokompozitu

### 2.5.1. Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie v posledních několika desetiletích získala značnou pozornost jako alternativa k tradičním způsobům léčby rakoviny, mezi které patří radioterapie či chemoterapie.

První doklady o použití PDT sahají až do starého Egypta a Řecka, avšak větší pozornosti v moderních dějinách se PDT dostalo až na začátku 20. století, kdy Oscar Raab náhodou objevil schopnost určitých látek zabíjet buňky po vystavení světlu v přítomnosti kyslíku. Objev paprsků X a vzestup farmaceutického průmyslu v poválečném období odsunuly PDT na druhou kolej až do 70. let. V té době Thomas Dougherty představil první fotosenzitivní látku, která byla později nazvána Photofrin (jednalo se o směs porfyrinů rozpustnou ve vodě, pracovní název byl hematoporfyrinový derivát) (Abrahamse *et al.*, 2016; Allison *et al.*, 2004).

Obecně lze říct, že v PDT je pacientovi v určité formě podána FL, která je následně excitována vnějším zářením. FL disponují vysokou pravděpodobností přechodu ze vzbuzeného singletního do tripletního stavu (mezisystémový přechod, ISC – intersystem crossing), v němž

pak reagují s molekulárním kyslíkem. Při této reakci (tzv. triplet-triplet anihilace, jde o fotochemickou reakci II. typu) je obrácen spin jednoho elektronu kyslíku a spinová multiplicita kyslíku se tak mění z tripletu na singlet. Singletní kyslík se vyznačuje vysokou cytotoxicitou, čehož je využíváno pro ničení rakovinných buněk (Josefsen *et al.*, 2008).

Kromě  $^1\text{O}_2$  mohou vznikat i další ROS, a to při fotochemických reakcích I. typu. V tomto případě probíhá reakce mezi FL a substrátem, a to buď oxidačně, kdy vzniká kladný radikál substrátu a záporný radikál fotosenzitizéru, anebo způsobem, v němž vznikají volné radikály. V každém případě vznikající vysoce reaktivní částice podléhají dalším reakcím vedoucím k tvorbě ROS (Josefsen *et al.*, 2008).

K úhynu buňky dochází několika způsoby – apoptózou, která nastává v případě poškození mitochondrie; nekrotózou spojenou s porušením integrity buňky kvůli poškozené buněčné membráně; či autofagií (reakce buňky na stresové podmínky, kdy lysozomy rozkládají makromolekulární struktury či celé organely za účelem zisku energie), při níž však existuje možnost uzdravení buňky (Montaseri *et al.*, 2021).

Problém nízké pronikavosti budícího záření v klasické PDT má vyřešit její modifikace s buzením rentgenovým zářením. Nanočástice s určitými luminiscenčními vlastnostmi a vhodnou modifikací povrchu mohou být použity v X-PDT. V X-PDT je nanokompozit, skládající se z nanočásticového jádra scintilačního materiálu (které může být různě povrchově modifikováno) a FL, ozáren rentgenovým zářením, které vybudí jádro. To poté emituje sekundární fotony, které jsou absorbovány FL. Pro správnou funkci této metody je nutné, aby byly zajištěny dostatečné překryvy emisního spektra jádra a absorpčního spektra FL (Morgan *et al.*, 2009). Výhoda X-PDT oproti obyčejné PDT spočívá v hlubším průniku aplikovaného primárního záření do tkáně a možnosti kombinace s klasickou radioterapií pro zvýšení účinku a snížení celkové dávky pacientovi.

FL samozřejmě nemusí deexcitovat pouze mezisystémovým přechodem. S určitou pravděpodobností se totiž může zbavit energie i fluorescencí (Josefsen *et al.*, 2008). Nanočástice s fotosenzitizéry tak mohou mít i teranostický potenciál. Kromě hubení rakovinných buněk by totiž mohly být použity zároveň k diagnostickým účelům, např. k odhalení rozsahu tumoru, a tím by odpadla nutnost využití dalších zobrazovacích metod.

### **2.5.2. Další možnosti využití**

Přestože zde popisované nanokompozity jsou primárně zamýšleny pro aplikaci ve fotodynamické terapii, vysoký měrný povrch nanočástic umožňuje jejich modifikaci i jinými

látkami, než jaké jsou zmíněny výše. Funkcionalizací nanočástic molekulami s chelatačními vlastnostmi, jako jsou např. DOTA, DTPA, TETA, NOTA atd., lze navázat radionuklidy vhodné pro radioterapii ( $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ , ...). V literatuře jsou zmiňovány nanokompozity  $\text{SiO}_2$  určené pro alfa terapii, kde je  $^{225}\text{Ac}$  konjugováno pomocí chelátu na bázi HOPO. Za účelem snížení radiační zátěže okolních zdravých tkání byl nanokompozit modifikován ještě cílícím transferinem. Použití nanočástic jako nosiče navíc vedlo ke snížené akumulaci radionuklidů v kostech, protože byla snížena míra jejich migrace v důsledku vysokých odrazových energií (Pallares *et al.*, 2020).

Modifikace nanočástic se však nemusí omezit pouze na jeden radionuklid. Velkou výhodou je právě možnost navázání více zářičů, což může vést ke zvýšení dávek v tumoru anebo ke kombinaci terapie a diagnostiky (tzv. teranostika). Velmi nadějně jsou v tomto ohledu nanočástice zlata, které disponují zajímavými vlastnostmi – při vystavení světlu o určité vlnové délce lze u zlatých nanočástic pozorovat povrchovou plazmonovou rezonanci. Díky ní je v okolí nanočástic generováno teplo, které může být použito ve fototermální terapii či pro pořízení fotoakustických snímků. K modifikaci nanočástic zlata byla použita široká škála terapeutických i diagnostických radionuklidů (Daems *et al.*, 2021).

## 3. Experimentální část

### 3.1. Kalcinace

Za účelem získání čisté tuhé fáze je prekurzor žhán za vysokých teplot. Žhánění probíhalo v peci CLASIC 0415 VAK po dobu dvou hodin při teplotách od 900 do 1200 °C s nárůstem teploty 10 °C/min v prostředí vzduchu.

### 3.2. Lyofilizace

Součástí optimalizace byl i nový způsob vysoušení prekurzoru. V minulosti byla za tímto účelem používána mikrofiltrace a následné sušení na vzduchu při 40 °C (Flejšmann, 2019). Tato cesta však vedla k nechtěné agregaci nanočástic a tím i k většímu rozměru nanočásticového jádra. Z toho důvodu byl navržen nový postup – lyofilizace, kdy je roztok obsahující prekurzor zmrazen a následně vložen do lyofilizátoru. V něm dochází v evakuovaném prostředí k zahřívání vzorku, což způsobí sublimaci ledu a vysušení vzorku.



Obr. 4: Lyofilizační aparatura (vlevo) a vnější a vnitřní pohled na žhací pec (vpravo).

### 3.3. Mletí vzorků

Připravené nanočástice LuAG:Pr<sup>3+</sup> byly po vyžhání mlety 1 hodinu na vibračním mlýně Pulverisette 0 od firmy Fritsch. Materiál mlecí misky a kuličky byl ZrO<sub>2</sub>.

### 3.4. Rentgenová difrakce

K analýze práškových vzorků se často využívá rentgenová difrakční analýza (XRD). Při této metodě je vzorek ozařován rentgenovým zářením, což vede k difrakci záření. Na základě intenzity difraktovaného záření lze určit mimo jiné velikost částic. Zdrojem záření je většinou rentgenka, pro zajištění monochromatickosti záření se používá filtr (pro Cu anodu je nejčastěji filtrem niklová fólie). Dopadající záření se odráží od jednotlivých krystalických rovin. Na základě Braggovy rovnice (1), v níž  $d$  je vzdálenost mezi identickými krystalickými rovinami,  $\theta$  úhel odrazu,  $n$  celé číslo a  $\lambda$  vlnová délka dopadajícího záření, pak lze určit, pro které úhly dochází k difrakci. Ta se projeví nárůstem intenzity rentgenového záření.

$$2 \cdot d \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad (1)$$

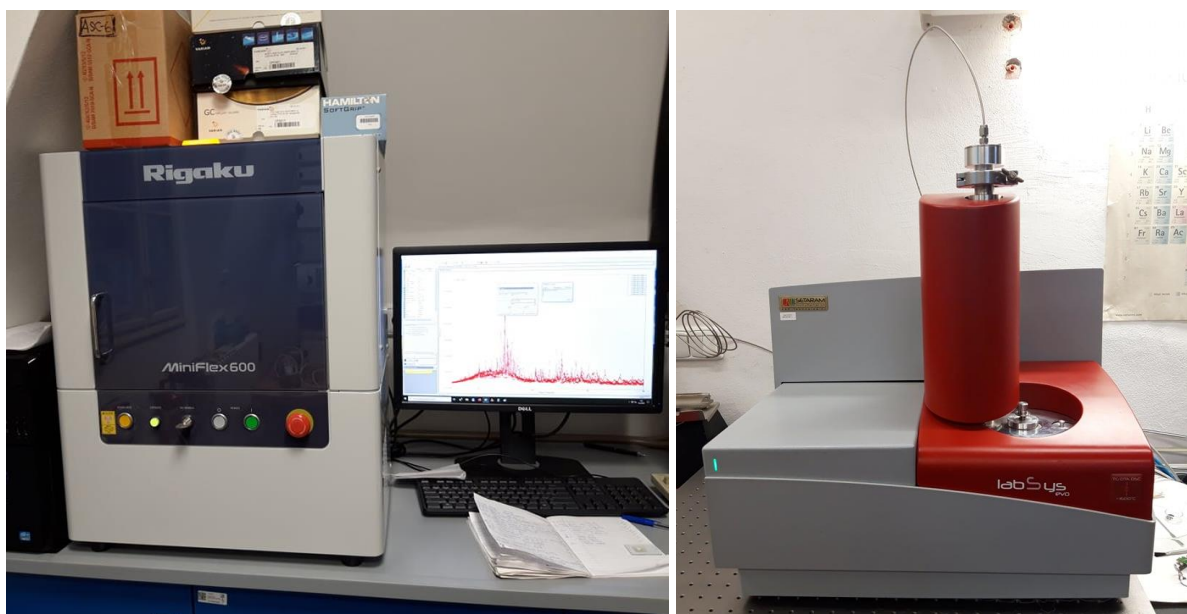
Velikost částic může být určena na základě Halder-Wagnerovy linearizace z rozšíření difrakčních píků do širokých maxim (Bárta, 2015). Příčinou tohoto jevu je kromě instrumentálního rozšíření a rozšíření způsobeného mikrostrukturálním napětím i rozšíření v důsledku velikosti částic. Vztah mezi pološířkou píku (FWHM), velikostí částic  $l$ , mikrostrukturálním napětím  $\varepsilon$  a difrakčním úhlem  $\theta$  udává Halder-Wagnerova rovnice (2)

$$\frac{\text{FWHM}^2}{\tan^2\theta} = \frac{K \cdot \lambda}{l} \cdot \frac{\text{FWHM}}{\tan\theta \cdot \sin\theta} + \varepsilon^2, \quad (2)$$

v níž  $K$  je Scherrerova konstanta (v tomto případě byla použita hodnota  $K=0,89$ ) a  $\lambda$  je vlnová délka dopadajícího záření (pro Cu-K <sub>$\alpha$ 1,2</sub>  $\lambda=0,154184$  nm) (Bárta, 2015).

Vzorky byly analyzovány na přístroji RIGAKU Mini Flex 600 s nastavením: napětí 40 kV, proud 15  $\mu$ A, s krokem 0,02° 2 $\theta$  (Obr. 5). K vyhodnocení získaných difraktogramů byla použita databáze Mezinárodního centra pro difrakční data ICDD PDF-2, verze 2013.





Obr. 5: Přístroj pro měření rentgenové difrakce (vlevo) a termoanalyzátor (vpravo).

### 3.5. Termoanalýza

Měření bylo provedeno na termoanalyzátoru Setaram LABSYS EVO (Obr. 5). Vzorky byly zahřívány až do teploty 750 °C v Ar atmosféře. Termická analýza je založena na sledování změn složení a vlastností vzorku při jeho zahřívání. Změna teploty totiž může ve vzorku způsobit několik jevů, např. vyvolat chemickou reakci či fázovou přeměnu. Vzorek v tepelně odolném kelímku a na speciálním držáku je umístěn v peci a je analyzována změna určité vlastnosti vzorku. Podle charakteristiky, jejíž změnu sledujeme, se běžně rozlišuje několik typů termické analýzy: v termogravimetrii (TG) je sledována změna hmotnosti; v diferenční termické analýze je měřen teplotní rozdíl mezi vzorkem a referenčním materiálem; tepelný tok dodávaný referentu tak, aby byl nulový rozdíl mezi teplotami vzorku a referentu je zaznamenáván v diferenční skenovací kalorimetrii (DSC).

### 3.6. Radioluminiscence

Měření radioluminiscenčních vlastností bylo provedeno na Fyzikálním ústavu Akademie věd ČR. Připravené vzorky byly excitovány rentgenovým paprskem (Seifert, 40 kV, 15 mA) za použití spektrofluorimetru 5000 M (Horiba Jobin-Yvon) s emisním monochromátorem a fotodetektořem TBX-04. Referenčním materiálem byl  $\text{Bi}_4\text{Ge}_3\text{O}_{12}$  (BGO). Měření probíhalo za teploty 293 K.

### 3.7. Infračervená spektroskopie

Měření bylo provedeno na FTIR spektrometru Nicolet iS50. Infračervená spektroskopie je analytická metoda poskytující jak kvalitativní, tak kvantitativní výsledky umožňující identifikaci především organických funkčních skupin. Aplikované infračervené záření interaguje se zkoumanou látkou, což vede ke změně vibračního a rotačního chování molekuly; je tak absorbováno záření s energií odpovídající rozdílu mezi vibračními hladinami molekuly. Výstupem měření je infračervené spektrum zobrazující závislost transmitance/absorbance na vlnočtu dopadajícího záření. Spektrum je charakteristické pro každou látku a porovnáním se záznamem z databáze tak lze zkoumanou látku identifikovat. Zároveň tato metoda umožňuje identifikovat funkční skupiny přítomné v molekule. K analýze práškových vzorků byla použita metoda ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance Fourier Transformation InfraRed), v níž není potřeba žádná další úprava vzorku. Vzhledem k tenkým vrstvám obalových materiálů ( $\text{SiO}_2$ , PEG, FA) na povrchu nanočástic byla pro další analýzu těchto nanokompozitů zvolena i metoda *grazing angle* umožňující zkoumání pouze povrchové vrstvy materiálu, v níž je práškový vzorek smíchan s KBr a je vylisován do tenké tablety.

### 3.8. Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie (EM) byla provedena na přístroji Phillips EM 201 na Ústavu anorganické chemie Akademie věd České republiky v Řeži. Jedná se o velice účinný nástroj studia nejen nanočástic. Díky vysokému zvětšení a velice dobrému rozlišení poskytuje topografické informace a umožňuje zobrazit nanočástice. Mimo to může sloužit i jako nástroj prvkové analýzy. Zdrojem elektronů v EM je žhavená katoda. V transmisní elektronové mikroskopii (TEM) jsou elektrony urychlené vysokým napětím fokusovány pomocí elektrického či magnetického pole na velice tenkou vrstvu zkoumaného vzorku. Tenká vrstva je podmínkou správné funkce TEM, protože jedině tak je zajištěno, že nedojde k pohlcení dopadajících elektronů. Po průchodu vzorkem vytváří elektrony v objektivu první obraz, který je následně zvětšen projekтивem a digitalizován. Naproti tomu ve skenovací elektronové mikroskopii (SEM) urychlené a fokusované elektrony skenují povrch vzorku, jsou odraženy či rozptýleny a detekovány. Paprsek elektronů je před dopadem na vzorek modifikován systémem clon a čoček. Informace o vlastnostech vzorku v tomto případě není zakotvena pouze v odražených elektronech, ale také v sekundárních a Augerových elektronech nebo v sekundárním rentgenovém záření. U obou typů elektronových mikroskopů je vzorek umístěn ve vakuu, aby nedocházelo k rozptylu a zeslabení elektronového svazku.

### 3.9. UV/VIS spektrofotometrie

Měření UV/VIS spekter bylo provedeno na spektrofotometru Cary 100 (Varian Inc.). Kapalným vzorkem je umístěn v kyvetě, kterou prochází paprsek záření z UV/viditelné oblasti. Částice rozpuštěné ve vzorku absorbují část dopadajícího záření a přístroj pak porovnává intenzitu záření prošlého vzorkem se zářením prošlým referenční kyvetou naplněnou destilovanou vodou nebo jiným referenčním rozpouštědlem. Vztah mezi koncentrací rozpuštěné látky a množstvím absorbovaného záření udává Lambert-Beerův zákon (3), kde  $A$  [-] je absorpance vzorku,  $c$  [ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] koncentrace analytu,  $\varepsilon$  [ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ] molární absorpční koeficient a  $l$  [cm] délka absorbujícího prostředí (kyvety), která je v tomto případě rovna 1 cm.

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l. \quad (3)$$

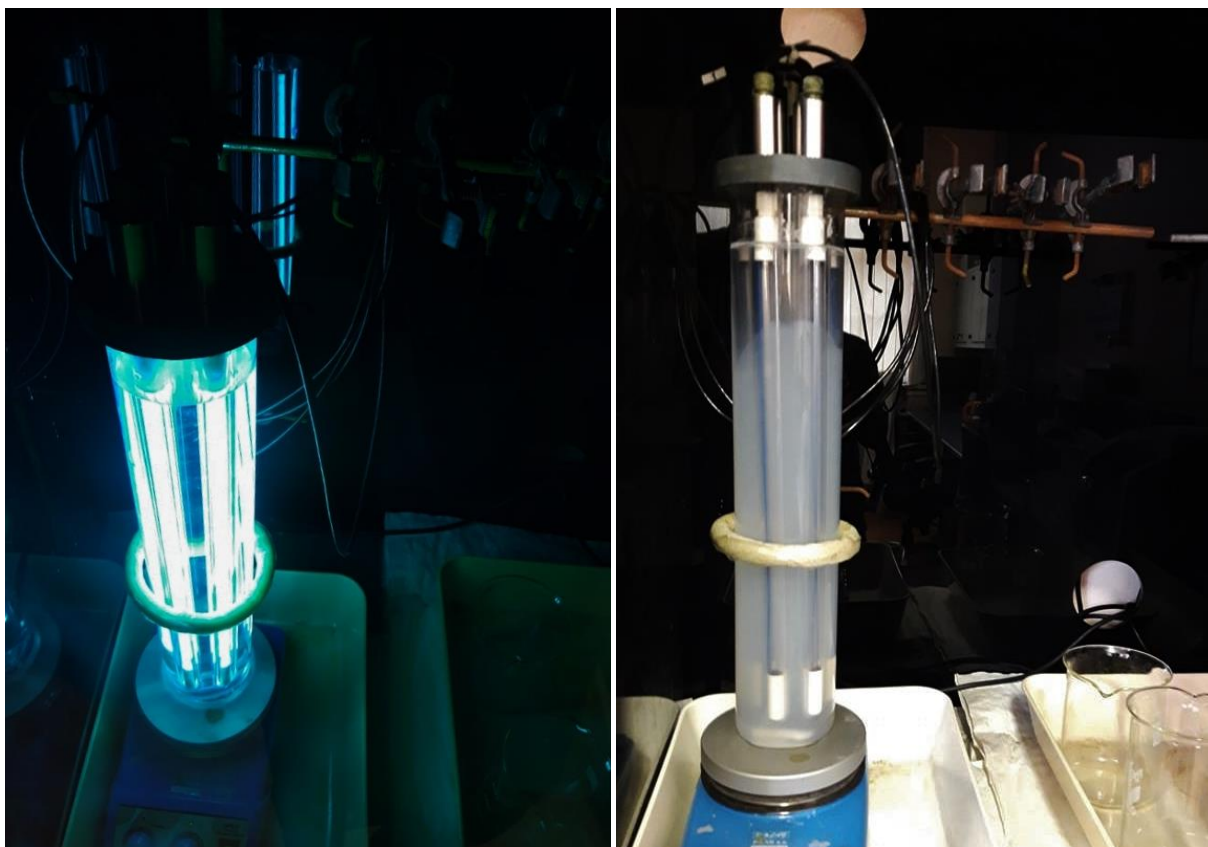
### 3.10. Měření povrchů

Měření měrných povrchů připravených nanokompozitů bylo provedeno na přístroji Monosorb MS-22 (Quantachrome Instruments, USA). Metoda je založena na změření množství adsorbovaného/desorbovaného plynného dusíku z pracovní plyné směsi (30 mol% dusíku a 70 mol% helia). Měření probíhá při teplotě 77 K a jedná se o zjednodušenou variantu metody BET. Odplyněný vzorek je ochlazen na teplotu kapalného dusíku, přičemž dochází k adsorpci plynného dusíku z pracovní směsi. Vzorek je následně zahřát na laboratorní teplotu, což vede k desorpci dusíku. Reálný povrch vzorku je pak stanoven z množství adsorbovaného/desorbovaného dusíku. Ke kalibraci přístroje bylo použito 1,00 ml vzduchu.

### 3.11. Příprava nanokompozitu

#### 3.11.1. Nanočásticové jádro

K přípravě nanočástic  $\text{Lu}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$  dopovaných ionty  $\text{Pr}^{3+}$  (dopace činila 1 %) bylo naváženo 2,706 g  $\text{Lu}(\text{NO}_3)_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$  ( $x=5$ ), 3,751 g  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  a 12,612 g  $\text{HCOONH}_4$ . Ke směsi byly přidány 4 ml zásobního roztoku  $\text{Pr}^{3+}$  o koncentraci  $15 \cdot 10^{-3}$  M, který byl připraven rozpuštěním  $\text{PrO}_{2-x}$  v nadbytku koncentrované  $\text{HNO}_3$ . Směs byla poté doplněna na 2 l destilovanou vodou a roztok byl za stálého míchání ozařován ve fotochemickém reaktoru po dobu 3,5 hodiny. Zdrojem záření (253,7 nm) byly čtyři ponorné nízkotlaké rtuťové výbojky s příkonem 4x 25 W. Získaný prekurzor (jemná bílá sraženina/ gel) byl buď zfiltrován použitím 0,45 $\mu\text{m}$  membránového filtru HAWP (Merck Milipore Ltd.) a vysušen na vzduchu při 40 °C,



Obr. 6: Fotochemická příprava nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup> v průběhu ozařování (vlevo) a po ukončení ozařování (vpravo).

anebo byla k vysušení použita lyofilizace. Suchý prekursor byl rozetřen v třecí misce a vyžhán v kalcinační peci.

### 3.11.2. Obalování vrstvou SiO<sub>2</sub>

Nanočástice LuAG:Pr<sup>3+</sup> žíhané na 1000 °C byly modifikovány vrstvou SiO<sub>2</sub>. 217 mg nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup> bylo zahříváno ve vakuu při 120 °C (1 hodina, 5°C/min), aby došlo k odstranění vody. Vyžháné nanočástice byly ponechány v exsikátoru, dokud nezchladly na laboratorní teplotu. Poté byly nanočástice suspendovány v 50 ml absolutního EtOH v ultrazvukové lázni asi 1 hodinu.

Suspenze byla umístěna na magnetickou míchačku, kde k ní bylo přidáno 25 µl TEOS a na závěr bylo pomalu přikapáno 7,5 ml 25% roztoku NH<sub>4</sub>OH. Aby bylo dosaženo maximální hydrolyzy TEOS, byla směs míchána do dalšího dne. Nanočástice LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub> byly třikrát promyty destilovanou vodou a resuspendovány v etanolu v ultrazvukové lázni (1 hodina). Nanočástice byly poté vysušeny při 40 °C na vzduchu.

### 3.11.3. Funkcionalizace nanokompozitu navázáním PpIX (Popovich *et al.*, 2018)

300 mg PpIX bylo rozpuštěno v 60 ml THF a bylo přidáno 400  $\mu$ l *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu (EDC). Roztok byl míchán po dobu 3 hodin při 0 °C v inertní N<sub>2</sub> atmosféře. Poté bylo přidáno 250  $\mu$ l APTES ve 25 ml THF a reakce byla ponechána běžet při 20 °C přes noc. Druhý den bylo ke směsi přidáno 300 mg LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub> a 900  $\mu$ l TEA. Reakce běžela dalších 24 hodin. Modifikované nanočástice byly zcentrifugovány, 3x promyty etanolem a vysušeny při 40 °C na vzduchu.

### 3.11.4. Biokompatibilizace

#### i) Pegylace:

40 mg LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX bylo rozdispergováno ve 40 ml EtOH. K disperzi bylo přidáno 70 mg PEG rozpuštěného ve 40 ml absolutního EtOH. Výsledná směs byla míchána po dobu 3 hodin při 40 °C. Na závěr byly nanočástice odstředěny, promyty třikrát etanolem a dvakrát destilovanou vodou a vysušeny na vzduchu při 40 °C.

#### ii) Modifikace kyselinou listovou (Zhang *et al.*, 2002):

Byla připravena směs 2 ml 10mM kyseliny listové v DMSO, 3 ml 15mM NHS a 3 ml 75mM EDC, ke které bylo přidáno 30 mg LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub> a 112  $\mu$ l TEA jako katalyzátoru. pH směsi bylo upraveno pomocí zředěné HCl na 9. Reakce probíhala po dobu 3 hodin při 37 °C. Na závěr byly nanočástice odstředěny, třikrát promyty destilovanou vodou a vysušeny na vzduchu při 40 °C.

## 3.12. Určení míry vymývání PpIX ve fyziologickém prostředí

Prášek LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX byl míchán ve fyziologickém roztoku (koncentrace nanokompozitu činila 0,1 hm%) po dobu 24 hodin. Následně byl prášek zcentrifugován a kapalná fáze byla analyzována spektrofotometricky. Před samotnou analýzou byl ke kapalně fázi přidán 0,1M NaOH, aby došlo k uvolnění PpIX ze stěn zkumavky.

Ve druhém experimentu byl stejný prášek smíchán s fosfátovým pufrům (pH = 7,4; koncentrace nanokompozitu činila 0,1 hm%) a umístěn na 24 hodin do ultrazvukové lázně. Další postup byl stejný jako v předchozím experimentu.

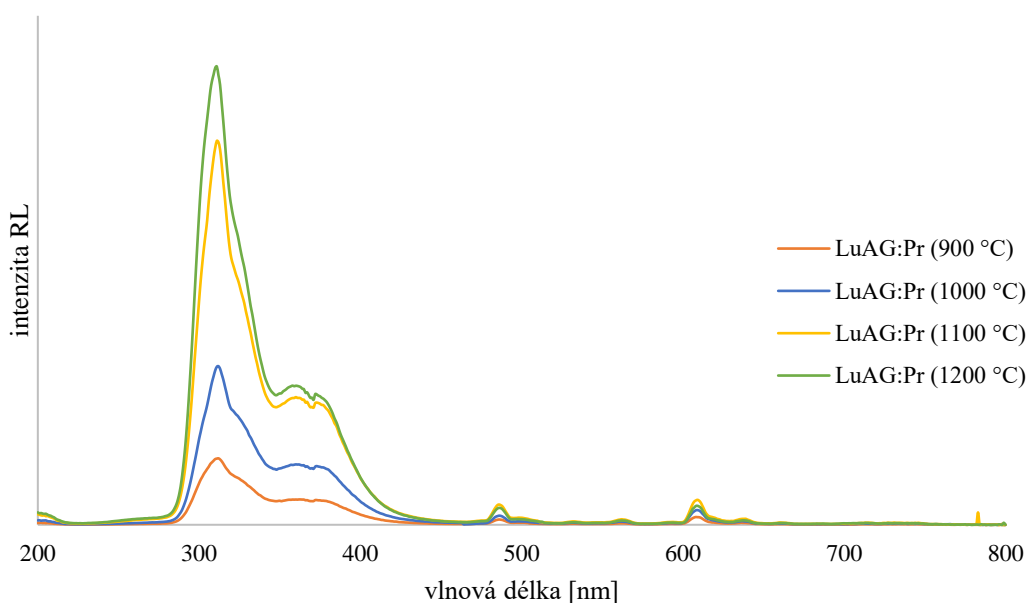
## 4. Výsledky a jejich diskuze

### 4.1. Optimalizace syntézy

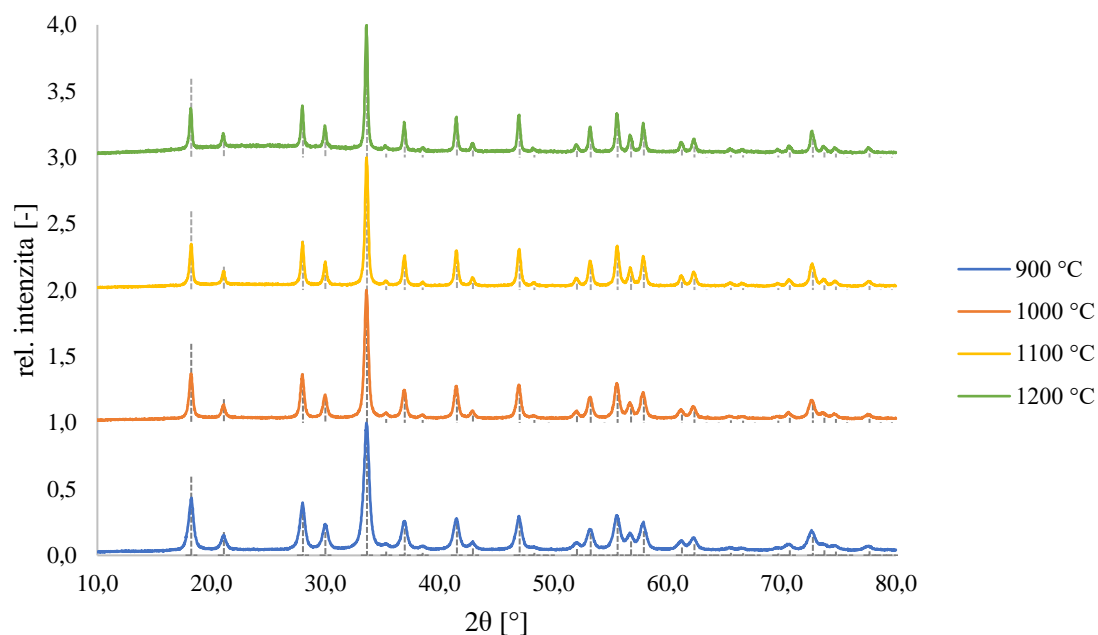
Z hlediska efektivního použití nanokompozitů pro PDT jsou důležité především dvě vlastnosti – velikost a intenzita luminiscence. Obvykle platí, že čím menší je velikost nanokompozitu, tím delší je doba zdržení v organismu a tím pádem i účinnější léčba. Obecně jsou uváděny jako horní hranice aplikovatelnosti nanokompozitů nízké stovky nanometrů (Kobayashi *et al.*, 2014). Efektivita léčby navíc roste s intenzitou záření emitovaného nanokompozitem. Obě tyto charakteristiky jsou mimo jiné závislé na teplotě, při které je prováděna kalcinace nanočásticového jádra, a to tak, že s rostoucí teplotou kalcinace dochází k růstu intenzity (Boukerika *et al.*, 2015), bohužel však také dochází ke zvětšení nanočástic. Připravené nanočástice LuAG:Pr<sup>3+</sup> byly vyžehány při teplotách 900, 1000, 1100 a 1200 °C po dobu 2 hodin (nárůst 5 °C/min, atmosféra: vzduch) a následně byla měřena intenzita luminiscence a velikost krystalitů.

#### 4.1.1. Intenzita radioluminiscence

Emisní spektrum Pr<sup>3+</sup> je charakteristické širokým intenzivním pásem mezi 280 a 440 nm odpovídajícím přechodu Pr<sup>3+</sup> 4f<sup>5</sup>d → 4f<sup>2</sup>. Oblast nad 450 nm odpovídá různým přechodům 4f<sup>2</sup> → 4f<sup>2</sup> (Drozdowski *et al.*, 2009). Z Obr. 7 je patrný jasný trend rostoucí intenzity radioluminiscence s rostoucí teplotou kalcinace. Zároveň lze pozorovat významný nárůst



Obr. 7: Rentgenem buzené emisní spektrum LuAG:Pr<sup>3+</sup> žíhaného při různých teplotách.



Obr. 8: Difraktogramy nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup> žíhaných při různých teplotách.

intenzity mezi teplotami 1000 a 1100 °C. Toto chování je v souladu s literaturou (Popovich *et al.*, 2020).

#### 4.1.2. Fázová čistota

Čistota připravených nanočástic byla vyhodnocena rovněž pomocí XRD. Získané difraktogramy na Obr. 8 byly porovnávány se záznamem číslo 01-073-1368 z databáze ICDD PDF-2, který je znázorněn čárkovaně šedivou barvou. Mírný posun difrakčních píků směrem k nižším úhlům  $2\theta$  oproti záznamu je způsoben umístěním vzorku v měřicím přístroji, mírný vliv může mít i množství měřeného vzorku. K posunu difrakčních maxim dochází i náhradou části atomů Lu většími atomy Pr, avšak to v případě 1% dopace nehraje žádnou roli (Uhlich *et al.*, 2007). Důležitým poznatkem je fakt, že změna teploty kalcinace nezpůsobila vznik nových difrakčních píků, tj. ve všech případech byly připraveny fázově čisté krystalické nanočástice LuAG:Pr<sup>3+</sup>. Tento fakt je v souladu s teplotami uváděnými v literatuře, podle kterých dochází ke vzniku krystalického LuAG již při teplotě 850 °C (Wang *et al.*, 2010). Z difraktogramů na Obr. 8 je zároveň patrné zúžení difrakčních píků s rostoucí teplotou kalcinace indikující nárůst velikosti krystalitů.

#### 4.1.3. Velikost částic

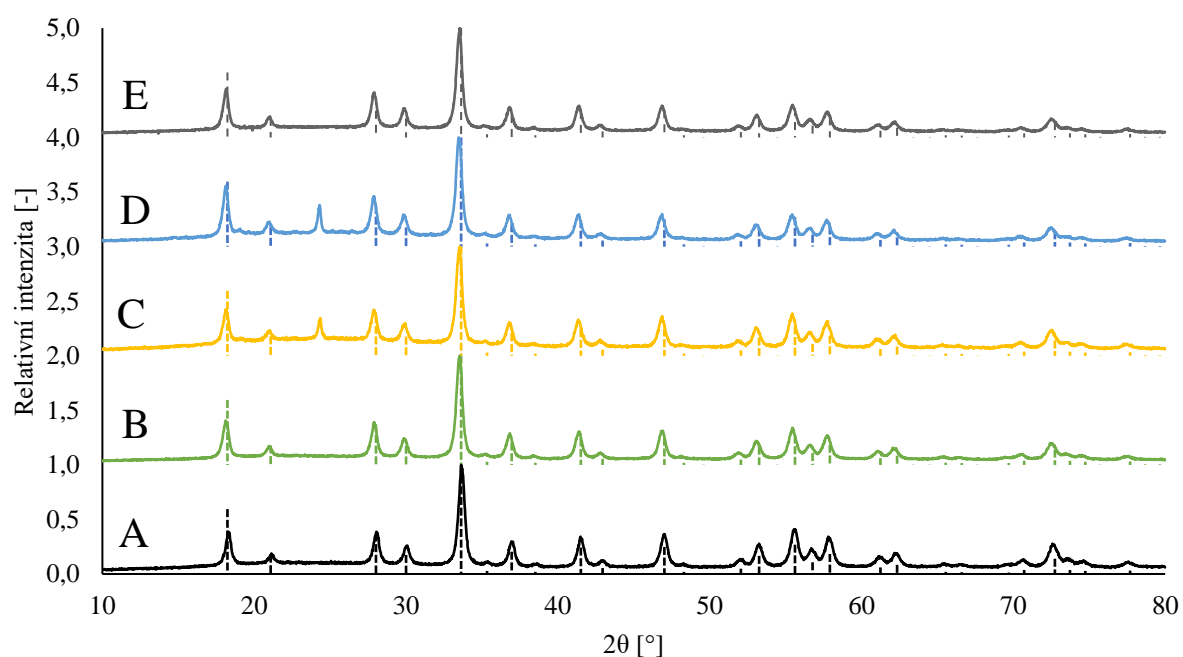
Velikost připravených nanočástic byla měřena pomocí XRD za použití Halder-Wagnerovy linearizace. Výsledky jsou v Tab. 1. Zde je vidět jasný trend rostoucí velikosti

krystalitů s rostoucí teplotou kalcinace. I tento trend byl již popsán v literatuře (Uhlich *et al.*, 2007).

Tab. 1: Velikost krystalitů nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup> žíhaných při různých teplotách.

teplota žíhání [°C]	velikost krystalitů [nm]
900	17
1000	29
1100	43
1200	57

Změřením práškové difrakce lyofilizovaného vzorku kalcinovaného při 1000 °C byla potvrzena fázová čistota připravených nanočástic. Velikost krystalitů v lyofilizovaném vzorku byla srovnatelná s velikostí krystalitů získaných mikrofiltrací a následným sušením při 40 °C na vzduchu.



Obr. 9: Difraktogramy nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup> (A) a jeho modifikací: LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub> (B), LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX (C), LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX-PEG (D) a LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-FA (E).



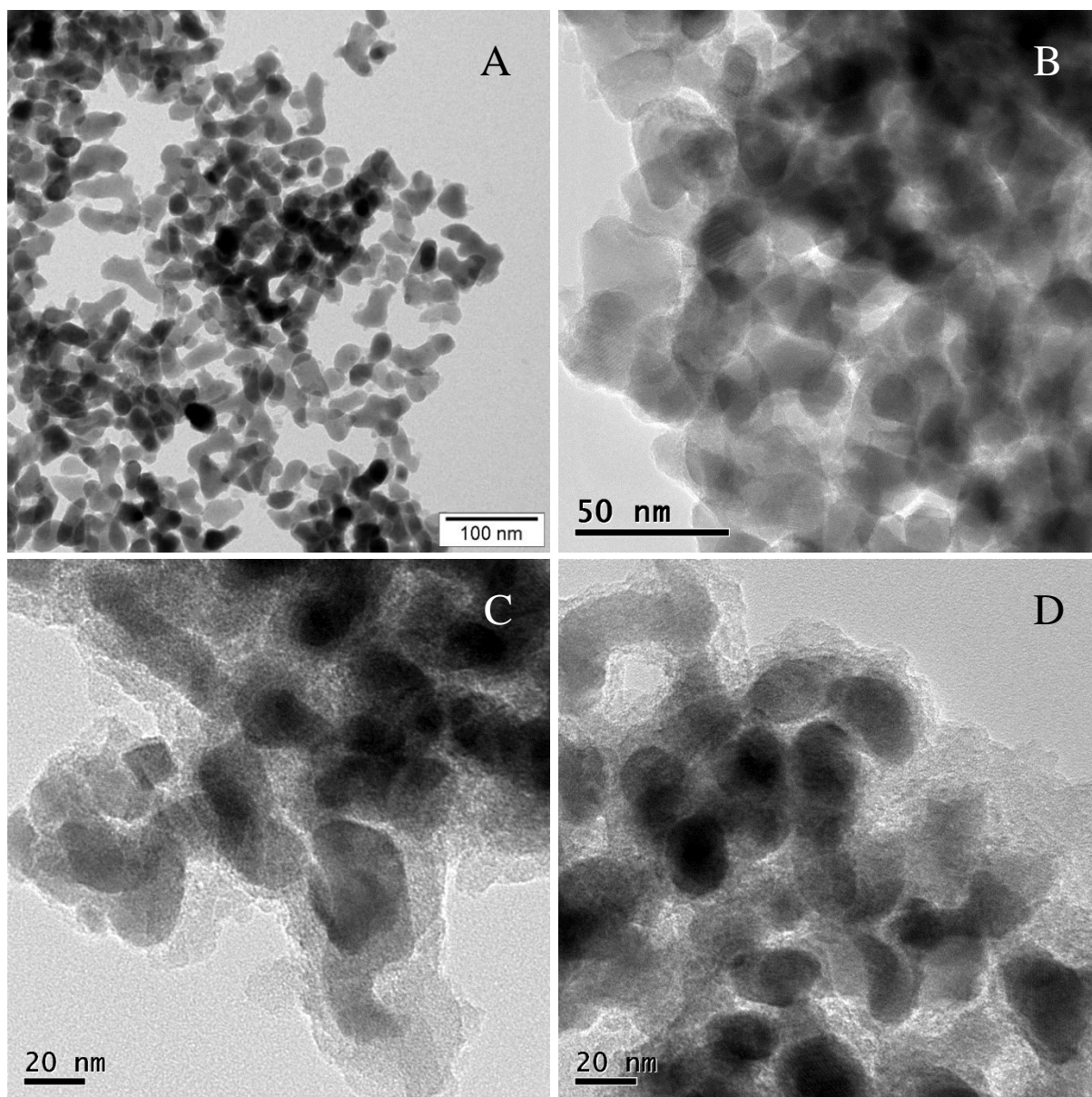
## 4.2. Modifikace povrchu nanočásticového jádra

Veškeré další experimenty byly prováděny s nanočásticemi žíhanými na 1000 °C. Tato teplota byla zvolena jako kompromis mezi intenzitou luminiscence a velikostí krystalitů.

Nanočásticové jádro bylo postupně modifikováno obalem SiO<sub>2</sub>, fotosenzitivním PpIX a PEG, resp. FA zajišťujícími biokompatibilitu, popřípadě aktivní cílení nanokompozitu.

### 4.2.1. Fázová čistota

Analýza XRD potvrdila fázovou čistotu připravených nanočástic a zároveň, jak je patrné z difraktogramů na Obr. 9, vyvrátila jakoukoliv změnu krystalické struktury jádra v průběhu modifikace jeho povrchu. V difraktogramech C a D je patrný jeden pík navíc oproti



Obr. 10: TEM snímky jednotlivých kroků přípravy nanokompozitu. A - LuAG:Pr<sup>3+</sup>; B - LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>; C - LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX; D - LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX-PEG.

zbylým difraktogramům. Jeho poloha odpovídá  $27,86^\circ$  a protože se jedná o jediné dva vzorky obsahující PpIX, lze předpokládat, že tento pík náleží krystalické fázi PpIX.

#### 4.2.2. Transmisní elektronová mikroskopie

Snímky z TEM (Obr. 10) byly pořízeny za účelem získání lepší představy o skutečné velikosti částic a jejich tendenci ke shlukování se. Z obrázku je patrné, že samotné krystality nepřekračují rozměry několika desítek nm, problém je však v tom, že vznikají větší agregáty spojené krčky, pravděpodobně již během kalcinace. Jejich velké rozměry pak způsobují sedimentaci nanokompozitu v roztoku a omezují jeho účinnost v organismu. Zároveň lze pozorovat, že modifikace jednotlivými obalovými materiály byla úspěšná. Avšak i zde dochází spíše k obalení shluku nanočástic než k obalení jednotlivých částic, což rovněž může být problematické. Zlepšení může poskytnout fragmentace a frakcionalizace částic spolu koloidní stabilizací pomocí stabilizátorů, např. kyseliny citronové (Kaman *et al.*, 2009).

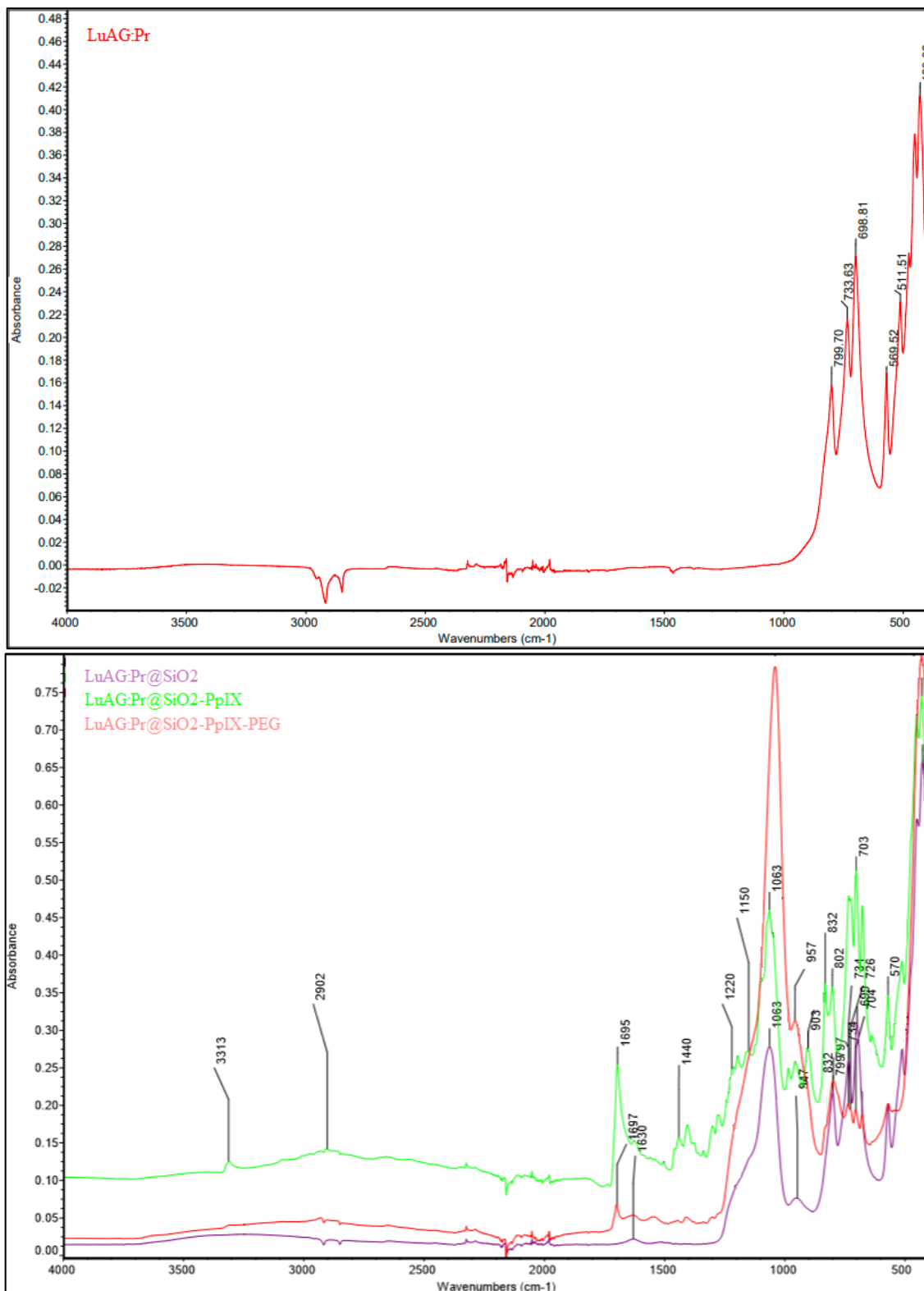
#### 4.2.3. Infračervená spektroskopie

V oblasti od  $500$  do  $900\text{ cm}^{-1}$  je přítomno několik intenzivních píků na  $800$ ,  $699$  a  $512\text{ cm}^{-1}$  (Obr. 11 nahoře), které typicky náleží vazbě M-O ( $M = \text{Lu}, \text{Al}$ ), konkrétně jde o vibrace tetraedru  $[\text{AlO}_4]$  a oktaedru  $[\text{AlO}_6]$ . Přítomnost těchto píků indikuje vznik fáze LuAG, což je v souladu s difraktogramy z XRD.

Spektrum nanokompozitu  $\text{LuAG:Pr}^{3+}@\text{SiO}_2$  (Obr. 11 dole) se vyznačuje několika píky v oblasti do  $1000\text{ cm}^{-1}$  ( $799$ ,  $734$ ,  $569\text{ cm}^{-1}$ ), které odpovídají valenčním a deformačním vibracím vazeb mezi atomy Si a O (Si-O-Si, O-Si-O). Velmi intenzivní pík na  $1063\text{ cm}^{-1}$  lze připsat valenčním vibracím Si-O-Si. Přítomnost tohoto píku i ve spektrech dále modifikovaných nanokompozitů potvrzuje, že navázáním dalších látek na povrch  $\text{LuAG:Pr}^{3+}@\text{SiO}_2$  nedochází ke změně obalu  $\text{SiO}_2$ . Zajímavý je nárůst intenzity tohoto pásu u nanokompozitů modifikovaných PpIX a poté i PEG, který je pravděpodobně způsoben překryvem s dalšími pásy náležícími valenčním vibracím C-O molekul PEG a PpIX (Ansari *et al.*, 2012).

Ve spektru  $\text{LuAG:Pr}^{3+}@\text{SiO}_2\text{-PpIX}$  je možné pozorovat výše zmíněný pík na  $1063\text{ cm}^{-1}$ , významný je také signál na  $1695\text{ cm}^{-1}$ , jenž lze přiřadit valenčním vibracím C=O vazby karboxylových skupin PpIX. Intenzivnější signály v oblasti pod  $3000\text{ cm}^{-1}$  pak svědčí o přítomnosti  $-\text{CH}_2-$  a  $-\text{CH}_3$  skupin.

Intenzita těchto píků však ve spektru LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX-PEG klesá, nicméně jejich přítomnost je patrná a opět potvrzuje přítomnost -CH<sub>2</sub>- a -CH<sub>3</sub> skupin. Jediný pík s vyšší intenzitou je na 1063 cm<sup>-1</sup>. Přítomnost PEG na povrchu nanokompozitu dále podporuje shoda signálů ve spektru čistého NHS-PEG se signály ve spektru LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX-PEG. V IR



Obr. 11: IR spektra nemodifikovaného (nahore) a modifikovaného LuAG:Pr<sup>3+</sup>.

spektru čistého NHS-PEG esteru je výrazný pík na  $1102\text{ cm}^{-1}$ , který náleží vazbě C-O-C. Dále významné jsou píky na  $2882\text{ cm}^{-1}$  (C-H valenční vibrace),  $1738\text{ cm}^{-1}$  (C=O valenční vibrace) a  $1341\text{ cm}^{-1}$  (N-O valenční vibrace; případně společně s  $1466\text{ cm}^{-1}$  -CH<sub>2</sub>- deformační vĕjířová vibrace). Lze identifikovat i píky na  $957\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> deformační krouťivá vibrace) a na  $841\text{ cm}^{-1}$  (C-C valenční vibrace) (Shameli *et al.*, 2012; Khanna *et al.*, 2013). Tyto píky lze najít i ve spektru nanokompozitu obaleného PEG s výjimkou pásu na  $1341\text{ cm}^{-1}$ . Jeho absence souhlasí s předpokládaným způsobem navázání PEG na povrch nanokompozitu, kdy dochází k vytvoření amidové vazby a odstoupení NHS skupiny. Mírný posun poloh píků je nejspíše spojen s chemickými zmĕnami nastávajícími při navázání polymeru.

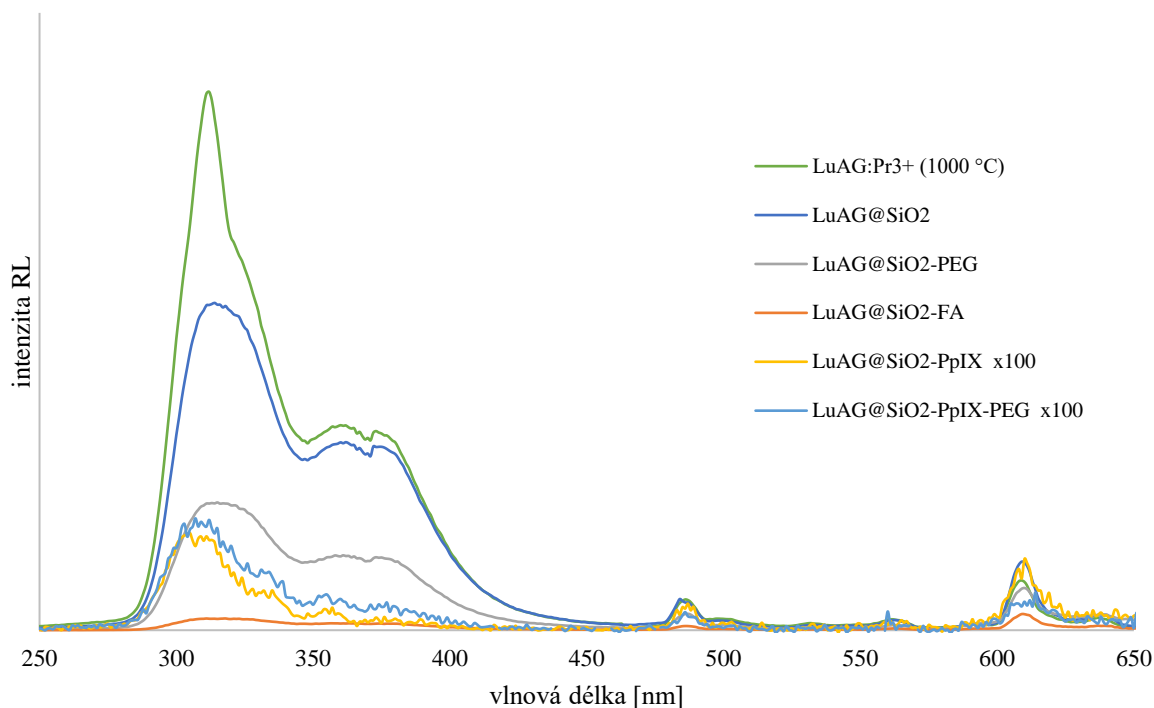
Nízká intenzita píků odpovídajících PEG je pravděpodobně způsobena tím, že vrstva polymeru je velmi tenká. V metodĕ ATR-FTIR tak paprsek nejspíše pronikne skrz tuto vrstvu a je zaznamenáván signál molekul nacházejících se „pod“ touto vrstvou. Z tohoto důvodu byly vzorku promĕřeny ještĕ metodou *grazing angle* s nadĕjí, že poskytne lepší výsledky. Avšak ani tato metoda nevedla k uspokojivým závĕrům. Lze tak předpokládat, že množství PEG je v porovnání s maticí (tj. nanočásticovým jádrem LuAG, obalovými vrstvami SiO<sub>2</sub> a PpIX) velmi malé a že jeho vrstva je příliš tenká na zmĕření touto metodou. Stejný problém nastal při mĕření vzorku modifikovaného kyselinou listovou.

#### 4.2.4. Intenzita radioluminiscence

Luminiscenční vlastnosti připraveného nanočásticového jádra a jeho jednotlivých modifikací byly zkoumány mĕřením emisního spektra po excitaci vzorku rentgenovým zářením (Obr. 12). Z emisního spektra je na první pohled patrný zachovaný tvar spektra u všech vzorků. Nejvyšší intenzitou píku na zhruba 310 nm disponuje podle oĕekávání nemodifikované jádro LuAG:Pr<sup>3+</sup>. Široký pás mezi 300 – 400 nm je způsoben, jak je již popsáno výše, přechody  $4f5d \rightarrow 4f^2$ , výrazně ménĕ intenzivní píky v oblasti nad 450 nm jsou dány přechody  $4f^2 \rightarrow 4f^2$  iontů Pr<sup>3+</sup>.

Intenzita RL v oblasti širokého pásu po obalení SiO<sub>2</sub> klesá, stejně jako po přidání další vrstvy polymeru PEG. U píků v oblasti nad 450 nm je pokles intenzity ménĕ významný.

Výrazný pokles intenzity RL u vzorků obsahujících PpIX je důkazem úspěšné absorpce záření emitovaného LuAG:Pr<sup>3+</sup> molekulami PpIX. Navíc porovnáním intenzit obou kompozitů obsahujících PpIX lze dojít k závĕru, že obalení vrstvou biokompatibilního PEG nemá významný vliv na intenzitu radioluminiscence.



Obr. 12: Rentgenem buzené emisní spektrum LuAG:Pr<sup>3+</sup> a jeho modifikací.

Zajímavým poznatkem je téměř absolutní utlumení luminiscence v případě nanokompozitu modifikovaného kyselinou listovou. Takové zjištění může diskvalifikovat FA jako vhodného kandidáta zajišťujícího biokompatibilitu a zároveň aktivní cílení na rakovinné buňky v organismu. Nicméně v tomto případě je nutné analyzovat luminiscenční chování nanokompozitu, který by obsahoval jak PpIX, tak FA, protože podobný jev byl pozorován i při modifikaci PEG, při porovnání intenzit kompozitu obsahujícího PpIX společně s PEG a kompozitu neobaleného PEG byly ale pozorovány jen nepatrné rozdíly. Nadějí může být i fakt, že přenos energie mezi organickými látkami (v tomto případě mezi FA a PpIX) je velice účinný, a tlumení způsobené FA by tak nemuselo být překážkou pro funkčnost nanokompozitu. Odpověď na tento problém lze nalézt změřením produkce singletního kyslíku.

#### 4.2.5. Termoanalýza

Termická analýza, konkrétně termogravimetrie a diferenciální termogravimetrie byla použita ke stanovení obsahu těkavých látek v jednotlivých vzorcích. Vzorky byly zahřívány v argonové atmosféře na 750 °C s krokem 10 °C/min. TG a DTG křivky jsou znázorněny na Obr. 13 a Obr. 14.

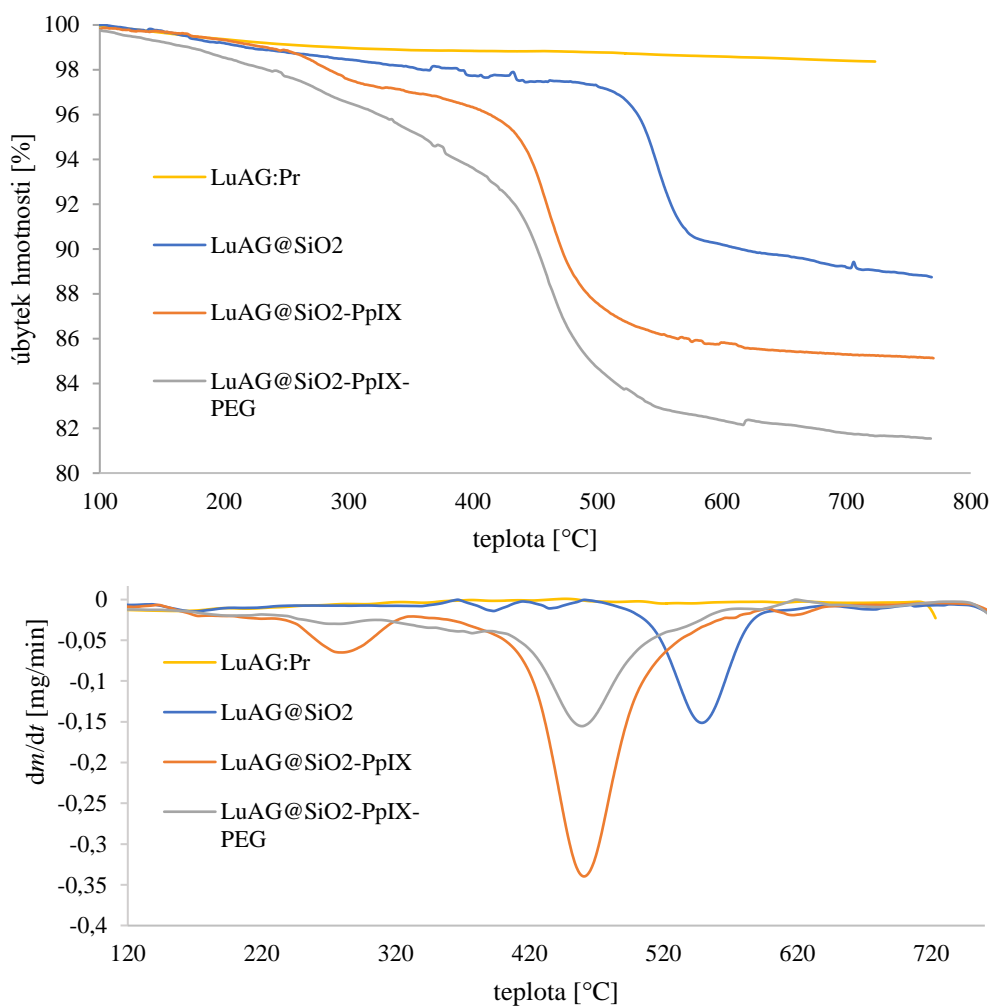
Termické zatížení prášku LuAG:Pr<sup>3+</sup> až na teplotu 750 °C neukázalo žádný prudký pokles hmotnosti. Celkový úbytek hmotnosti v tomto rozsahu teplot činil necelá dvě procenta a je dán uvolněním fyzicky vázané vody, případně etanolu. Termoanalýza tedy potvrzuje tepelnou stabilitu připravených nanočástic v rozsahu teplot 25 až 750 °C.

V případě LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub> je pozorován první výrazný pokles hmotnosti začínající na 490 °C, jehož hodnota odpovídá asi 9,5 % počáteční hmotnosti. Úbytek hmotnosti nastávající při nižších teplotách je dán ztrátou fyzikálně adsorbované vody, částečně může být rovněž způsoben rozkladem zbytkového TEOS. Zmiňovaný prudký pokles hmotnosti v oblasti nad 500 °C může být vysvětlen dvěma jevy – ztrátou strukturní vody (dehydroxylací) anebo kondenzací silanolu (Khanna *et al.*, 2013).

TG křivka nanokompozitu LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX ukazuje dvě oblasti poklesu hmotnosti, které lze oddělit na zhruba 330 °C. V oblasti pod 330 °C dochází ke ztrátě necelých 3 % hmotnosti a tato ztráta může být z malé části přičtena odstranění vody sorbované na povrchu vzorku, resp. zbytku činidel použitých při přípravě materiálu. Většina úbytku hmotnosti je však dána rozkladem PpIX. Ten probíhá ve dvou fázích – v první se rozkládají karboxylové skupiny; v druhé fázi nad 330 °C, kde ztráta hmotnosti činí asi 12 %, je rozloženo porfyrinové jádro PpIX (Popovich, 2020). Celková ztráta hmotnosti tedy činí necelých 15 % počáteční hmotnosti vzorku. Tato hodnota zároveň představuje celkové množství PpIX ve vzorku (úbytek hmotnosti připadající na vodu nebo ostatní činidla je menší než 1 %), což je hodnota odpovídající výsledkům z předchozích experimentů (Popovich, 2020).

Zajímavá je absence poklesu hmotnosti, která byla pozorována u prášku LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>. Jestliže je ztráta hmotnosti u LuAG@SiO<sub>2</sub> způsobena dehydroxylací, lze předpokládat, že OH skupiny na povrchu obalu SiO<sub>2</sub> se nějakým způsobem podílejí na vzniku vazby mezi vrstvou SiO<sub>2</sub> a fotosenzitivním PpIX.

V případě LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX-PEG byla zjištěna TG křivka podobná křivce nanokompozitu LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX. Největší pokles hmotnosti nastává ve stejné oblasti od 410 °C do 510 °C, jak je patrné z DTG křivek. Tento pokles je spojen, jak je zmíněno výše, především s rozkladem porfyrinového jádra, avšak v případě nanokompozitu obaleného navíc vrstvou PEG může k úbytku hmotnosti přispívat i rozklad právě tohoto polymeru. Na rozdíl od LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO-PpIX nastává úbytek hmotnosti ve větší míře při nižších teplotách. Určitý podíl má samozřejmě rozklad bočních řetězců PpIX, nicméně hlavní roli v tomto případě hraje rozklad PEG. Podle Khanna *et al.* je proces rozkladu samotného PEG dokončen na

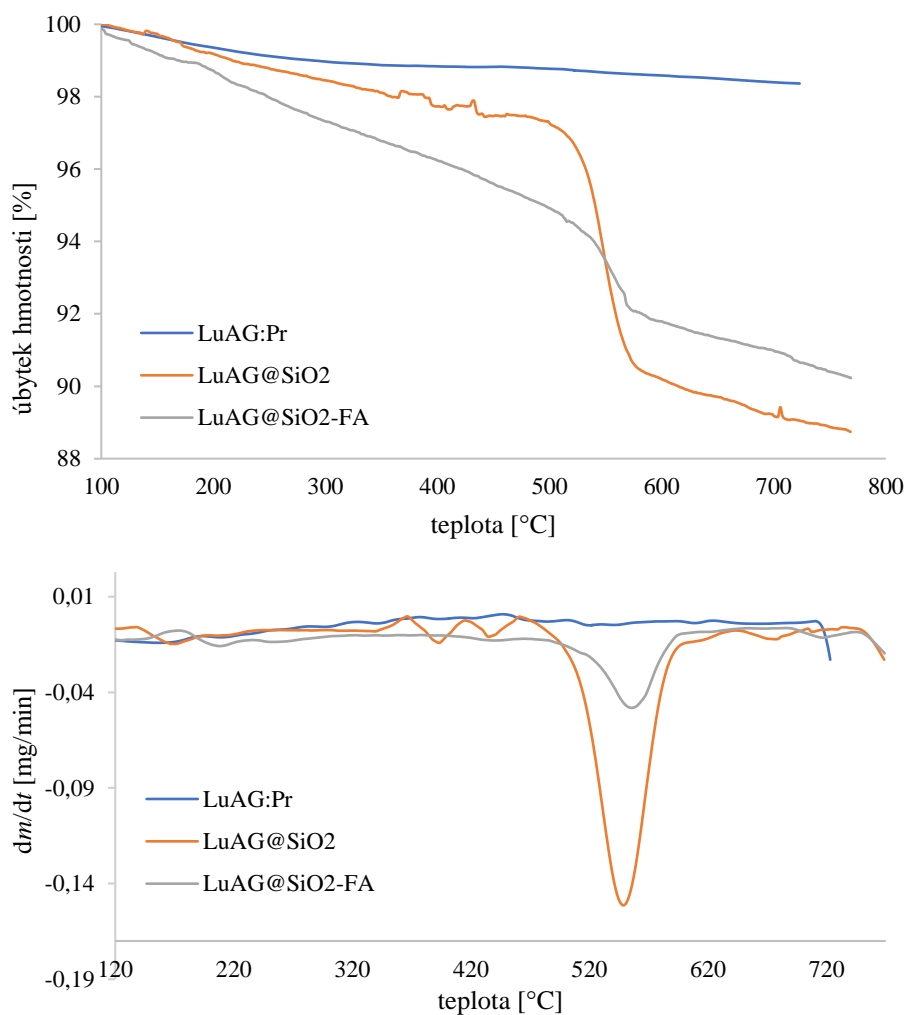


Obr. 13: TG (nahore) a DTG (dole) křivky LuAG:Pr<sup>3+</sup> a jeho modifikací.

184 °C (Khanna *et al.*, 2013). Dochází-li v tomto případě k rozkladu PEG při vyšších teplotách, lze předpokládat, že došlo ke vzniku kovalentních vazeb, díky čemuž byla zvýšena termální odolnost polymeru. Část úbytku je dána i desorpcí fyzikálně vázaného etanolu a vody. Porovnáním hmotnostního úbytku na koncích TG křivek lze odhadnout množství PEG přítomného ve vzorku na asi 3,5 %.

Nanokompozit LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub> obalený kyselinou listovou byl rovněž podroben termoanalýze (Obr. 14). Celkový úbytek hmotnosti činil zhruba 10 %, z nichž asi 1 % lze považovat za ztrátu způsobenou únikem adsorbované vody či jiných činidel použitých při syntéze.

Podle Vora *et al.* (Vora *et al.*, 2002) dochází k rozkladu FA v několika krocích. Nejprve je rozložena glutamová kyselina, následuje ztráta p-aminobenzoové kyseliny a na závěr je degradován pterin tvořený dvěma aromatickými řetězci. Tento proces je dokončen přibližně na 260 °C. V případě vzorku LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-FA nastal nejvýznamnější pokles hmotnosti (pravděpodobně spojený s rozkladem pterinu) v oblasti od 480 do 600 °C. Posun k vyšším



Obr. 14: TG (nahore) a DTG (dole) křivky nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup> modifikovaných kyselinou listovou.

teplotám může být způsoben vznikem chemické vazby mezi obalovými vrstvami SiO<sub>2</sub> a FA (Mohapatra *et al.*, 2007). Nižší úbytek hmotnosti při teplotě 550 °C než v případě LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub> je důkazem toho, že povrchové OH skupiny se podílejí na vzniku vazby mezi nanokompozitem a FA.

#### 4.2.6. Měrné povrchy

Měření specifického povrchu jádra nanokompozitu a jeho modifikací bylo provedeno za účelem pochopení procesů probíhajících při navazování dalších obalových vrstev na povrch nanokompozitu. Zároveň lze ze zjištěných hodnot odhadovat na trendy ve velikosti jednotlivých nanokompozitů. Naměřené specifické povrchy jsou uvedeny v Tab. 2.

Na základě získaných dat lze tvrdit, že namletí vzorku ve vibračním mlýně vede k nárůstu specifického povrchu. To je s největší pravděpodobností způsobeno rozbitím



aglomerátů a větších nanočástic na menší, u namletých nanočástic tak lze očekávat i snížení hydrodynamické velikosti (Obr. 18).

Tab. 2: Měrné povrchy nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup> a jejich modifikací.

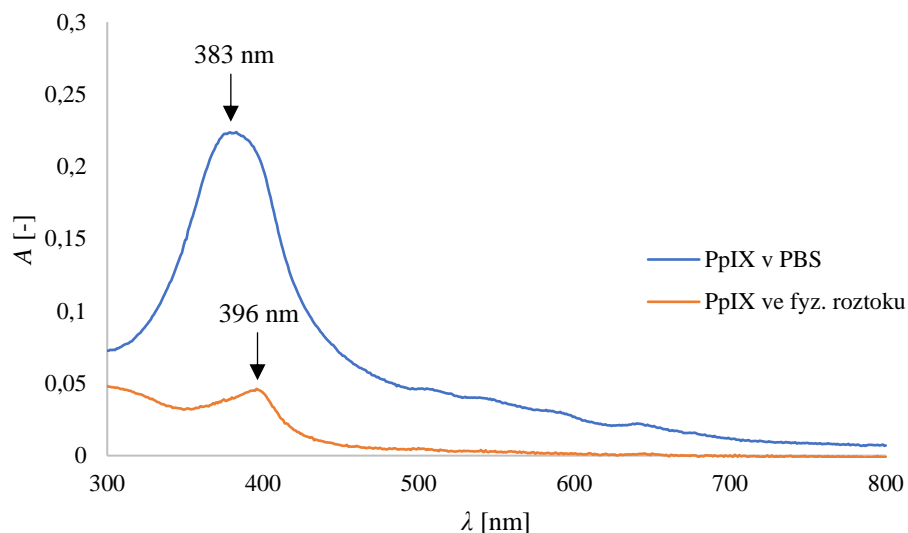
vzorek	specifický povrch [m <sup>2</sup> /g]
LuAG:Pr <sup>3+</sup> - mikrofiltrovaný	35,7
LuAG:Pr <sup>3+</sup> - mikrofiltrovaný, mletý	40,9
LuAG:Pr <sup>3+</sup> - lyofilizovaný	2,4
LuAG:Pr <sup>3+</sup> @SiO <sub>2</sub>	41,4 (42,2)*
LuAG:Pr <sup>3+</sup> @SiO <sub>2</sub> -PpIX	18,3 (19,8)*
LuAG:Pr <sup>3+</sup> @SiO <sub>2</sub> -PpIX-PEG	10,0 (10,6)*

\*hodnoty v závorce jsou po započtení sekundárního píku desorpční křivky – ten může být způsoben nastavením přístroje, anebo jevy probíhajícími na povrchu nanočástic

Dalším poznatkem je více než desetinásobný pokles specifického povrchu lyofilizovaných nanočástic oproti nanočásticím získaným mikrofiltrací. To je v souladu se snímkem z elektronového mikroskopu (Obr. 19), na kterých je patrný jeden velký shluk nanočástic. Lyofilizace tak nejspíše přispěla k vysoké míře shlukování nanočástic.

Obalení vrstvou SiO<sub>2</sub> (obalován byl mikrofiltrovaný nemletý LuAG:Pr<sup>3+</sup>) vede k nárůstu specifického povrchu. Vrstva SiO<sub>2</sub> tedy nejspíše zabraňuje dalšímu shlukování nanočástic a navíc (pravděpodobně díky své porositě) zvyšuje počet vazebných míst pro látku používané k další modifikaci kompozitu.

Navázáním PpIX na povrch LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub> došlo k více jak dvojnásobnému poklesu specifického povrchu. To může být zčásti způsobeno tím, že molekuly PpIX zaplní póry a prohlubně v obalu SiO<sub>2</sub>. Ve větší míře je však pokles dán aglomerací nanokompozitů. To je nežádoucí jev, který vede k nárůstu velikosti částice, čímž se zkracuje doba zdržení v organismu. Trend poklesu specifického povrchu pokračuje i při obalení vrstvou PEG. Opět je nejspíše obaleno „více nanočástic jednou vrstvou polymeru“. Příliš velké rozměry nanokompozitu významně omezují použitelnost v X-PDT. Z toho důvodu je nutné najít způsob opracování nanočástic, který by zabraňoval jejich agregaci.



Obr. 15: Absorpční spektra PpIX v PBS a fyziologickém roztoku.

### 4.3. Stanovení míry vymývání PpIX ve fyziologickém prostředí

#### 4.3.1. UV/VIS spektrofotometrie

Spektrofotometrická měření byla provedena za účelem stanovení množství PpIX uvolněného z nanokompozitů  $\text{LuAG:Pr}^{3+}@\text{SiO}_2\text{-PpIX}$  a  $\text{LuAG:Pr}^{3+}@\text{SiO}_2\text{-PpIX-PEG}$  při 24hodinovém promývání v PBS a fyziologickém roztoku.

Absorpční maximum PpIX v obou roztocích bylo stanoveno proměřením absorpčních spekter (Obr. 15). Z nich je patrné, že absorpční maximum PpIX v PBS je 383 nm, absorpční



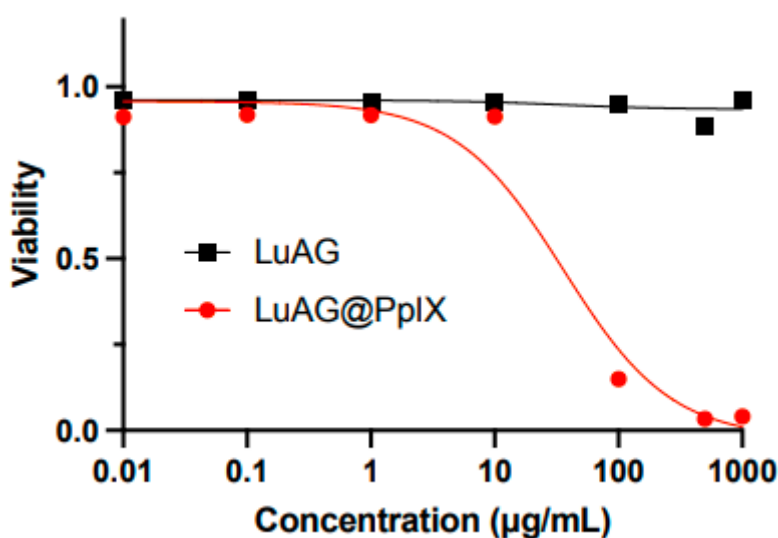
Obr. 16: Zabarvení fyziologického roztoku (uprostřed) a PBS (vpravo) v porovnání s destilovanou vodou (vlevo) po 24hodinovém promývání.

maximum PpIX ve fyziologickém roztoku je 396 nm. To je v souladu s hodnotami uváděnými v literatuře (Myrazkhetov *et al.*, 2021). Dále byla sestrojena kalibrační křivka pro oba roztoky, na jejímž základě byla následně určena koncentrace PpIX vymytého z nanokompozitů.

V případě LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX promývaného v PBS došlo k vymytí necelých 7 % celkové hmotnosti nanokompozitu. Obalení PEG vedlo ke snížení míry vymývání, konkrétně na 2,8 %. Pakliže byl nanokompozit promýván ve fyziologickém prostředí, trend byl opačný – množství PpIX vymyté z LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX činilo 3,9 %, pro pegylovaný nanokompozit toto množství stoupl na 4,6 %.

#### 4.4. Toxicita nanokompozitu

Toxicita samotného nanočásticového jádra LuAG:Pr<sup>3+</sup> a jádra modifikovaného vrstvou SiO<sub>2</sub> a PpIX byla testována ve spolupráci s Francouzským národním institutem pro výzkum zdraví a medicíny (INSERM). Studie byly prováděny na buňkách lidské rakoviny slinivky břišní PANC-1 a hydrodynamická velikost částic nanokompozitu činila přibližně 200 nm. Míra přežití byla měřena 6 dní po inkubaci. Z výsledků plyne v podstatě nulová toxicita nanočásticového jádra LuAG:Pr<sup>3+</sup>, a to v rozsahu koncentrací 0,01 – 1000 µg/ml. Oproti tomu nanokompozit s navázaným PpIX se vyznačuje zvýšenou toxicitou již při koncentracích nad 10 µg/ml s tím, že míra přežití při koncentraci 100 µg/ml je již pod úrovní 20 %. Doporučená koncentrace pro aplikaci v X-PDT tedy je stanovena na 10 µg/ml.



Obr. 17: Míra přežití buněk PANC-1 6 dní po inkubaci s nanočásticemi LuAG:Pr<sup>3+</sup> a LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX v závislosti na koncentraci nanočástic.

Při vyšších koncentracích nanokompozitu (0,5 mg/ml) byl pozorován tzv. efekt zvýšení dávky. Při ozáření nanokompozitu LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX rentgenovým zářením dochází kromě excitace samotného scintilujícího jádra i k interakci s okolním prostředím (fotoelektrický jev). V důsledku toho vznikají sekundární elektrony, které tak způsobují lokální nárůst absorbované dávky záření v okolí kompozitu.

Zároveň byla věnována pozornost i schopnosti nanokompozitu vyvolávat fotodynamický efekt. Byla porovnávána míra přežití buněk inkubovaných s nemodifikovaným jádrem LuAG:Pr<sup>3+</sup> s mírou přežití buněk, ke kterým byl přidán LuAG:Pr<sup>3+</sup> s navázaným PpIX. Ukázalo se, že na rozdíl od nemodifikovaných nanočástic dochází u nanokompozitu LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX ke značnému poklesu přeživších buněk již při dávce 2 Gy. S rostoucí dávkou se pak rozdíl v počtu přežívajících buněk mezi modifikovanými a nemodifikovanými nanočásticemi snižuje.

Důležitým faktorem je i míra vstupu nanočástic do vnitřního prostoru buněk. Rakovinné buňky PANC-1 byly inkubovány po dobu 24 hodin s nanokompozitem LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX o koncentraci 0,1 mg/ml a následně byly zobrazeny pomocí rentgenové fluorescenční mikroskopie. Získané snímky naznačují tendenci nanokompozitu aglomerovat se na povrchu buněk, nikoliv však uvnitř. To může být problém z hlediska účinnosti X-PDT. Řešení může poskytnout využití tzv. transmembránových proteinů, které zajišťují přenos látek důležitých pro chod buňky skrz buněčnou membránu. Mezi takové proteiny patří např. transferrinový či integrinový receptor nebo transportéry glukózy. Významný je i folátový receptor, což je glykoprotein bohatý na cystein, který s vysokou afinitou váže kyselinu listovou. Folátový receptor  $\alpha$  se nachází až na 40 % lidských rakovinných buněk (Zhang *et al.*, 2019). Z tohoto důvodu byla jako alternativa modifikace PEG zvolena kyselina listová.

## 5. Závěr

Použití multimodálních nanokompozitů v X-PDT umožňuje léčbu hlouběji lokalizovaných nádorů a společně s vyšší efektivitou léčby zajišťuje i sníženou toxickou zátěž pro okolní tkáň. V této diplomové práci byl připraven nanokompozit skládající se z jádra tvořeného LuAG:Pr<sup>3+</sup> a modifikujících vrstev – první vrstvu tvoří SiO<sub>2</sub>, dále je kompozit funkcionalizován fotosenzitivním PpIX a poslední modifikaci představuje biokompatibilní polymer PEG. Jako alternativa PEG je zmíněna kyselina listová, která kromě svých biokompatibilních vlastností disponuje i schopností aktivně cílit na své receptory nacházející se na některých rakovinných buňkách.

Při přípravě nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup> byl použit nový způsob oddělení prekurzoru od ozařovacího roztoku, lyofilizace. Velikost krystalitů mikrofiltrovaných a lyofilizovaných nanočástic byla srovnatelná, nicméně hodnoty specifického povrchu a dále pak TEM snímky poukazují na zvýšenou agregaci lyofilizovaných nanočástic. Shlukování nanočástic představuje problém i v případě mikrofiltrovaných nanočástic, proto bylo přistoupeno k mechanickému mletí. To sice vedlo k nárůstu specifického povrchu, což by mohlo indikovat rozrušení některých aglomerátů, avšak snímky z TEM opět svědčí o přítomnosti velkých shluků. To je zatím hlavní limitující faktor pro medicínskou aplikaci nanokompozitu. K obalování nanočástic totiž nedochází na jednotlivých částicích, ale na celých shlucích, jejichž velikost se pohybuje v řádu stovek nm. Takové rozměry předurčují nanokompozit k rapidnímu vyloučení z organismu, a znemožňují tak účinnou léčbu. I nadále je tedy třeba hledat způsoby přípravy (anebo opracování) nanočástic, které zabrání slučování jednotlivých částic (které samy o sobě mají rozměry nižších desítek nm) v příliš rozměrné celky. Jedním z možných řešení může být koloidní stabilizace připravených nanočástic za pomoci různých stabilizátorů.

Z hlediska luminiscenčních vlastností bylo pozorováno očekávané chování. Intenzita radioluminiscence jádra LuAG:Pr<sup>3+</sup> roste s rostoucí teplotou kalcinace. Povrchová modifikace byla provedena na nanočásticích žíhaných při 1000 °C. Tato teplota byla zvolena jako kompromis s ohledem na velikost částic a intenzitu luminiscence. Obalení jádra vrstvami SiO<sub>2</sub>, PEG a FA bylo prokázáno pomocí FTIR a termoanalýzy. Nicméně přítomnost obalových materiálů na povrchu nanočástic vedla ke snížení intenzity radioluminiscence, protože dochází k absorpci záření právě těmito materiály.

Z toxikologických studií vyplývá téměř nulová toxicita nanočásticového jádra LuAG:Pr<sup>3+</sup>. Míra přežití buněk PANC-1 při inkubaci s LuAG:Pr<sup>3+</sup>@SiO<sub>2</sub>-PpIX se snižuje až

na úroveň pod 20 % při koncentraci 100 µg/ml, což je s největší pravděpodobností kvůli přítomnosti PpIX. Z toho důvodu je třeba do budoucna zvážit použití jiného fotosenzitizéru. Některé alternativy jsou nastíněny v teoretické části. Dále byl prokázána schopnost nanokompozitu vyvolávat fotodynamický efekt, a to již při dávce 2 Gy. Limitujícím faktorem v tomto případě je snížená míra vstupu nanokompozitu do vnitřního prostoru buněk. Lze předpokládat, že pegylací tato míra naroste, což povede k vyšší účinnosti nanokompozitu. Obalení kyselinou listovou pak nejenže zajistí zvýšený příjem buňkami, ale vzhledem k přítomnosti receptorů kyseliny listové na některých rakovinných buňkách i zvýšenou specifitu působení kompozitu. Tím dojde ke snížení radiační a toxické zátěže okolních zdravých tkání.

## 6. Literatura

ABRAHAMSE, Heidi a Michael R. HAMBLIN. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal* [online]. 2016, **473**(4), 347-364 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20150942

ALLISON, R.R., H.C. MOTA a C.H. SIBATA. Clinical PD/PDT in North America: An historical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2004, **1**(4), 263-277 [cit. 2022-02-20]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi:10.1016/S1572-1000(04)00084-5

ANSARI, Anees A., S.P. SINGH, N. SINGH a B.D. MALHOTRA. Synthesis of optically active silica-coated NdF<sub>3</sub> core-shell nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2012, **86**, 432-436 [cit. 2022-02-22]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2011.10.063

BÁRTA, Jan, Václav ČUBA, Milan POSPÍŠIL, Vítězslav JARÝ a Martin NIKL. Radiation-induced preparation of pure and Ce-doped lutetium aluminium garnet and its luminescent properties. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2012, **22**(32) [cit. 2022-03-22]. ISSN 0959-9428. Dostupné z: doi:10.1039/c2jm32766j

BÁRTA, Jan. Radiation- and Photo-induced Preparation of Synthetic Garnets Based on LuAG (Lu<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>). Praha, 2015. Disertační práce. Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská při Českém vysokém učení technickém.

BOUKERIKA, A. a L. GUERBOUS. Investigation of the structural and photoluminescence properties of Ce<sup>3+</sup>-doped LuAG nanopowders prepared via sol-gel method. *Optical Materials* [online]. 2015, **40**, 14-19 [cit. 2022-02-20]. ISSN 09253467. Dostupné z: doi:10.1016/j.optmat.2014.11.039

COULEAUD, Pierre, Vincent MOROSINI, Céline FROCHOT, Sébastien RICHETER, Laurence RAEHM a Jean-Olivier DURAND. Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale* [online]. 2010, **2**(7) [cit. 2022-02-20]. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/c0nr00096e

DAEMS, Noami, Carine MICHIELS, Stéphane LUCAS, Sarah BAATOUT a An AERTS. Gold nanoparticles meet medical radionuclides. *Nuclear Medicine and Biology* [online]. 2021, **100-101**, 61-90 [cit. 2022-02-28]. ISSN 09698051. Dostupné z: doi:10.1016/j.nucmedbio.2021.06.001

DING, Zexuan, Peng LIU, Dehong HU, et al. Redox-responsive dextran based theranostic nanoparticles for near-infrared/magnetic resonance imaging and magnetically targeted photodynamic therapy. *Biomaterials Science* [online]. 2017, **5**(4), 762-771 [cit. 2022-02-20]. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C6BM00846A

DROZDOWSKI, W., P. DORENBOS, R. DROZDOWSKA, A. J. J. BOS, N. R. J. POOLTON, M. TONELLI a M. ALSHOURBAGY. Effect of Electron Traps on Scintillation of Praseodymium Activated Lu<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>. *IEEE Transactions on Nuclear Science* [online]. 2009, **56**(1), 320-327 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0018-9499. Dostupné z: doi:10.1109/TNS.2008.2011269

FLEIŠMANN, Jindřich. Biokompatibilizace nanočástic. Praha, 2019. Bakalářská práce. Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská při Českém vysokém učení technickém.

HARRIS, J. Milton. *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*. New York: Plenum Press, c1992. ISBN 0306440784.

HONG, Seong-Pyo, Seong Hee KANG, Do Kyung KIM a Bo Sun KANG. Paramagnetic G d 2 O 3 Nanoparticle-Based Targeting Theranostic Agent for C6 Rat Glioma Cell. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2016, **2016**, 1-10 [cit. 2022-02-20]. ISSN 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2016/7617894

HU, Jun, Yong'an TANG, Ahmed H. ELMENOUFY, Huibi XU, Zhen CHENG a Xiangliang YANG. Nanocomposite-Based Photodynamic Therapy Strategies for Deep Tumor Treatment. *Small* [online]. 2015, **11**(44), 5860-5887 [cit. 2022-03-28]. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201501923

CHOI, Kyong-Hoon, Ki NAM, Guangsup CHO, Jin-Seung JUNG a Bong PARK. Enhanced Photodynamic Anticancer Activities of Multifunctional Magnetic Nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Conjugated with Chlorin e6 and Folic Acid in Prostate and Breast Cancer Cells. *Nanomaterials* [online]. 2018, **8**(9) [cit. 2022-02-20]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano8090722

JALILIAN, Amir Reza, Seyyedeh Leila HOSSEINI-SALEKDEH, Morteza MAHMOUDI, Hassan YOUSEFNIA, A. MAJDABADI a Majid POULADIAN. Preparation and biological evaluation of radiolabeled-folate embedded superparamagnetic nanoparticles in wild-type rats. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* [online]. 2011, **287**(1), 119-127 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0236-5731. Dostupné z: doi:10.1007/s10967-010-0661-y

JAYANTA, Dolai, Mandal KUHILI a Jana R. NIKHIL. Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications. *ACS Applied Nano Materials* [online]. **2021**, **4**(7), 6471-6496 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: doi:10.1021/acsanm.1c00987

JOSEFSEN, Leanne B. a Ross W. BOYLE. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Metal-Based Drugs* [online]. 2008, **2008**, 1-23 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0793-0291. Dostupné z: doi:10.1155/2008/276109

KAMAN, O, E POLLERT, P VEVERKA, et al. Silica encapsulated manganese perovskite nanoparticles for magnetically induced hyperthermia without the risk of overheating. *Nanotechnology* [online]. 2009, **20**(27) [cit. 2022-04-11]. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/20/27/275610

KENNEDY, JAMES C., STUART L. MARCUS a ROY H. POTTIER. Photodynamic Therapy (PDT) and Photodiagnosis (PD) Using Endogenous Photosensitization Induced by 5-Aminolevulinic Acid (ALA): Mechanisms and Clinical Results. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* [online]. 1996, **14**(5), 289-304 [cit. 2022-02-20]. ISSN 1044-5471. Dostupné z: doi:10.1089/clm.1996.14.289

KHAING OO, Maung Kyaw, Xiaochuan YANG, Henry DU a Hongjun WANG. 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. *Nanomedicine* [online]. 2008, **3**(6), 777-786 [cit. 2022-02-20]. ISSN 1743-5889. Dostupné z: doi:10.2217/17435889.3.6.777

KHANNA, Lavanya a N.K. VERMA. Silica/potassium ferrite nanocomposite: Structural, morphological, magnetic, thermal and in vitro cytotoxicity analysis. *Materials Science and Engineering: B* [online]. 2013, **178**(18), 1230-1239 [cit. 2022-02-20]. ISSN 09215107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mseb.2013.08.004

KHANNA, Lavanya a Narendra K. VERMA. PEG/CaFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite: Structural, morphological, magnetic and thermal analyses. *Physica B: Condensed Matter* [online]. 2013, **427**, 68-75 [cit. 2022-02-20]. ISSN 09214526. Dostupné z: doi:10.1016/j.physb.2013.05.040



- KOBAYASHI, Hisataka, Rira WATANABE a Peter L. CHOYKE. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target?. *Theranostics* [online]. 2014, **4**(1), 81-89 [cit. 2022-04-07]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.7193
- KUMAR, S. Arun a J. SENTHILSELVAN. Silica encapsulated LuAG: Pr<sup>3+</sup> nanocrystals by surfactant assisted co-precipitation and microwave calcination. *Materials Chemistry and Physics* [online]. 2019, **233**, 296-309 [cit. 2022-02-20]. ISSN 02540584. Dostupné z: doi:10.1016/j.matchemphys.2019.05.062
- M, Pekker. Interaction between Electrolyte Ions and the Surface of a Cell Lipid Membrane. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics* [online]. 2015, **5**(2) [cit. 2022-02-20]. ISSN 21610398. Dostupné z: doi:10.4172/2161-0398.1000177
- MOHAPATRA, S, S K MALLICK, T K MAITI, S K GHOSH a P PRAMANIK. Synthesis of highly stable folic acid conjugated magnetite nanoparticles for targeting cancer cells. *Nanotechnology* [online]. 2007, **18**(38) [cit. 2022-02-20]. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/18/38/385102
- MONTASERI, Hanieh, Cherie Ann KRUGER a Heidi ABRAHAMSE. Inorganic Nanoparticles Applied for Active Targeted Photodynamic Therapy of Breast Cancer. *Pharmaceutics* [online]. 2021, **13**(3) [cit. 2022-02-20]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics13030296
- MORGAN, Nicole Y., Gabriela KRAMER-MAREK, Paul D. SMITH, Kevin CAMPHAUSEN a Jacek CAPALA. Nanoscintillator Conjugates as Photodynamic Therapy-Based Radiosensitizers: Calculation of Required Physical Parameters. *Radiation Research* [online]. 2009, **171**(2), 236-244 [cit. 2022-04-11]. ISSN 0033-7587. Dostupné z: doi:10.1667/RR1470.1
- MYRZAKHMETOV, Bauyrzhan, Philippe ARNOUX, Serge MORDON, Samir ACHERAR, Irina TSOY a Céline FROCHOT. Photophysical Properties of Protoporphyrin IX, Pyropheophorbide-a, and Photofrin® in Different Conditions. *Pharmaceutics* [online]. 2021, **14**(2) [cit. 2022-02-23]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph14020138
- NAAHIDI, Sheva, Mousa JAFARI, Faramarz EDALAT, Kevin RAYMOND, Ali KHADEMHOSEINI a P. CHEN. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2013, **166**(2), 182-194 [cit. 2022-04-14]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.12.013
- PALLARES, Roger M., Peter AGBO, Xin LIU, Dahlia D. AN, Stacey S. GAUNY, Steven E. ZELTMANN, Andrew M. MINOR a Rebecca J. ABERGEL. Engineering Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted Alpha Therapy against Breast Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2020, **12**(36), 40078-40084 [cit. 2022-02-28]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.0c11051
- POPOVICH Kseniya. Biofunctionalization of luminescent nanocomposites. Praha, 2020. Disertační práce. Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská při Českém vysokém učení technickém.
- POPOVICH, Kseniya, Karel KLEPARNIK, Vojtech LEDVINA, et al. Luminescent Nanocomposites for Biomedical Applications. *IEEE Transactions on Nuclear Science* [online]. 2020, **67**(6), 962-968 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0018-9499. Dostupné z: doi:10.1109/TNS.2020.2974316

POPOVICH, Kseniya, Kateřina TOMANOVÁ, Václav ČUBA, Lenka PROCHÁZKOVÁ, Iveta Terezie PELIKÁNOVÁ, Ivo JAKUBEC, Eva MIHÓKOVÁ a Martin NIKL. LuAG: Pr<sup>3+</sup>-porphyrin based nanohybrid system for singlet oxygen production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2018, **179**, 149-155 [cit. 2022-04-19]. ISSN 10111344. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.01.015

PRIMO, Fernando L., Leandro MICHIELETO, Marcilene A.M. RODRIGUES, Patrícia P. MACAROFF, Paulo C. MORAIS, Zulmira G.M. LACAVAL, Maria Vitória L.B. BENTLEY a Antonio C. TEDESCO. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 2007, **311**(1), 354-357 [cit. 2022-02-20]. ISSN 03048853. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmmm.2006.10.1183

ROMÁN, José V, Miguel A GALÁN a Eva M Martín DEL VALLE. Preparation and preliminary evaluation of alginate crosslinked microcapsules as potential drug delivery system (DDS) for human lung cancer therapy. *Biomedical Physics & Engineering Express* [online]. 2016, **2**(3) [cit. 2022-02-20]. ISSN 2057-1976. Dostupné z: doi:10.1088/2057-1976/2/3/035015

ROSSI, Liane M., Paulo R. SILVA, Lucas L. R. VONO, Adjaci U. FERNANDES, Dayane B. TADA a Maurício S. BAPTISTA. Protoporphyrin IX Nanoparticle Carrier: Preparation, Optical Properties, and Singlet Oxygen Generation. *Langmuir* [online]. 2008, **24**(21), 12534-12538 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la800840k

SACHAR, M., K. E. ANDERSON a X. MA. Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2016, **356**(2), 267-275 [cit. 2022-02-20]. ISSN 1521-0103. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.115.228130

SHAMELI, Kamyar, Mansor BIN AHMAD, Seyed Davoud JAZAYERI, Sajjad SEDAGHAT, Parvaneh SHABANZADEH, Hossein JAHANGIRIAN, Mahnaz MAHDAVI a Yadollah ABDOLLAHI. Synthesis and Characterization of Polyethylene Glycol Mediated Silver Nanoparticles by the Green Method. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(6), 6639-6650 [cit. 2022-02-20]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms13066639

SHIN, Youngchan, Deokkyu LEE, Kangtaek LEE, Kyung Hyun AHN a Bumsang KIM. Surface properties of silica nanoparticles modified with polymers for polymer nanocomposite applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2008, **14**(4), 515-519 [cit. 2022-02-20]. ISSN 1226086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2008.02.002

STUCHINSKAYA, Tanya, Miguel MORENO, Michael J. COOK, Dylan R. EDWARDS a David A. RUSSELL. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochemical & Photobiological Sciences* [online]. 2011, **10**(5) [cit. 2022-02-20]. ISSN 1474-905X. Dostupné z: doi:10.1039/c1pp05014a

TRISTANTINI Budi, Dewi & Slamet, Slamet & Mustikasari, Rini & Widuri,. (2011). Modification of TiO<sub>2</sub> Nanoparticle with PEG and SiO<sub>2</sub> For Anti-fogging and Self-cleaning Application. *International Journal of Engineering & Technology*. 11. 80-85.

TU, Hsiung-Lin, Yu-Shen LIN, Hsia-Yu LIN, Yann HUNG, Leu-Wei LO, Yang-Fang CHEN a Chung-Yuan MOU. In vitro Studies of Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Advanced Materials* [online]. 2009, **21**(2), 172-177 [cit. 2022-02-28]. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200800548

UHLICH, Dominik, P. HUPPERTZ, D.U. WIECHERT a Thomas JÜSTEL. Preparation and characterization of nanoscale lutetium aluminium garnet (LuAG) powders doped by Eu<sup>3+</sup>. *Optical Materials* [online]. 2007, **29**(11), 1505-1509 [cit. 2022-02-20]. ISSN 09253467. Dostupné z: doi:10.1016/j.optmat.2006.07.013

VONDRÁŠKOVÁ, Apolena, Jan BÁRTA, Alena BEITLEROVÁ, Vítězslav JARÝ, Václav ČUBA a Martin NIKL. Pr-doped Lu<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub> scintillation nanopowders prepared by radiation method. *Journal of Luminescence* [online]. 2016, **179**, 21-25 [cit. 2022-02-20]. ISSN 00222313. Dostupné z: doi:10.1016/j.jlumin.2016.06.047

VORA, A, A RIGA, D DOLLIMORE a Kenneth S ALEXANDER. Thermal stability of folic acid. *Thermochimica Acta* [online]. 2002, **392-393**, 209-220 [cit. 2022-02-20]. ISSN 00406031. Dostupné z: doi:10.1016/S0040-6031(02)00103-X

WANG, Guohao, Shi GAO, Rui TIAN, et al. Theranostic Hyaluronic Acid-Iron Micellar Nanoparticles for Magnetic-Field-Enhanced in vivo Cancer Chemotherapy. *ChemMedChem* [online]. 2018, **13**(1), 78-86 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1002/cmdc.201700515. ISSN 18607179.

WANG, Linxiang, Min YIN, Changxin GUO a Weiping ZHANG. Synthesis and luminescent properties of Ce<sup>3+</sup> doped LuAG nano-sized powders by mixed solvo-thermal method. *Journal of Rare Earths* [online]. 2010, **28**(1), 16-21 [cit. 2022-02-20]. ISSN 10020721. Dostupné z: doi:10.1016/S1002-0721(09)60041-7

XU, Zhi Ping, Qing Hua ZENG, Gao Qing LU a Ai Bing YU. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science* [online]. 2006, **61**(3), 1027-1040 [cit. 2022-02-20]. ISSN 00092509. Dostupné z: doi:10.1016/j.ces.2005.06.019

YOUSSEF, Zahraa, Valérie JOUAN-HUREAUX, Ludovic COLOMBEAU, et al. Titania and silica nanoparticles coupled to Chlorin e6 for anti-cancer photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2018, **22**, 115-126 [cit. 2022-02-20]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2018.03.005

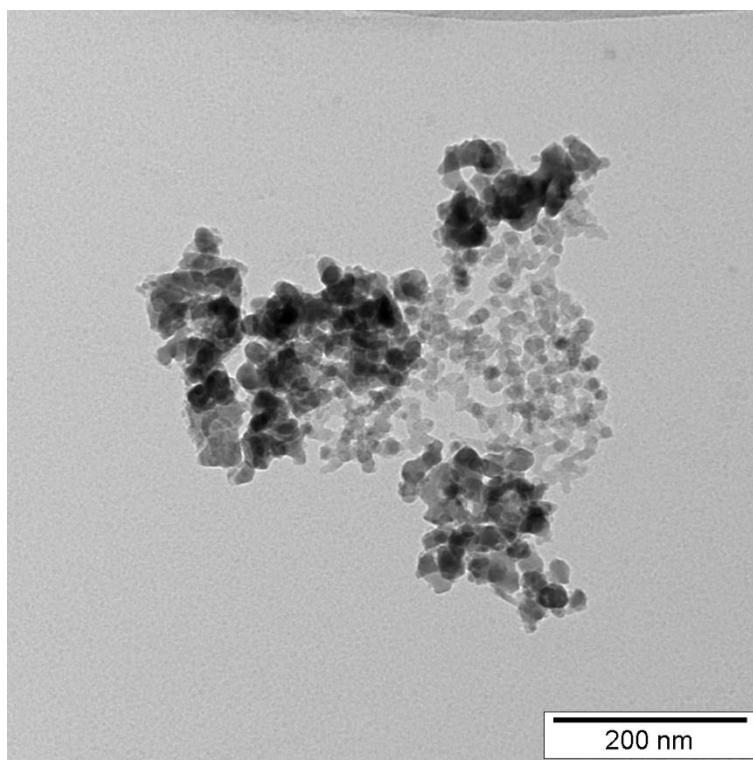
ZHANG, Renshuai, Xiaofei QIN, Fandong KONG, Pengwei CHEN a Guojun PAN. Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with components of cell membrane. *Drug Delivery* [online]. 2019, **26**(1), 328-342 [cit. 2022-04-07]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717544.2019.1582730

ZHANG, Yong, Nathan KOHLER a Miqin ZHANG. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* [online]. 2002, **23**(7), 1553-1561 [cit. 2022-02-20]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(01)00267-8

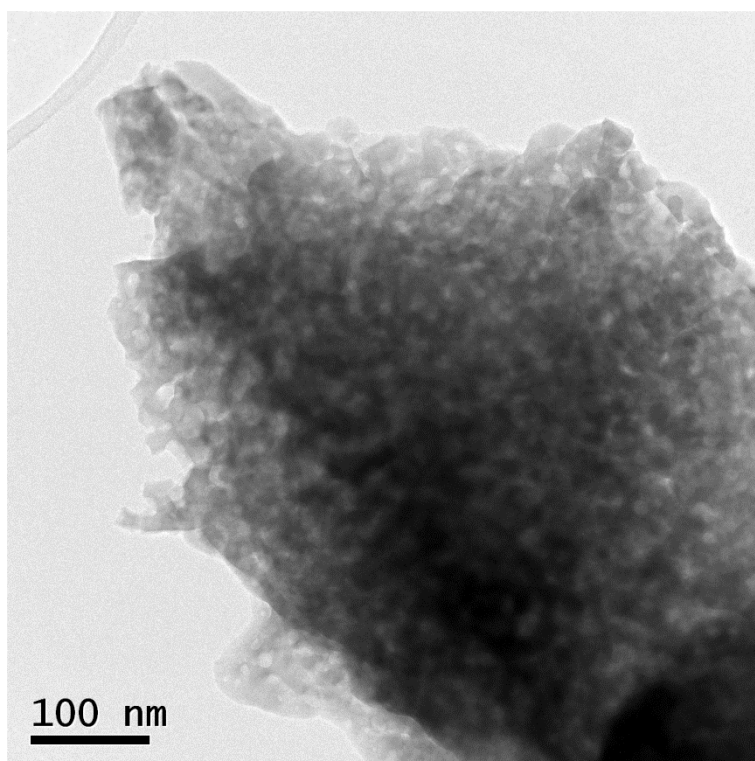
## 7. Seznam chemikálií

název	vzorec	výrobce	čistota	M <sub>r</sub>
(3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> Si	Sigma Aldrich	≥98,0 %	221,37
amoniak, vodný roztok 25%	NH <sub>4</sub> OH	Lach-Ner	p.a.	35,05
dekahydrát dusičnanu hlinitého	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich	99,997 %	375,13
dimethylsulfoxid (DMSO)	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Penta	p.a.	78,13
ethanol absolutní	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Penta	p.a.	46,07
hydrát dusičnanu lutecitého	Lu(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·x H <sub>2</sub> O (x=5)	Sigma Aldrich	99,999 %	360,98
hydroxid sodný	NaOH	Penta	p.a.	40,00
kyselina chlorovodíková	HCl	Lach-Ner	p.a.	36,46
kyselina listová	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	Sigma Aldrich	≥97 %	441,40
mravenčan amonný	HCOONH <sub>4</sub>	Sigma Aldrich	≥99,995 %	63,06
N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid (EDC)	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	≥97 %	155,24
N-hydroxysukcinimid	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	98 %	115,09
protoporfyrin IX	C <sub>34</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	Echelon Biosciences	-	562,66
tetraethyl orthosilikát (TEOS)	Si(OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>4</sub>	Sigma Aldrich	≥99,0 %	208,33
tetrahydrofuran (THF)	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	Penta	p.a.	72,11
triethylamin	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N	Penta	p.a.	101,2
zásobní roztok Pr <sup>3+</sup> , konc. 15·10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-
α,ω – di – sukcinimidyl (polyethylenglykol) glutarát	PEG-(NHCO-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> - CONHS) <sub>2</sub>	Rapp Polymere	-	3000

## 8. Přílohy



Obr. 18: TEM snímek mikrofiltrovaných mletých nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup>.



Obr. 19: TEM snímek lyofilizovaných nanočástic LuAG:Pr<sup>3+</sup>.