



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií



Příprava nových typů hybridních nanomateriálů

Diplomová práce

Studijní program:

N3942 Nanotechnologie

Studijní obor:

Nanomateriály

Autor práce:

Bc. Hana Šinkorová

Vedoucí práce:

Mgr. Veronika Máková, Ph.D.

Katedra chemie





Zadání diplomové práce

Příprava nových typů hybridních nanomateriálů

Jméno a příjmení: **Bc. Hana Šinkorová**
Osobní číslo: **M17000154**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Zadávací katedra: **Katedra chemie**
Akademický rok: **2019/2020**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat literární rešerši týkající se hybridních nanomateriálů na bázi organosilanů a jejich využití.
2. Zvolit vhodnou metodu přípravy navrženého hybridního systému.
3. Připravit vzorky navrženého hybridního nanomateriálu.
4. Charakterizovat připravené vzorky pomocí standardních metod např. SEM, TEM a dalších.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby
40-50 stran
tištěná
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. A. Fahmi, T. Pietsch, C. Mendoza, N. Cheval, Functional hybrid materials, *Materialstoday*, 2009, (12)5, ISSN:13697021.
2. D. Avnir, L. C. Klein, D. Levy, U. Schubert, A. B. Wojcik, *Organo-Silica Sol-Gel Materials*, 2003, DOI: 10.1002/0470857250.ch40.
3. M.F. Ashby, Y.J.M. Bréchet, Designing hybrid materials, *Acta Materialia*, 2003, 51, 58015821.
4. G.Kickelbick, Hybrid materials synthesis, characterization and applications, 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-31299-3, 517p.
5. S. S. Park, M. S. Moorthy, C.-S. Ha, Periodic mesoporous organosilicas for advanced applications, *NPG Asia Materials* 2014, 6, e96; DOI:10.1038/am.2014.13.
6. E. A. Prasetyanto, A. Bertucci, D. Septiadi, R. Corradini, P. C. Hartmann, L. De Cola, Breakable Hybrid Organosilica Nanocapsules for Protein Delivery, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 3323 3327.
7. L. Maggini et. al. Breakable mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery, *Nanoscale*, 2016, DOI: 10.1039/C5NR09112H.

Vedoucí práce:

Mgr. Veronika Máková, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání práce:

10. října 2019

Předpokládaný termín odevzdání:

18. května 2020

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

L.S.

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Jsem si vědoma toho, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má diplomová práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala především mé vedoucí Mgr. Veronice Mákové, Ph.D., která svými postřehy a nápady obohatila nejen tuto práci, ale i mé postupy v bádání a mě samotnou. Díky jejím radám, nápadům a připomínkám jsem byla schopna dokončit tuto práci na lepší úrovni, než bych já sama zvládla. Cenné rady, za které jsem jim moc vděčná, přišly i od Ing. Mgr. Báry Holubové, Ph.D. a RNDr. Michala Řezanky, Ph.D.

Dále bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali s testováním vzorků, jmenovitě Ing. Janě Müllerové, Ph.D., Ing. Martinu Stuchlíkovi, Ph.D., Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D., Bc. Petře Šubrtové, Ing. Šárce Hauzerové, Ing. Miroslavě Rysové, Mgr. Janě Karpíškové, Ph.D,

Také bych chtěla poděkovat holkám z kanclíku, které mi vždy ochotně pomohly a poradily. A v neposlední řadě své rodině a příteli za velkou podporu a povzbuzení k dokončení práce.

ANOTACE

Tato práce je zaměřena na přípravu a charakterizaci nových typů hybridních nanomateriálů založených na bázi organosilanů, které by se daly uplatnit především v medicínských aplikacích, ale i jinde. Sol-gel metodou připravené hybridní nanočástice byly charakterizovány pomocí dusíkové adsorbce, skenovací elektronové mikroskopie (SEM), transmisní elektronové mikroskopie (TEM), termogravimetrické analýzy (TGA). Dále byla testována cytotoxicita a štěpení S-S vazeb. Do hybridních nanočástic byla inkorporována léčiva L-dopa a doxorubicin (DOX).

KLÍČOVÁ SLOVA

Hybridní materiály, nanočástice, organosilany, degradabilita, cytotoxicita.

ANNOTATION

This thesis deals with the preparation and characterisation of new hybrid nanomaterials based on organosilanes, which have the potential to be used in many applications, particularly in medicine. Particles prepared by the sol-gel method were characterized via different techniques including nitrogen adsorption, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and thermogravimetric analysis (TGA). Furthermore, cytotoxicity and cleavage of -S-S- bonds were tested. The drugs L-dopa and doxorubicin (DOX) were tested with the aim to use them as loading agents into the hybrid nanoparticles.

KEYWORDS

Hybrid materials, nanoparticles, organosilanes, degradability, cytotoxicity.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BTEB	1,4-bis(triethoxysilyl)benzen
BTEE	1,2-bis(triethoxysilyl)ethan
BTEENE	Bis(triethoxysilyl)ethylen
BTEPDS	Bis[3-(triethoxysilyl)propyl]disulfid
BTEPTS	Bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfid
CFN	Cellulose nanofiber (celulózové nanovláknó)
CNT	Carbon nanotubes (uhlíkové nanotrubicé)
CTAB	Cetyltrimethylamoniumbromid
CTAC	Cetyltrimethylamoniumchlorid
DMEM	Dubleccovo modifikované Eaglovo médium
DOX	Doxorubicin hydrochlorid
EDS	Energiově disperzní analýza
Et	Ethyl ($-CH_2 - CH_3$)
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GSH	Gluthation
KCH	Katedra chemie
L-dopa	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine
MCTA	Mercury cadmium telluride detector
Me	Methyl ($-CH_3$)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid zároveň i test metabolické aktivity buněk
NC	Negativní kontrola
PA	Polyamid
PC	Pozitivní kontrola
PE	Polyethylen
PES	Polyester
PET	Polyethylentereftalát
PP	Polypropylen
PS	Polystyren
PEG	Polyethylenglykol

PLA	Kyselina polymléčná
PLGA	Kopolymer kyseliny glykolové a mléčné
rpm	Revolutions per minute (otáčky za minutu)
r.t.	Room temperature (pokojová teplota)
SBF	Simulated body fluid (simulovaná tělní tekutina)
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TEOS	Tetraethylorthosilikát
TGA	Termogravimetrická analýza
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUL	Technická univerzita v Liberci
UV-Vis	Ultrafialovo-viditelná oblast

OBSAH

1. Úvod	12
2. Teoretická část	13
2.1. Nanomateriály.....	13
2.1.1. Historický vývoj.....	13
2.1.2. Metody přípravy.....	14
2.1.3. Charakteristické vlastnosti	15
2.1.4. Základní rozdělení nanomateriálů.....	15
2.2. Hybridní materiály.....	17
2.2.1. Organosilany a další organo-křemičité sloučeniny	19
2.2.2. Příprava hybridních organosilanových nanočástic	20
2.2.3. Vlastnosti a výhody hybridních organosilanových nanočástic	21
2.2.4. Degradabilita hybridních organosilanových nanočástic a její faktory.....	23
2.3. Hybridní organosilanové nanočástice a jejich potenciál v medicíně.....	24
2.3.1. Reálné biomedicínské aplikace	25
2.3.2. Biokompatibilita vs. potenciální toxicita hybridních nanočástic	25
3. Experimentální část	28
3.1. Použité materiály	28
3.2. Syntézy nanočástic.....	29
3.2.1. Nanočástice typ A	29
3.2.2. Nanočástice typ B	30
3.2.3. Nanočástice typ C	31
3.3. Testování vlastností a charakterizace připravených nanočástic	32
4. Výsledky a diskuze	37
4.1. Tvar a velikost nanočástic podle skenovacího elektronového mikroskopu.....	37
4.2. Struktura částic získaná pomocí transmisního elektronového mikroskopu.....	39
4.3. Porozita a specifický měrný povrch částic získaný dusíkovou adsorpcí.....	41

4.4. Termogravimetrická analýza	44
4.5. Ramanova spektroskopie	44
4.6. Degradabilita částic podle skenovacího elektronového mikroskopu.....	45
4.7. Výsledky loadování léčiv získané z UV-Vis	47
4.8. Výsledky cytotoxicity	48
5. Závěr	50
6. Literatura.....	51
7. Přílohy.....	55

1. ÚVOD

Hitem posledních let jsou nanočástice, nanovlákná, tenké vrstvy nanorozměrů, obecně nanomateriály a proto není divu, že narůstá i využití těchto materiálu ve všech odvětvích. Nanočástice jsou již běžně využívány v potravinářském průmyslu, kosmetice, pro dekontaminaci životního prostředí a je jim také věnována velká pozornost co se týče drug-delivery systémů (řízená doprava léčiv).

Kromě toho, že se hledají nové materiály vhodné pro řízenou dopravu léčiv, je potřeba se věnovat i toxikologické stránce těchto materiálů, neboť působení nanočástic v organismu může ovlivnit fungování centrální nervové soustavy CNS nebo kardiovaskulárního systému. Navíc se z velké části toxikologické účinky materiálů mohou v nano podobě velmi odlišovat od toxicity makroskopických látek. Toto je velká motivace proč zkoušet hledat nové typy nanomateriálů, které se navíc mohou rozpadat a díky tomu snižovat toxicitu, neboť může docházet k jejich rychlejšímu vylučování z organismu.

Oxid křemičitý je vhodným základem těchto materiálů, neboť slibuje skvělé fyzikálně-chemické vlastnosti, jako jsou: kontrolovatelná velikost, složení, morfologie, porézní struktura. Přidáním vhodných organokřemičitých prekurzorů lze připravit nejrozličnější hybridní materiály s odlišnými vlastnostmi. Široké spektrum vlastností připravených organokřemičitých materiálů představuje i široké možnosti jejich využití.

Použití tři metod přípravy hybridních materiálů vedlo k přípravě rozdílných nanočástic, u kterých byly zjišťovány jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, dále bylo testováno jejich štěpení vlivem glutathionu, cytotoxicita a také byly nanočástice dopovány dvěma druhy léčiv.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. NANOMATERIÁLY

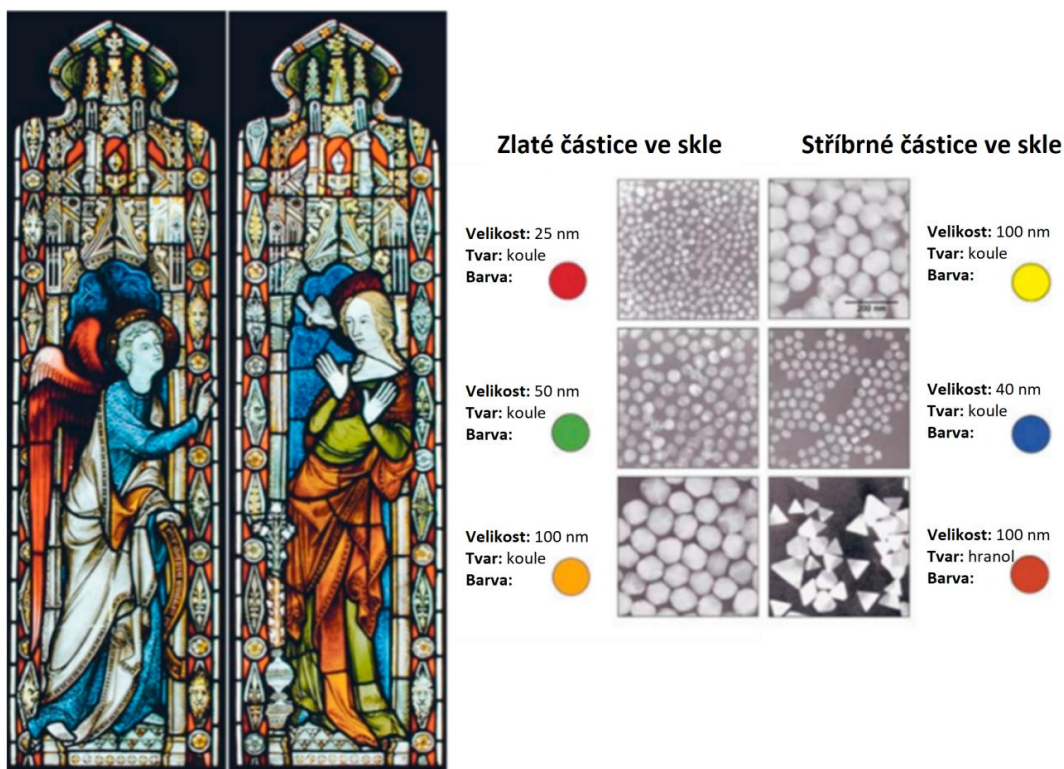
Předpona nano- je odvozena z řeckého slova *nannos*, které v překladu znamená trpaslík a vyjadřuje přesně jednu miliardtinu celku (10^{-9}). Podle ISO normy *ISO/TR 18401:2017* jsou nanomateriály definovány jako materiály, které mají jakýkoli vnější rozměr v nano-měřítku, tj. do 100 nm. Nanomateriály jsou unikátní především tím, že se jejich vlastnosti mohou značně lišit od vlastností makrolátek stejného materiálu.

2.1.1. Historický vývoj

V Londýnském muzeu leží důkaz, že již naši dávní předci, uměli, i když nevědomky, využívat vlastností nanomateriálů. Výroba poháru, zachycujícího smrt krále Lykurguse je datována do 4. století našeho letopočtu. Lykurgův pohár je unikátní tím, že mění svoji barvu v závislosti na umístění světelného zdroje. Pokud je světelný zdroj mimo kalich, nádoba se jeví hrachově zelená. Bude-li se však zdroj světla nacházet uvnitř kalichu, pohár bude na pohled tmavě vínovo-červený. Existuje pár dalších fragmentů římského skla, které také vykazují tzv. „dichoický efekt“, ale barvy nejsou tak intenzivní. Takovéto sklo obsahuje nanočástice zlata a stříbra o rozměru 70 nm. (Barber a Freestone 1990; Binns 2010)

K dalším příkladům nanočástic z dávné historie patří mnoho oken kostelů, kde například červená skla jsou získána příměsí zlatého prachu. V muzeu vitráží ve Velké Británii můžeme nalézt zářný příklad takovýchto skel, které jsou dopovány jak nanočásticemi zlata, tak i stříbra. (Obr. 1) Jak si můžeme všimnout, rozdílnosti barev je zde dosaženo nejen různým chemickým složením a velikostí nanočástic, ale i jejich tvarem.

V dalších stoletích se začaly používat glazury pro keramiku s přidavkem nanočástic stříbra nebo mědi. Z počátku se používaly převážně v islámském světě, ale následně se rozšířily i do Evropy. (Bayda et al. 2020)



Obrázek 1: Barevné efekty nanočástic zlata a stříbra, ovlivněné jejich tvarem a velikostí. (Bayda et al. 2020)

(Pozn.: Originální popisky v obrázku přeloženy z angličtiny do češtiny.)

2.1.2. Metody přípravy nanomateriálů

Přípravu nanomateriálů můžeme rozdělit do dvou postupů:

- **Top-down** (shora dolů) zde je výchozí látkou makro látka a jejím postupným zmenšováním (prostorovým omezováním) získáváme nanostruktury. Zmenšování objemu látky můžeme dosáhnout mletím, mechanickým drcením, chemickým rozpouštěním, fotofyzikální ablací, ultrazvukem apod. (Fojtík 2014) Tento v současnosti lépe dosažitelný přístup byl úspěšně používán pro výrobu polovodičových zařízení ve spotřební elektronice. (Nasrollahzadeh et al. 2019)
- **Bottom-up** (zdola nahoru) u kterého dochází k vytváření nanomateriálů skládáním jednotlivých atomů a molekul.

Do této skupiny můžeme zařadit metody syntézy, jako jsou chemická depozice, syntéza v plazmě, aj. (syntézy nanočástic z plynné fáze) nebo samoorganizace (self-assembly), sol-gel metody atd. (syntézy z kapalné fáze).

Proces samoorganizace je navíc postupem, který používá příroda k opravě tkání a buněk v živých organismech a pro životní procesy jako je např. syntéza proteinů. (Nasrollahzadeh et al. 2019)

2.1.3. Charakteristické vlastnosti

Jak již bylo zmíněno, vlastnosti nanomateriálů se mohou značně odlišovat od vlastností makrolátů, to může být způsobeno velikým povrchem, který je pro nanomateriály charakteristický, nebo vznikem fyzikálních či chemických dějů které mohou probíhat mezi tak malými částicemi. Změny se mohou projevit mnoha rozdílnými způsoby např. změnou barvy, elektrické vodivosti nebo pevností v tahu.

2.1.4. Základní rozdělení nanomateriálů

Hlavním kritériem pro dělení nanomateriálů je jejich prostorové omezení neboli objemová restrikce. Častým pojmem, se kterým se v souvislosti s tímto dělením můžeme setkat, je rozměrová delokalizace, která naopak odpovídá směrům, které nanorozměr značně převyšují.

Nanočástice se podle objemové restrikce (tab. 1) dělí na:

- 0D nanočástice
jsou prostorově omezeny ve všech třech směrech, tzn., že v žádném směru by neměly mít rozměr v makroměřítku.
- 1D nanovlákná
omezení ve dvou směrech, v jednom směru mají rozměr mnohonásobně vyšší než ve zbylých dvou směrech.
- 2D nanovrstvy a tenké filmy
omezeny v jednom směru, tedy ve dvou zbylých směrech dosahují makroskopických rozměrů.
- 3D periodické nanostruktury
makroskopická látka, která je tvořena periodicky se opakujícími nanostrukturami. (ISO/TR 18401:2017)

Tabulka 1: Přehled nanostruktur. (Fojtík 2014)

nanostruktura	objemová restrikce	prostorová delokalizace
0D nanočástice	(x,y,z)	-
1D nanovlákná	(x,y)	(z)
2D nanovrstvy	(x)	(y,z)
3D makrolátky	-	(x,y,z)

Dále nanomateriály dělíme podle vzniku na:

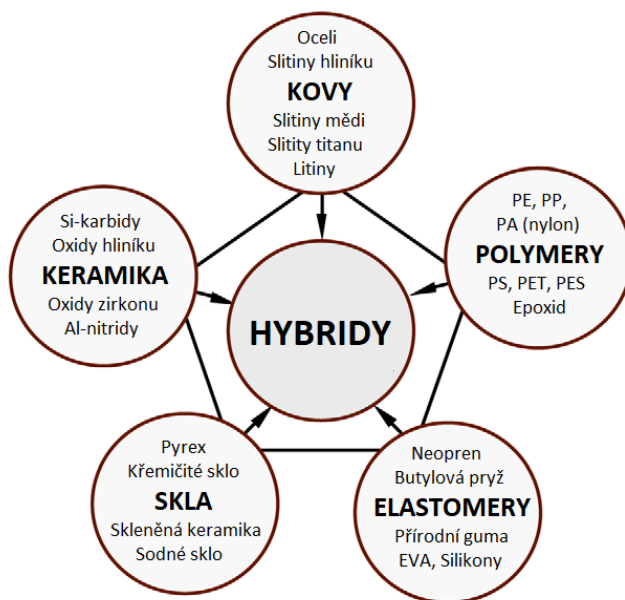
- Syntetické
uměle připravené materiály.
- Přírodní
mohou být přítomny v aerosolech nebo vyráběny jako vedlejší produkt (dým, prach).

Dalším základním dělením nanomateriálů je podle jejich chemického složení. Lze je tedy dělit na nanomateriály:

- Anorganické
čistě anorganických nanomateriálů je celá škála. Existují nanočástice kovů (zlato, stříbro, železo, atd.), oxidů kovů (TiO_2 , Al_2O_3 , SiO_2 , atd.), různé uhlíkové nanomateriály (nanotrubičky uhlíku - CNT, fulereny, aj.), různá anorganická vlákna a další.
- Organické
do zástupců organických nanomateriálů řadíme nejrozumnější polymerní nanovlákná a také např. dendrimery, konkrétně např. nanovlákná z kolagenu, celulozy, nebo nanočástice na bázi proteinů, či lipidů.
- Hybridní
kombinace obou předchozích skupin. Mezi zástupce patří např.: organicky funkcionalizované nanočástice kovů, nebo oxidu kovů a také např. polymerní materiály vyztužené pomocí CNT.

2.2. HYBRIDNÍ MATERIÁLY

Obecně lze za hybridní materiál považovat jakýkoliv materiál, který je složen ze dvou nebo více základních materiálů (obr. 2). V této práci se hybridním materiálem rozumí kombinace organických a anorganických materiálů provázána na molekulární úrovni.



Obrázek 2: Kombinace základních materiálů za vzniku materiálů hybridních. (Ashby a Bréchet 2003)

(Pozn.: Originální popisky v obrázku přeloženy z angličtiny do češtiny.)

První zmínka o hybridních materiálech a jejich použití se datuje do 8. století, kdy byla objevena tzv. Mayská modř. Tento pigment je hybridní anorganicko-organický nanokompozit, kde jsou organické molekuly barviva vázány pomocí vodíkových můstků uvnitř anorganické mřížky přírodního jílupalygorskitu. (Gómez-Romero a Sanchez 2005)

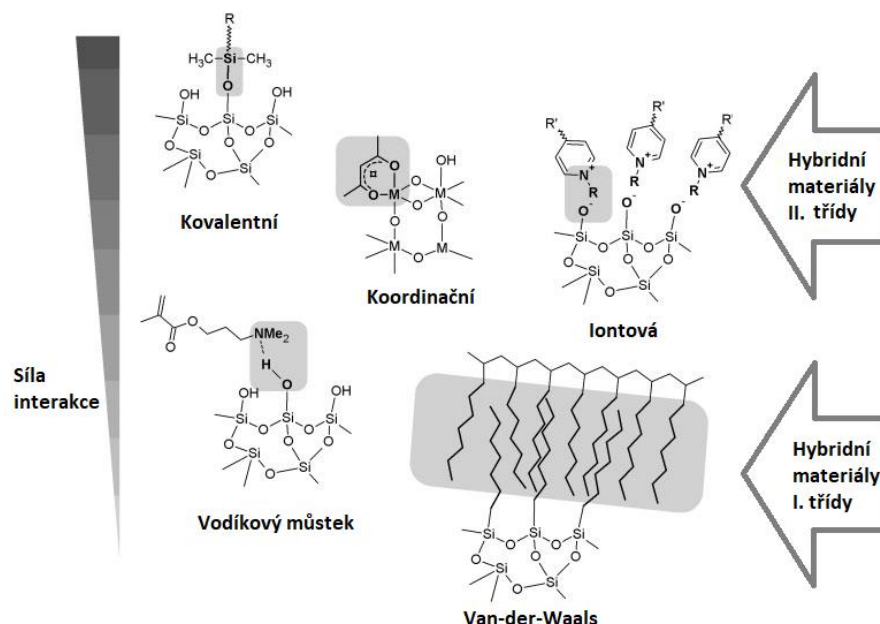
Začátky výrazného rozvoje hybridních materiálů v oblastech výzkumu a průmyslu sahají do 40. let 20. století. V 50. letech 20. století byla popsána interkalace organických jednotek uvnitř jílu ale pojem „hybridní kompozit“ byl vytvořen až v polovině 80. let. Ve velkém měřítku přispěl také obor týkající se rozvoje a vývoje metod sol-gel, jehož vznik se datuje k roku 1980 a který měl primárně podpořit vývoj a výrobu materiálů s různou strukturou, morfologií a fyzikálními vlastnostmi. (Rejab et al. 2019; Zhu a Yuan 2015) Metodu sol-gel si více popíšeme v kapitole 2.2.2.

Samotné hybridní materiály mohou mít kombinaci vlastností odvozených od jednotlivých výchozích materiálů nebo zcela nové vlastnosti, které závisí na prostorovém a velikostním rozdělení jejich organických a anorganických složek. (Fahmi et al. 2009) Více homogenních materiálů a lepšího provázání obou složek lze docílit snížením velikosti anorganických i organických složek na stejnou úroveň. (Kickelbick 2007) Organické materiály se využívají především pro jejich nízkou cenu, recyklovatelnost a snadné zpracování. (Liu 2014) Oproti tomu výhody anorganických materiálů tkví ve vysoké mobilitě náboje a vysoké tepelné stabilitě.

Hybridní materiály mohou být homogenní, kdy jsou odvozené od monomerů a mísitelných organických a anorganických složek nebo heterogenní (nanokompozity), zde by alespoň jedna složka měla mít velikost maximálně několik desítek nanometrů. (Vallet-Regí et al. 2010)

Podle druhu interakcí mezi organickou a anorganickou složkou hybridních materiálů můžeme rozdělit tyto materiály do dvou tříd (obr. 3) :

- **I. třída** – slabé mezimolekulární vazby (vodíkový můstek, Van der Waalsovy síly a slabé elektrostatické síly)
- **II. třída** – silné vazby (iontová, kovalentní a koordinační vazba) (Kickelbick 2007; Tanasa a Zanoaga 2012):



Obrázek 3: Typy interakcí u hybridních materiálů. (Kickelbick 2007)

(Pozn.: Originální popisky v obrázku přeloženy z angličtiny do češtiny.)

Příklady přírodních anorganicko-organických materiálů lze nalézt u skořápek měkkýšů, korýšů i kostí, včetně těch lidských. (Zhu a Yuan 2015)

2.2.1. Organosilany a další organo-křemičité sloučeniny

Oxid křemičitý SiO_2 se v přírodě nachází v 17 různých krystalických formách. Kromě výskytu nerostů jako je křemen a chalcedon je možné jej najít i u živé přírody jako biogenický SiO_2 , což je např. opál. Proto není překvapením, že se tomuto materiálu dostává ve výzkumu plné pozornosti.

Přípravou nových hybridních křemičitých materiálů se zabývá nesčetné množství publikací. Existují anorganicko-organické materiály, typu CERAMER a ORMOSIL, které si následně více představíme.

- Ceramery (Ceramers) jsou hybridní materiály, které lze připravit pyrolýzou preceramických prekursorů. materiály SiC nebo SiOC lze získat použitím monomerních silanů nebo polymerních siloxanů za použití techniky tvarování, zesíťování a pyrolitické přeměny v inertní atmosféře. Volba prekursorů a podmínky pyrolýzy, zejména tedy teplota, mohou značně ovlivnit pórovitost tohoto hybridního materiálu. Při teplotách vyšších než $800\text{ }^\circ\text{C}$ lze vyrábět SiOC a při teplotách okolo $1500\text{ }^\circ\text{C}$ SiC keramiku s nízkou pórovitostí. Vysoké pórovitosti, tedy i vysokého měrného povrchu materiálu se dosahuje při nižších teplotách. Pro hybridní materiály (ceramery) s vysokou pórovitostí a měrným povrchem je tedy potřeba proces pyrolýzy zastavit v procesu přeměny ($500\text{--}700\text{ }^\circ\text{C}$), kdy je polymer jen částečně přeměněn na keramiku. Takovéto ceramery jsou vhodné zejména pro adsorpční procesy a své využití by mohly najít u separace, skladování plynu, katalýzy atd. (Ionescu a Riedel 2012; Wilhelm et al. 2005)
- Biokeramika (Bioceramics) je dalším typem mezoporézních hybridních materiálů, kde se jedná o hostitelskou matici s molekulami léčiv. Léčivo je pomocí slabých interakcí uzavřeno v pórech. Dochází tedy k interakci mezi silanolovými skupinami vyskytujícími se na povrchu mezoporézních kanálků a funkčními skupinami léčiva. Často se musí navíc organicky modifikovat povrch částice a tím vznikají hybridní materiály. Důvodů takové modifikace může být hned několik. Jedním z příkladů je silně hydrofobní léčivo, které nejeví snahu proniknout do hydrofilního oxidu

křemičitého. Kromě zjevného využití těchto materiálů v systémech řízené dopravy léčiv, je lze použít také pro výrobu trojrozměrných scaffoldů pro inženýrství kostních tkání. Zde by namísto léčiv byla použita různá osteoindukční činidla jako jsou peptidy, hormony a růstové faktory. (Vallet-Regí et al. 2010)

- Ormosily (ormosils) jsou další a zdaleka ne poslední skupinou organicky modifikovaných silikátů. Lze je rozdělit do tří typů:
 - Typ A: Organická složka, kterou může být barvivo, je přimíchána k solu.
 - Typ B: Organická složka je vkládána do předem připraveného porézního gelu. Jeho poréznost a velikost pórů lze ovlivnit teplotou.
 - Typ C: Organická složka je přidána do solu, ale na rozdíl od typu A, zde vzniká mezi oxidem a organickou látkou chemická vazba.

Všechny typy dohromady vykazují širokou škálu vlastností a aplikací. (Mackenzie 1994)

2.2.2. Příprava hybridních organosilanových nanočástic

Obecně se hybridní materiály připravují následujícím způsobem:

- Kopolymerace funkčních organosilanů, makromonomerů a alkoxidů kovů.
 - Vzájemnou reakcí předem utvořených stavebních bloků vzniká hybridní materiál, kde si prekurzory zachovávají svou původní integritu.
 - Z prekurzorů, které jsou transformovány do struktury sítě, je vytvořena jedna nebo dvě strukturální jednotky. (Tanasa a Zanoaga 2012)
- Zapouzdření organických složek do nanočástic oxidu křemičitého nebo oxidů kovů.
- Různé funkcionalizace nanostruktur. (Gómez-Romero a Sanchez 2005; Rejab et al. 2019)

Typickou přípravou hybridních organosilových materiálů je tzv metoda sol-gel. Metodou sol-gel rozumíme soubor chemických postupů, které mají společné znaky a těmi jsou: homogenizace výchozích složek do podoby pravého roztoku, převedení do formy koloidního roztoku (solu) a následná transformace na gel a to za současného zachování homogenity jednotlivých složek. Mezi velké výhody této metody patří nejen vysoká čistota a homogenita produktů, ale také nízká teplota při výrobě, která je pro přípravu křemičitých materiálů netypická.

Jako prekurzory lze použít alkoxidy křemíku, které nejsou organicky modifikované jako je tetraethylorthosilikát (TEOS), alkoxidy jiných kovů např. alkoxid titanu a organicky modifikované alkoxidy křemíku s reaktivní nebo nereaktivní organickou funkční skupinou. Nereaktivní organickou funkční skupinou může být např. methyl (methylsilan) nebo fenyl. Typickou reaktivní funkční skupinou je amino skupina ($-\text{NH}_2$), která se vyskytuje v 3-aminopropyltriethoxysilanu.

Syntéza hybridních organosilanových nanočástic metodou sol-gel zahrnuje hydrolýzu a polykondenzaci organosilanů ve vodném prostředí za kyselé, nebo bazické katalýzy. Hydrolýza organosilanů $[(\text{XO})_3\text{Si}]_n - \text{R}$, kde X je většinou Me (methyl) nebo Et (ethyl) v bazických médiích vede ke vzniku reaktivních silanolátu typu $(\equiv \text{Si} - \text{O}^-)$, které dále kondenzují s dalšími organosilany za vzniku kovalentních vazeb $(\text{Si} - \text{O} - \text{Si})$.

U metod sol-gel nemusí být výchozí látkou pouze alkoxid, ale také stabilizované soli. Tímto způsobem lze připravovat mezoporézní částice, kterých docílíme přidáním tzv. povrchově aktivních látek, jako je cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB). (Brus a Kotlík 1998)

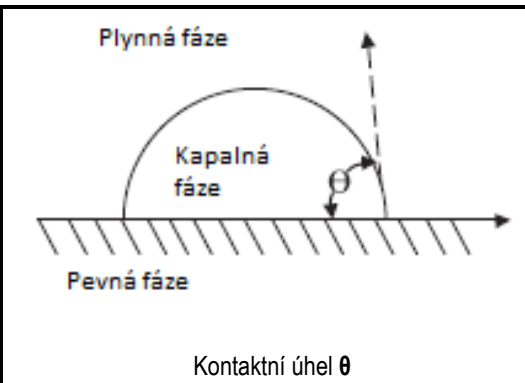
2.2.3. Vlastnosti a výhody hybridních organosilanových nanočástic

K jednoznačným výhodám organosilanových nanočástic zajisté patří velická rozmanitost možných prekurzorů a tudíž široké spektrum vlastností které můžeme získat. Velmi důležitou a sledovanou vlastností také pro drug-delivery systémy je smáčivost materiálů.

Ke zjištění smáčivosti daného materiálu neboli hydrofóbnosti / hydrofilnosti (jedná-li se o smáčivost vodou) povrchu nám dopomůže kontaktní úhel θ . Materiály s kontaktním úhlem θ vyšším než 90° spadají do kategorie nesmáčivých (hydrofóbních). Za superhydrofóbní povrchy považujeme ty, které mají kontaktní úhel θ vyšší než 150° , zde dochází tzv. lotosovému efektu.

Oproti nanočásticím oxidu křemičitého, které mají hydrofilní charakter, mají organosilany velmi rozdílné vlastnosti, což můžeme skvěle využít pro přípravu materiálu, který bude mít námi požadované vlastnosti. V tabulce 2 je uveden výběr několika typů organosilanů s odlišnou smáčivostí. (Arkles 2006)

Tabulka 2: Kontaktní úhly několika vybraných silanů (kapalinou je voda). (Arkles 2006)

	Název	θ
	heptadecafluorodecyltrimethoxysilan*	115 °
	octadecyldimethylchlorosilan*	110 °
	silylethyldimethylchlorosilan	104 °
	butyldimethylchlorosilan*	100 °
	methacryloxypropyltrimethoxysilan	70 °
	glycidoxypropyltrimethoxysilan*	49 °
	methoxy(polyethylenoxy)propyltrimethoxysilan*	15,5 °

*Kontaktní úhly silanů měřeny na hladkém povrchu.

(Pozn.: Originální popisky v obrázku, tabulce přeloženy z angličtiny do češtiny.)

Výsledná smáčivost však nemusí odpovídat skutečné smáčivosti námi připravených materiálů z organosilanů, neboť existuje několik faktorů, které ovlivňují úhel smáčení. Jedná se především o drsnost, nehomogenitu povrchu a absorpci látek.

Distribuce a velikost pórů stejně jako struktura a specifický povrch výsledných produktů mohou být velmi rozlišné a významně je ovlivňuje použitý katalyzátor, rozpouštědlo a pH směsi. Obecně se dá říci, že vyšší porozity lze dosáhnout vyšším pH, také ale s vyšším pH je výsledný specifický povrch nižší.

Tabulka 3: Ukázka vybraných nanočástic a jejich vlastností.

Publikace	Zdroj siliky	Aditivum	Tvar NPs	Velikost NPs [nm]	Velikost pórů [nm]	Specifický povrch BET [m ² /g]
(Shi et al. 2011)	BTEB	CTAB	koule	100-200	2,9	1017
(Shi et al. 2011)	BTEB	CTAB, Fe ₂ O ₃ NPs	duté koule	100-200	3,8	1219
(Croissant et al. 2014)	BTEENE BTEPDS	-	tyčinky	~130x70	2,3	923
(Croissant et al. 2014)	BTEENE	CTAB	tyčinky	700x200	3,1	1042
(Travaglini et al. 2019)	TEOS	CTAB, diimin	koule	~220	2,9	1243
(Maggini et al. 2016)	TEOS, BTEPDS	RITC	koule	~89	2,2	161,2

(Pozn.: “-“ znamená, že zdroj danou informaci neuvádí.)

Zkratky: 1,4-bis(triethoxysilyl)benzen (BTEB), 1,2-bis(triethoxysilyl)ethan (BTEE),

bis(triethoxysilyl)ethylen (BTEENE), bis[3-(triethoxysilyl)propyl]disulfid (BTEPDS),
cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), rhodamin B isothiokyanát (RITC)

Pokud se zaměříme na tenké vrstvy vytvořené z organosilanů, tak zde hrají významnou roli vlastnosti jako je adheze a mechanická odolnost. Opět i zde je široké spektrum možných vlastností, které získáme kombinací různých prekurzorů.

2.2.4. Degradabilita hybridních organosilanových nanočástic a její faktory

Co se týče degradace částic, pohlížíme na ni jako na žádoucí, kdy například u drug-delivery systémů požadujeme, aby se částice rozpadla a uvolnila tak léčivo, či jinou biomolekulu, které byly do ní ukotveny a zbytky rozpadlých nanočástic mohly být bezpečně vyloučeny z organismu. Abychom tedy docílili degradace nanočástic je potřeba navrhnout částice tak, aby obsahovaly organické můstky, které reagují na určité podněty. (Ehlerding et al. 2015)

Jednou z možností štěpení organických můstku je redoxní štěpení. Vědomí toho, že koncentrace bio-redukčních činidel je mnohem vyšší uvnitř buněk nežli vně a také to, že glutathion (GSH) je mnohem koncentrovanější v rakovinných buňkách vedlo k závěru, že lze redoxního štěpení dobře využít pro medicínské (terapeutické) aplikace. Organické můstky, které se využívají k tomuto redoxnímu štěpení, jsou obvyklé disulfidické (-S-S-). Použít lze také prekurzory obsahující tetrasulfidy např. bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfid.

Dalším druhem štěpení organických můstků je enzymatické štěpení, u kterého se zavádí do nanočástic organické můstky a napodobuje se biologické štěpení aminokyselin v metabolických procesech. Nejčastějším příkladem enzymaticky štěpícího se můstku je oxamid a jeho štěpení je závislé na koncentraci enzymu (např. trypsinu). (Croissant et al. 2017)



Obrázek 4: Grafické znázornění štěpení křemičitých nanočástic. (Croissant et al. 2017)

(Pozn.: Originální popisky v obrázku přeloženy z angličtiny do češtiny.)

Nicméně i nekovalentně vázané organické látky mohou ovlivnit dobu degradace. (Chu et al. 2014) Dokonce již roku 1949 bylo dokázáno štěpení některých organosilanů bezvodým chlorovodíkem. (Gilman a Marshall 1949)

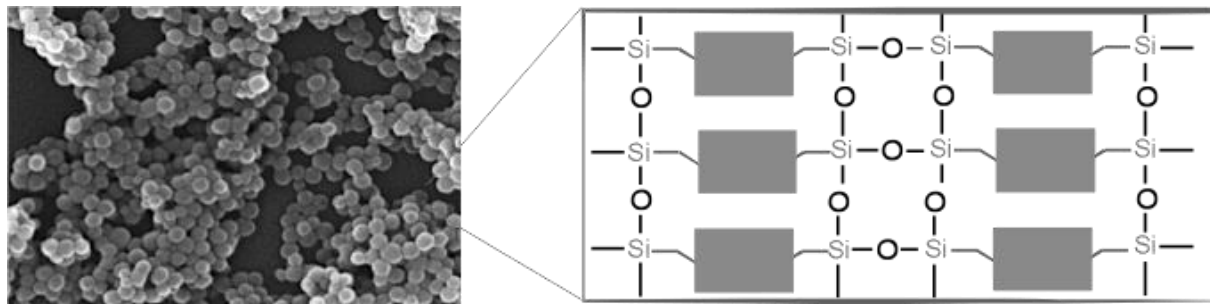
2.3. HYBRIDNÍ ORGANOSILANOVÉ NANOČÁSTICE A JEJICH POTENCIÁL V MEDICÍNĚ

K. Tsuru a další (2007) představili mnoho prekursorů, které se využívají pro přípravu hybridních materiálů pro medicínské aplikace a krom jiných zmínili velké množství organosilanů, o kterých lze předpokládat, že jsou vhodnými prekurzory pro biomedicínské aplikace.

Pro dobrou afinitu k živým buňkám a proteinům je vhodné, aby molekuly obsahovaly funkční skupiny jako jsou: amid (-HN-CO-), amino- (-NH₂), thiol (-SH), hydroxy- (-OH), karboxylové (-COOH) a sulfidové (-S-S-) skupiny. Přichycené buňky a proteiny výrazně zlepšují kompatibilitu daného substrátu. Křemičité prekurzory jsou v tomto oboru vítány zejména protože alkoksysilanové skupiny jsou náchylné k hydrolýze a tudíž poskytují silanolové skupiny, které jsou důležité pro propojení substrátu a tkání.

2.3.1. Reálné biomedicínské aplikace

Firma Si-Breax (Švýcarsko) company vyrábí několik druhů mezoporézních křemičitých nanočástic. Jejich částice jsou prezentovány jako univerzální degradovatelné nosiče pro cílené dodávání látek, u kterých lze vyladit tvar i velikost. Cíleného dodání látek je dosaženo funkcionalizací povrchu částic, které jsou navíc ve vodných roztocích stabilní a netvoří agregáty. Jedním z typu Si-Breax nanočástic jsou hard-shell nanočástice (obr. 5) na bázi silikátů se spouštěčem degradace částice, čímž dojde k uvolnění dopravované látky.



Obrázek 5: Nanočástice na bázi silikátů se zabudovaným iniciátorem pro uvolnění. (Si-Breax nedatováno)

Dalším typem nanočástic produkovaných firmou Si-Breax jsou mezoporézní křemičité nanočástice se zabudovanými iniciátory. Po jejich aktivaci se začne z pórů uvolňovat přepravovaná látka.

2.3.2. Biokompatibilita vs. potenciální toxicita hybridních nanočástic

Za biokompatibilní materiál je považován takový materiál, který v organismu nevyvolává žádnou negativní odezvu.

Přestože je oxid křemičitý považován za málo toxický v nano podobě je potřeba ho považovat za novou látku a zkoumat jeho biokompatibilitu. Tu by mohly jak pozitivně tak negativně ovlivnit přidané organické složky ať už v podobě začleněných heteroatomů nebo funkcionalizace povrchu. (Tang et al. 2012) Při kontaktu buněk s nanočásticemi, může docházet k mechanickému nebo chemickému poškození buněk. Při kontaktu nanočástic s biologicky aktivní látkou může dojít ke změně její konformace a tudíž i ke změně funkčnosti.

Tabulka 4: Porovnání účinků různých typů Si NPs testovaných *in vitro*. (Murugadoss et al. 2017)

Typ Si NPs	Typ buněk	Cytotoxicita	Apoptóza	Genotoxicita	Oxidační stres	Prozánětlivost
Koloidní	Caco2	✓	✓	✓	✓	✓
Koloidní	PBMC	✓	✓	-	✓	✓
Stöber	HepG2	✓	✓	-	✓	-
Stöber	HaCaT	✓	✓	-	✓	-
vysrážené	V79	✓	✓	✗	✗	-
vysrážené	M-HS	✓	-	-	✗	✓
pyrogenní	V79	✓	✓	✓	✗	-
pyrogenní	M-HS	✓	-	-	✓	✓

(Pozn.: “-“ znamená, že zdroj danou informaci neuvádí.)

2.3.2.1. VSTUP NANOČÁSTIC DO ORGANISMU

Existuje hned několik možností, jak se mohou nanočástice dostat do organismu. Přičemž i rozdílná cesta vstupu nanočástic do organismu vede k rozdílným toxickým účinkům. Jednou z možných cest a zároveň nejvýznamnější cestou je vdechnutí nanočástic. Zde velmi záleží na velikosti vdechnutých částic. Částice nad 500 nm v plicích sedimentují. U částic menších než 500 nm dochází k difúzi. Navíc u vdechnutí nanočástic hrozí jejich průchod skrze sliznici nosní do mozku. (Jian et al. 2012)

V současnosti je běžné využití nanočástic v kosmetice, proto je vhodné zmínit i dermální cestu vstupu. Absorpce touto cestou je sice oproti ostatním cestám zanedbatelná, neboť kůže je velmi funkční bariéra, navíc pokryta vrstvou tuku. Absorpci nanočástic přes kůži je tedy možné zvýšit/snížit vhodným rozpouštědlem.

Naposlední cestou jak mohou nanočástice vstupovat do organismu je přes gastrointestinální trakt jinými slovy orálně. Násilnější formou vstupu nanočástic do organismu je intravenózní (nitrožilní) podání.

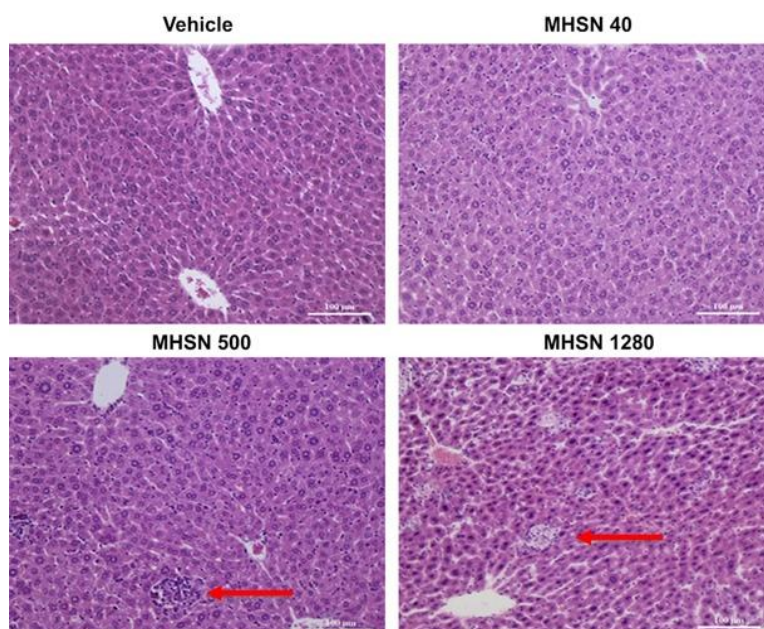
2.3.2.2. AKUMULACE

Jak budou nanočástice dále postupovat v organismu je velmi ovlivněno jejich velikostí i chemickou strukturou. Malé částice snadno pronikají do tkání. Mále částice oproti velkým mohou snadno pronikat do tkání a jejich působení se tedy může projevit mnohem dále od místa vstupu. Chemická struktura částic je neméně důležitý faktor, neboť se na povrch nanočástic

v organismu vážou nejrozličnější bílkoviny a proteiny. Tato skutečnost ovlivňuje nejen fyzikální a chemické vlastnosti ale i reaktivitu a průchodnost membránami v organismu.

2.3.2.3. VYLOUČENÍ

Hlavní a nejčastější cestou jak se nanočástice z organismu vylučují je prostřednictvím moči. Proces nazývaný glomerulární filtrace probíhá v ledvinách a dochází zde k ultrafiltraci krevní plazmy, tím se nanočástice o velikosti jednotek nanometrů dostanou z krve do moči a následně pryč z organismu. Nanočástice, které zůstaly v plicních sklípcích, jsou fagocytovány makrofágy, dendritickými buňkami nebo epiteliálními buňkami. (Jian et al. 2012) U větších částic dochází k uskladnění agregátů v buňkách retikuloendoteliálních tkání (slezina, játra, lymfatické uzliny atd.). (Boyes et al. 2012)



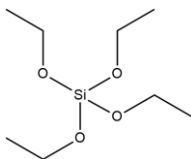
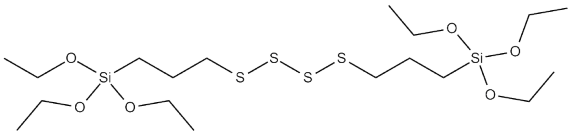
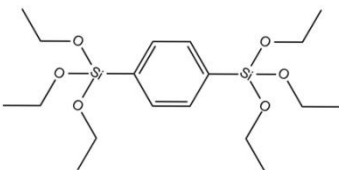
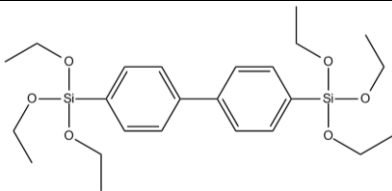
Obrázek 6: Obarvená myší játra po působení mezoporezních nanočástic oxidu křemičitého. Dávky NPs se pohybovaly od 0 do 1280 mg/kg jaterní tkáně. Červené šipky ukazují přítomnost degenerativní nekrózy

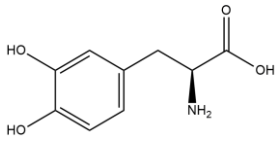
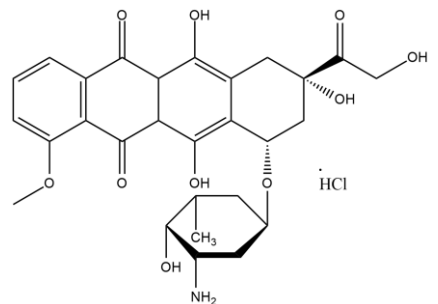
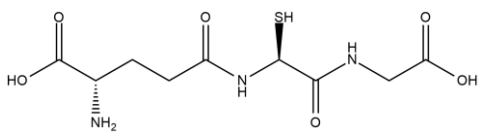
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. POUŽITÉ MATERIÁLY

Použité chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od běžných komerčních dodavatelů Acros Organics B.V.B.A. (98% tetraethylorthosilikát), Lachema a.s. (chlorid draselný), Lach-Ner, s.r.o. (hydroxid sodný, 96% ethanol, aceton), Penta, s.r.o. (bezvodý síran sodný, hydrogenuhličitan sodný, 25-29 % vodný roztok amoniaku, ethanol absolutní, 99,8 %), Sigma-Aldrich, s.r.o. (99 % n-hexanol, bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfid, 1,4-bis(triethoxysilyl)benzen, 4,4'-bis(triethoxysilyl)-1,1'-bifenyl, hexadecyltrimethylamonium bromide, L-glutathione reduced) a Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (3(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine). Kyselina fluorovodíková (HF), hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4), hexahydrát chloridu hořečnatého ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) byly dodány z KCH TUL a tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) byl poskytnut Ing. Věrou Jenčovou, Ph. D.

Tabulka 5: Chemické struktury důležitých chemikálií (prekurzorů, dopovaných léčiv a glutationu).

Tetraethylorthosilikát (TEOS)	
Bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfid (BTEPTS)	
1,4-bis(triethoxysilyl)benzen (BTEB)	
4,4'-bis(triethoxysilyl)-1,1'-bifenyl	

3(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine (L-dopa)	
Doxorubicin hydrochlorid (DOX)	
L-glutathione reduced (GSH)	

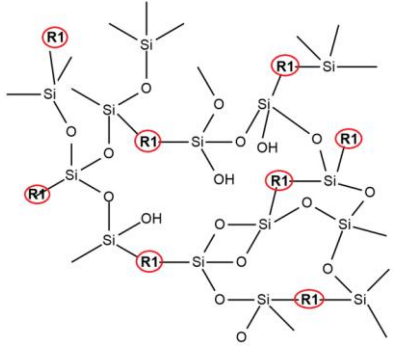
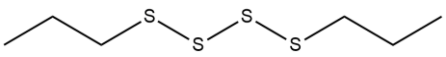
(Pozn.: Všechny chemické struktury byly vytvořeny v programu ChemDraw Ultra.)

3.2. SYNTÉZY NANOČÁSTIC

3.2.1. Nanočástice typ A

V baňce bylo smícháno 1,7 ml Tritonu X-100 s 7,5 ml cyklohexanu a 1,8 ml 1-hexanolu. Mezitím byly ve 20ml baňce smíchány 4 ml ($1,7 \cdot 10^{-1}$ mmol) tetraethylorthosilikátu se 6 ml ($1,1 \cdot 10^{-1}$ mmol) bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfidu. Oba roztoky byly míchány 600 rpm/ 30 min/ r.t. a následně byly oba roztoky slity dohromady. K roztoku bylo přidáno 50 μ l 30% roztoku amoniaku a byl míchán 600 rpm/ 20 h/ r.t. Další den bylo přidáno 20 ml acetonu a následně byl roztok stočen při 25 000 rpm/ 15 min/ r.t. Výsledný produkt byl promyt 2x v EtOH a 3x v H₂O (po promytí byl vzorek v roztoku vložen na 5 min do sonikační lázně a následně stočen 25 000 rpm/ 15 min/ r.t.). Sušení částic probíhalo v lyofilizátoru při teplotě -53 °C a tlaku 100 mbar/ 24 h.

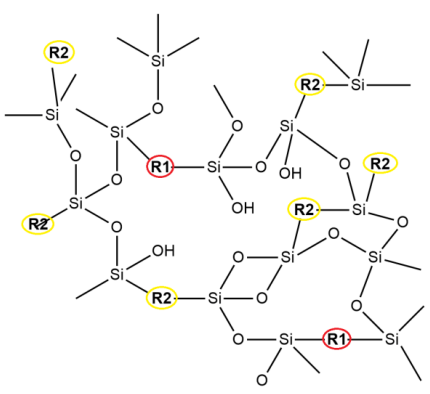
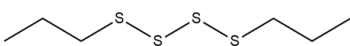
Tabulka 6: Předpokládaná struktura a použitý organokřemičitý prekursor na nanočástice typu A.

	Typ A
	bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfid
	R1 = thioether
	

3.2.2. Nanočástice typ B

250 mg ($6,8 \cdot 10^{-1}$ mmol) hexadecyltrimethylamonium bromidu bylo přidáno do 120 ml DEMI H₂O s 87,5 µl 2M NaOH. Tento roztok byl míchán 700 rpm/ 50 min/ 80 °C. Následně k němu byl přidán roztok 62 µl ($1,1 \cdot 10^{-7}$ mmol) bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfidu s 400 µl ($9,6 \cdot 10^{-7}$ mmol) 1,4-bis(triethoxysilyl)benzenu a byl ponechán ke kondenzaci 700 rpm/ 2 hod/ 80 °C. Po ochlazení roztoku byl vzorek stočen na centrifuze 21 000 rpm/ 15 min/ r.t. K produktu byl přilít alkoholový roztok NH₄NO₃ a ponechán na 30 min/ 45 °C v sonikační lázni. Tento krok byl ještě jednou zopakován a výsledný produkt byl promyt 3x v EtOH, 1x v H₂O, 1x v EtOH. Sušení částic probíhalo v lyofilizátoru při teplotě -53 °C a tlaku 100 mbar/ 24h.

Tabulka 7: Předpokládaná struktura a použité organokřemičité prekurzory na nanočástice typu B.

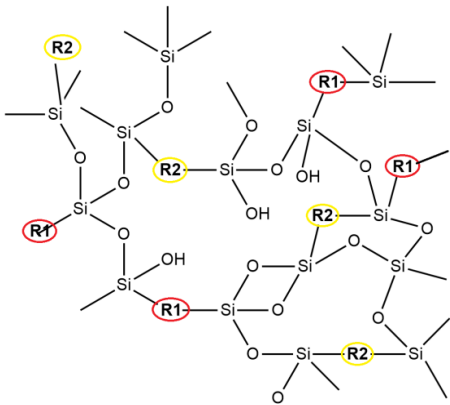
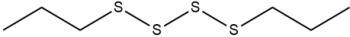
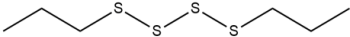
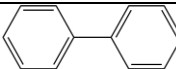
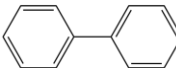
	
Typ B	
bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfid	1,4-bis(triethoxysilyl)benzen
R1 = thioether	R2 = aromatické jádro
	

3.2.3. Nanočástice typ C

Do roztoku, který se skládal ze 74 ml EtOH, 10 ml H₂O a 3,14 ml vodného roztoku NH₃ bylo v jedné dávce přidáno 6 ml (2,6·10⁻¹ mmol) TEOS, následně byl roztok míchán 650 rpm/ 1 hod/ 30 °C*. Mezitím bylo 30 ml C₁₆TAB rozpuštěného ve H₂O a EtOH v poměru V_{H₂O}:V_{EtOH} = 2:1 přidáno ke 100 ml H₂O a k tomuto roztoku byl po kapkách přidán roztok s TEOS. Výsledný roztok byl míchán 650 rpm/ 30 min/ 30 °C a následně byly přidány 3 ml NH₃. K tomuto roztoku byl přidán 1 ml směsi organokřemičitých prekurzorů viz tabulka 8 a tento roztok byl míchán 650 rpm/ přes noc/ r.t. Další den byly částice stočeny na centrifuze 10 000 rpm/ 30 min/ r.t. Částice, ke kterým byla přidána H₂O byly vloženy na 5 min do sonikační lázně. Po přidání 1,3 ml HF byl roztok 1 hod míchán při 60 °C. Poté byly částice stočeny (10 000 rpm/ 30 min) a promyty třikrát v H₂O. Následovala 12 hod extrakce při 80 °C v roztoku EtOH a HCl. Extrakce se zopakovala ještě 2x. Takto připravené částice byly promyty v EtOH, H₂O, EtOH, H₂O, H₂O. Sušení částic probíhalo v lyofilizátoru při teplotě -53 °C a tlaku 100 mbar/ 24h.

* U nanočástic typu C1 došlo u tohoto kroku k zahřátí při 650 rpm/ 2 hod/ 65 °C.

Tabulka 8: Předpokládaná struktura a použité organokřemičité prekursorzy na nanočástice typu C1- C4.

	
Typ C1 a C2	
bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfid	1,4-bis(triethoxysilyl)benzen
R1 = thioether	R2 = benzen
	
Typ C3	
bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfid	4,4'-bis(triethoxysilyl)-1,1'-bifenyl
R1 = thioether	R2 = bifenyl
	
Typ C4	
1,4-bis(triethoxysilyl)benzen	4,4'-bis(triethoxysilyl)-1,1'-bifenyl
R1 = benzen	R2 = bifenyl
	

3.3. TESTOVÁNÍ VLASTNOSTÍ A CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH NANOČÁSTIC

Skenovací elektronová mikroskopie

Pro zobrazování a energiově disperzní analýzu (EDX) byl použit rastrovací elektronový mikroskop Carl Zeiss ULTRA plus (CXI, TUL). Analýza byla provedena Ing. Pavlem Kejzlarem, PhD

Transmisní elektronová mikroskopie

Pro zobrazení byl použit přístroj EFTEM Jeol 2200 FS v Centrálních laboratořích VŠCHT Praha. Vzorky byly nanесeny z roztoku EtOH na měděnou síťku, následně usušeny a tím připraveny k analýze.

Dusíková adsorpce

Měření porozity a měrného povrchu byla provedena pomocí dusíkové adsorpce. Měření probíhalo na přístroji Autosorb iQ MP (Quantachome) za pomoci softwaru ASiQwin. Pro všechny vzorky byl pro měření absorbce použit dusík a odplyňování probíhalo 24 hod při 100 °C. Měření provedla Mgr. Jana Karpíšková, PhD.

Termogravimetrická analýza

Testování probíhalo na termogravimetrickém analyzátoru Q500 (TA Instruments, USA) v EGA píce. Analýza materiálu probíhala v prostředí syntetického vzduchu na 100 μ l platinové pánvi. Teplotní rozsah testování byl od pokojové teploty (r.t.) po 650 °C s růstem teploty 10 °C/ min. Zároveň bylo použito i TGA s infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) Nicolet iS10 (Thermo Fisher, USA) s MCTA detektorem, 20 cm dlouhou optickou dráhou plynové kyvety, vyhřívané na 240 °C

Ramanova spektroskopie

Pro měření byl použit přístroj DXR Raman microscopy (Thermo Fisher, USA) za použití laseru o vlnové délce $\lambda=532$ nm. Byla provedena korekce na baselinu, vyhlazení a normalizace.

Degradabilita S-S můstků

Pro testování štěpení -S-S- vazeb byly připraveny roztoky glutathionu (GSH) v simulované tělní tekutině o molární koncentraci 10 mol/ m³ a GSH v H₂O o koncentraci 100 mol/ m³. 2 ml roztoku GSH s 1 mg NPs byly míchány po dobu 1 hod, 2 hod, 24 hod, 48 hod, 1 týden a 2 týdny. Částice byly stočeny na centrifuze 25 000 rpm/ 10 min a následně byly promyty 3x v H₂O. Pro vyhodnocení výsledků byly částice pozorovány skenovací elektronovou mikroskopií (SEM).

Příprava roztoku simulované tělní tekutiny (SBF) probíhala podle normy ISO 23317:2014. Nejprve bylo potřeba K_2HPO_4 , $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ a $CaCl_2$ vysušit a to 1 hod při 120 °C. Do 200ml kádinky bylo nalito 70 ml demineralizované vody a následně přidáno 0,8 g NaCl, 35 mg $NaHCO_3$, 22 mg KCl, 17 mg K_2HPO_4 a 31 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. Následně bylo přidáno takové množství 1M HCl, aby výsledné pH bylo 7,4. Dále bylo do roztoku přidáno 29 mg $CaCl_2$, 7g Na_2SO_4 , 0,61g TRIS a další 1M HCl pro úpravu pH na 7,4. Během celého procesu byl roztok míchán magnetickým míchadlem a ohříván ve vodní lázni na teplotu 36 °C.

Implementace léčiv do nanočástic

Mezoporézní struktury jsou vhodné pro transport léčiv. Do mnou připravených hybridních nanočástic byly loudovány dva druhy léčiv. Do hybridních nanočástic jsem se pokusila implementovat dvě léčiva: L-dopu a doxorubicin.

100ml Erlenmeyerovy baňka potažené alobalem obsahující 50 ml DEMI H₂O a 50 mg L-dopy byla vložena na 1 hod při r.t. do sonikační lázně. K 1 ml takto připraveného výchozího roztoku bylo přidáno 10 mg NPs. Nanočástice v roztoku byly na 1 hod, 24 hod a 48 hod ponechány jak volně stojící v lednici tak i vloženy na třepačku při r.t.

10 mg DOX bylo rozpuštěno ve 100 ml DEMI H₂O. K 5ml tohoto roztok byl přidán 1 mg NPs. Takto připravený vzorek byl vložen do sonikační lázně na 10 min/ r.t. a následně na třepačku s frekvencí třepání 175/ min/ 24 hod/ r.t. Po 24 hod byly částice stočeny na centrifuze 10 000 rpm/ 10 min a k měření na UV-Vis spektroskopii byl použit výsledný supernatant.

UV-Vis spektroskopie

Implementace léčiv byla měřena pomocí UV-Vis spektroskopie ze zbytkového množství léčiv v roztocích. Měření probíhalo na spektroskopu DR 6000 typu LPG 441 při vlnových délkách pro L-dopu $\lambda = 282$ nm a doxorubicin $\lambda = 480$ nm.

Testování cytotoxicity nanočástic

Testování cytotoxicity připravených nanočástic probíhalo *in vitro* a bylo prováděno metabolickým testem MTT na 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Testovány byly nanočástice o koncentraci 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na modelové buněčné linii myších fibroblastů 3T3-SA o koncentraci 10^4 . Před samotným testováním byly nanočástice tepelně vysterilizované (24 hod/ 150 °C).

Nejprve byly do mikrotitračních destiček buňky nasazeny a následně ponechány k adhezi po dobu 24 hod. Další den bylo do každé jamky přidáno 100 μl nanočástic o různé koncentraci, celkem tedy 12 jamek na každou koncentraci. Jako pozitivní kontrola (PC) byl použit 0,5 % triton v DMEM a jako negativní kontrola (NC) čisté DMEM.

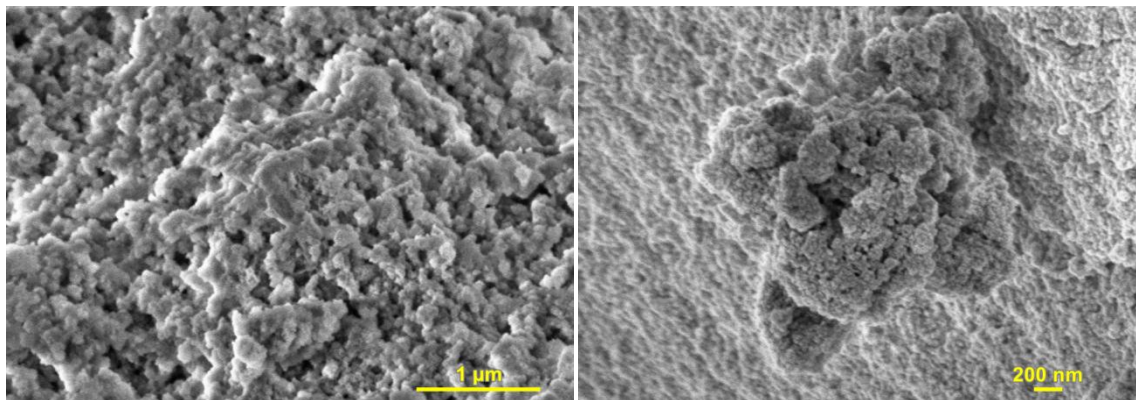
Následující den bylo MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) rozpuštěno v kultivačním mediu o koncentraci 1 mg/ml a byl proveden test MTT s inkubační dobou 2 hod. Spektroskopické vyhodnocení bylo provedeno při vlnových délkách 570 a 650 nm.

Testy byly provedeny Ing. Šárkou Hauzerovou pod vedením Ing. Miroslavy Rysové.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

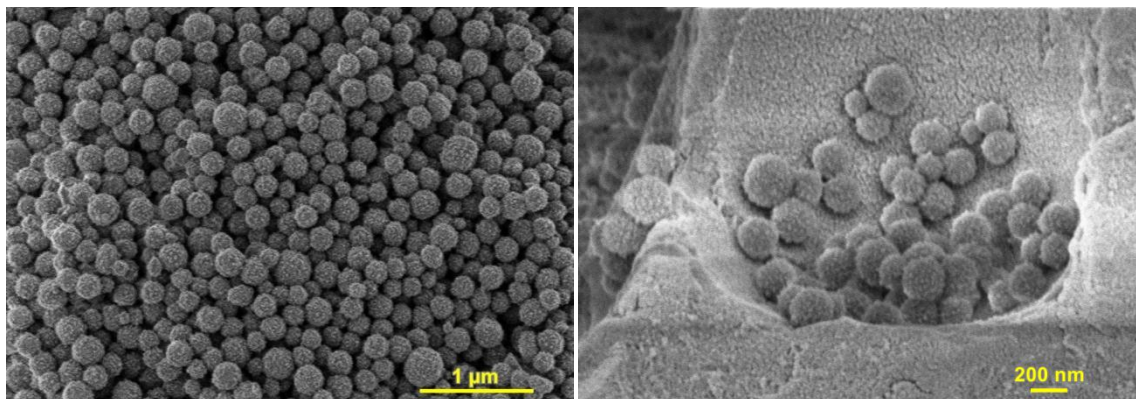
4.1. TVAR A VELIKOST NANOČÁSTIC PODLE SKENOVACÍHO ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU

U částic typu A (obr. 7) se jedná spíše o shluk amorfních částic a nepravidelných útvarů.



Obrázek 7: Snímky nanočástic typu A pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem.

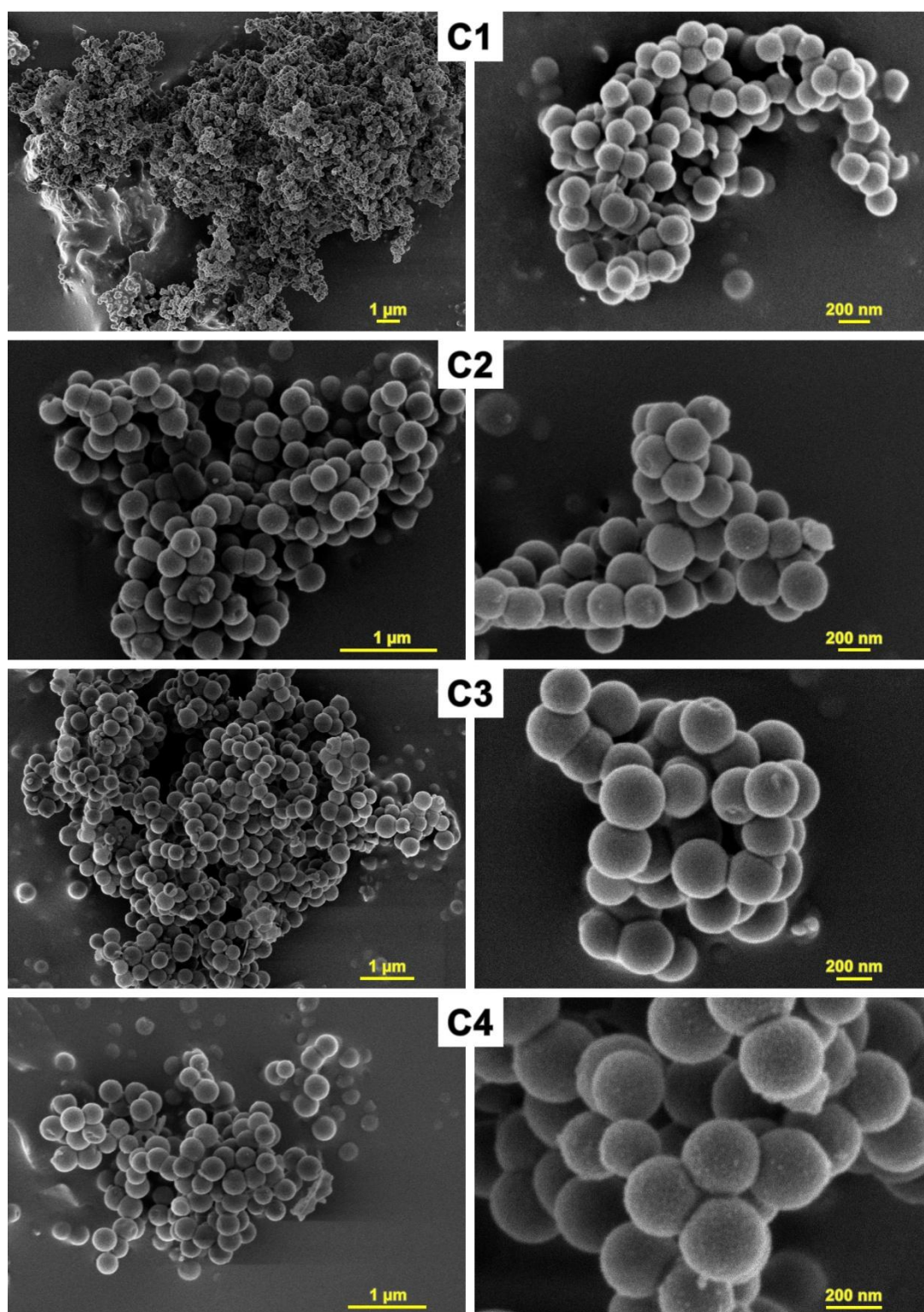
Nanočástice typu B (obr. 8) jsou kulovitého tvaru a mají velikost okolo 200 nm. Nejmenší nanočástice mají velikost cca 100 nm. Největší částice dosahují 650 nm, takto velkých částic je však minimální množství. Na snímcích je viditelné, že povrch těchto částic je drsný.



Obrázek 8: Snímky nanočástic typu B pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem.

Všechny nanočástice typu C mají pravidelný kulovitý tvar, liší se však svoji velikostí. Nejmenší z připravených nanočástic typu C jsou částice typu C1 (obr. 9, C1). Částice typu C1 mají velikost okolo 200 nm, tudíž jsou velikostně podobné částicím typu B, avšak nevyskytuje se zde taková velikostní disperzita. Další v pořadí velikosti jsou částice typu C2 (obr. 9, C2) a C4 (obr. 9, C4), které mají velikost od 200 nm do 300 nm. Částice typu C3 (obr.

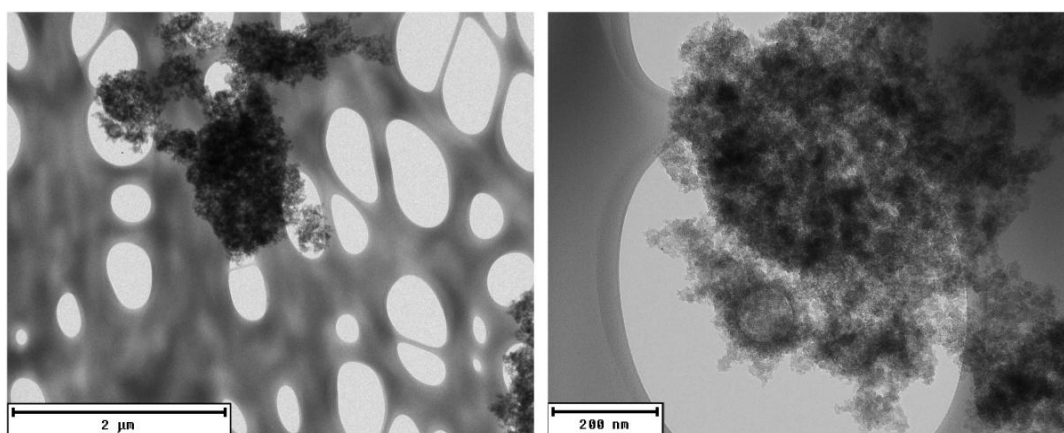
9, C3) jsou ze všech připravených částic největší a dosahují rozměrů 250 nm až 350 nm. Při důkladném prozkoumání částic typu C, můžeme některé z částic prohlásit za tzv. single-holed NPs o jejichž syntézu se už pokoušeli jiní. (Guan et al. 2017; Xu et al. 2015; Li et al. 2015)



Obrázek 9: Snímky nanočástic typu C pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem.

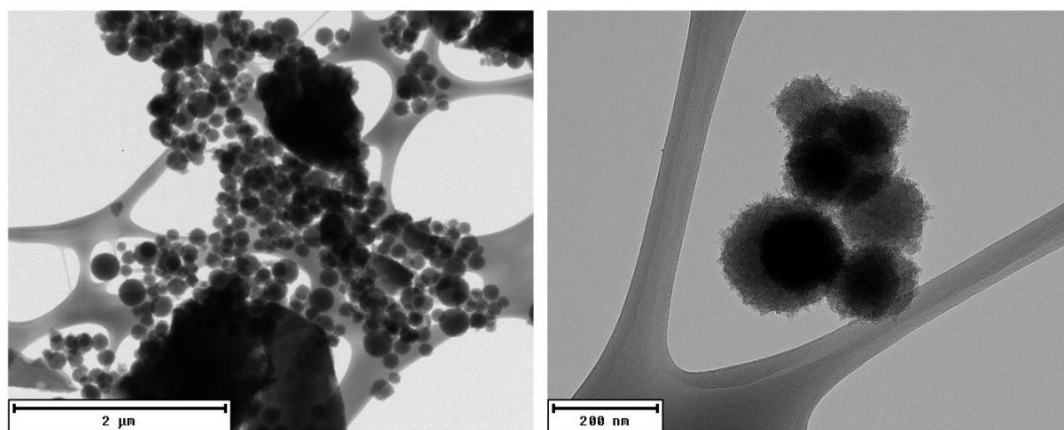
4.2. STRUKTURA ČÁSTIC ZÍSKANÁ POMOCÍ TRANSMISNÍHO ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU

Pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM) jsem mohla vyloučit možnost, že se u připravených částic typu A (obr. 10) jedná o pravidelné nanočástice velmi malých rozměrů a potvrdit výsledek ze SEM, že částice typu A jsou pouze amorfní shluky.



Obrázek 10: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu částic typu A.

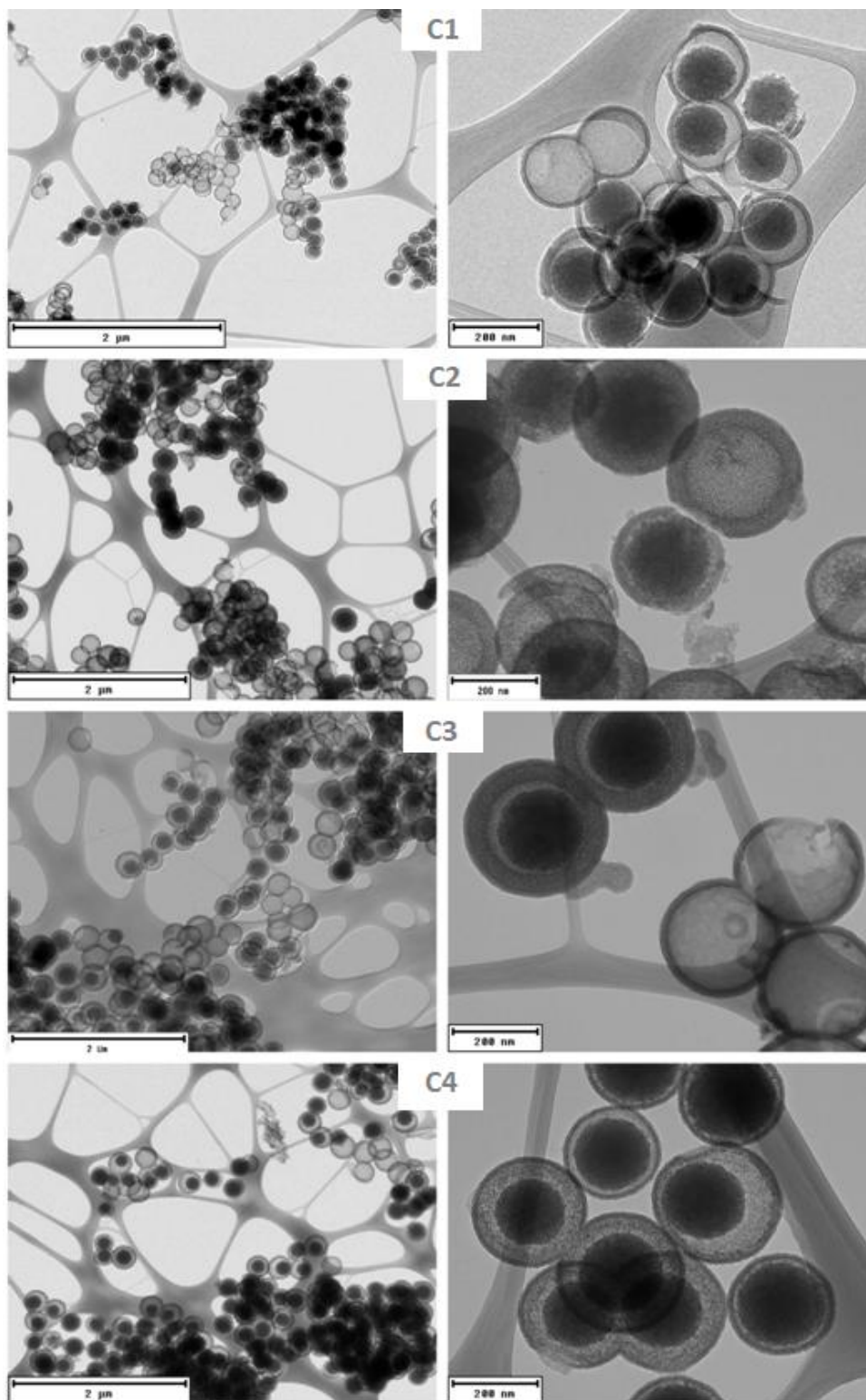
Drsný povrch nanočástic typu B je dobře pozorovatelný i na TEM a neboť na snímcích není viditelný obal, jádro či jiná zvláštnost jejich struktury a k rozdílnému kontrastu dochází pouze překrytím částic, lze je označit jako pevné (solid-state) NPs.



Obrázek 11: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu částic typu B.

Pomocí transmisního elektronového mikroskopu se podařilo odhalit, že se u všech částic typu C tj. typ C1, C2, C3 i C4 objevují nejen duté (hollow) částice, ale i tzv. yolk-shell nanočástice někdy také označované nanorattle. (Lin et al. 2018; Priebe a Fromm 2015)

U částic typu C2 se navíc objevuje větší počet částic, které nemají uvnitř pravidelný kulovitý útvar, ale pouze nepravidelný shluk. Dalším zvláštním jevem, který lze vidět u částic typu C pomocí TEM, je rozdílná tloušťka stěn nanočástic.



Obrázek 12: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu částic typu C1, C2, C3, C4.

4.3. POROZITA A SPECIFICKÝ MĚRNÝ POVRCH ČÁSTIC ZÍSKANÝ DUSÍKOVOU ADSORPCÍ

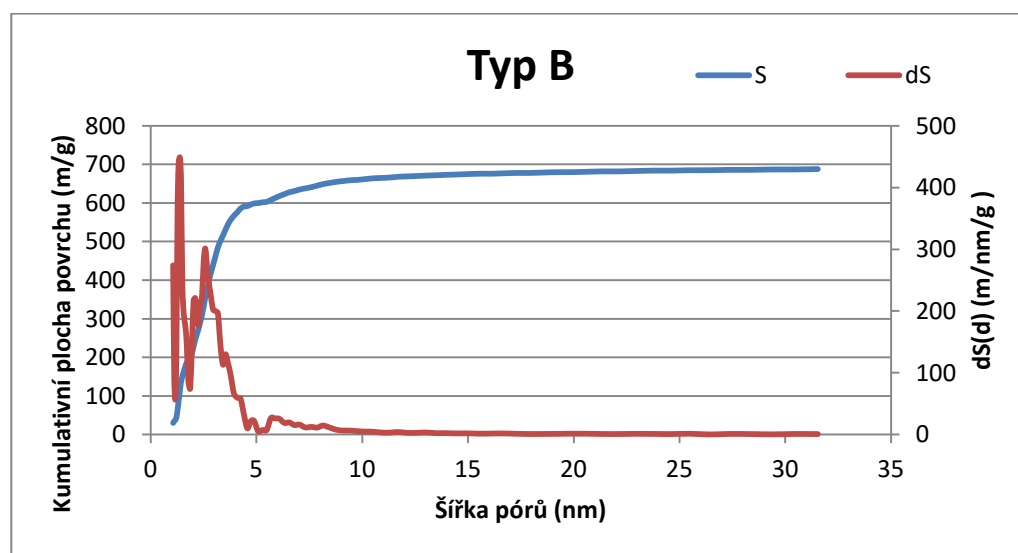
Pro začátek je vhodné říci něco k terminologii. Podle IUPAC klasifikace lze póry rozdělit podle jejich šíře na tři druhy: - mikropóry, které mají šířku do 2 nm,

- mezopóry, které mají šířku mezi 2 a 50 nm,

- makropóry, s šířkou větší než 50 nm. (Mays 2007)

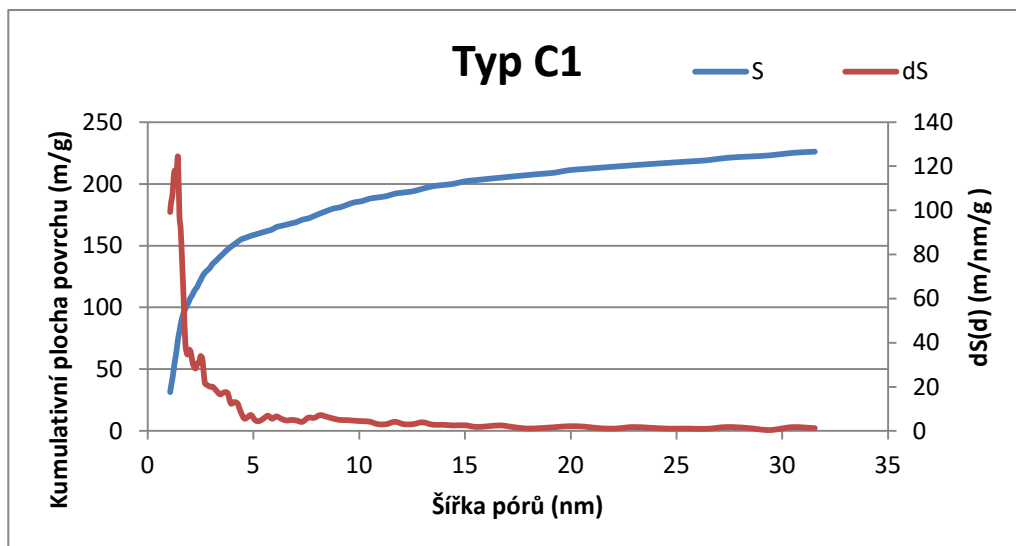
Vzhledem k výsledkům ze SEM a TEM, kdy se ukázalo, že částice typu A jsou spíše amorfni shluky, než pravidelné částice, byly částice vyhodnoceny jako nevhodné pro medicínské účely a z časové náročnosti testování porozity a specifického měrného povrchu, nebyla tato charakterizace dusíkovou adsorpcí u tohoto typu částic provedena. U všech testovaných částic je specifický měrný povrch zaokrouhlen k nejbližšímu násobku 5 a naměřené absorpční izotermy všech testovaných vzorků lze nalézt v příloze (příloha 1 až 5).

Částice typu B (graf 1) mají specifický měrný povrch $815 \text{ m}^2/\text{g}$, což bylo mnohem více než u všech částic typu C. Již ze SEM bylo patrné, že částice typu B mají členitý povrch a TEM ukázalo, že nejsou duté, což poskytuje více místa na póry. Částice typu B obsahují mikro- i mezopóry. Největší množství póru, má šířku okolo 1,4 nm, další výrazné píky jsou okolo šířky 2,1 nm a 2,6 nm



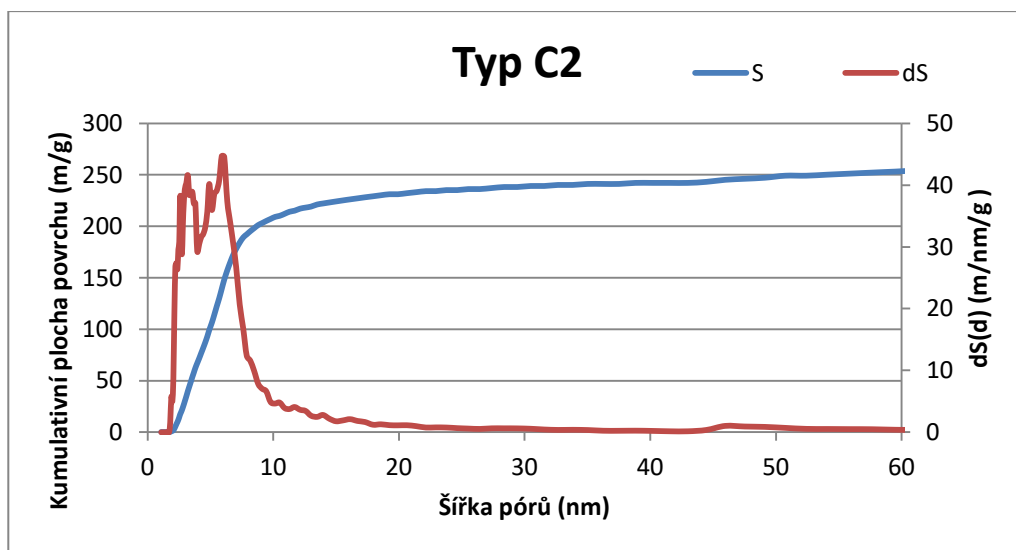
Graf 1: Distribuce šířek pórů nanočástic typu B.

Nanočástice typu C1 (graf 2) mají nejmenší specifický měrný povrch ze všech testovaných částic, a to $225 \text{ m}^2/\text{g}$ a mikropóry o šířce okolo 1,4 nm.



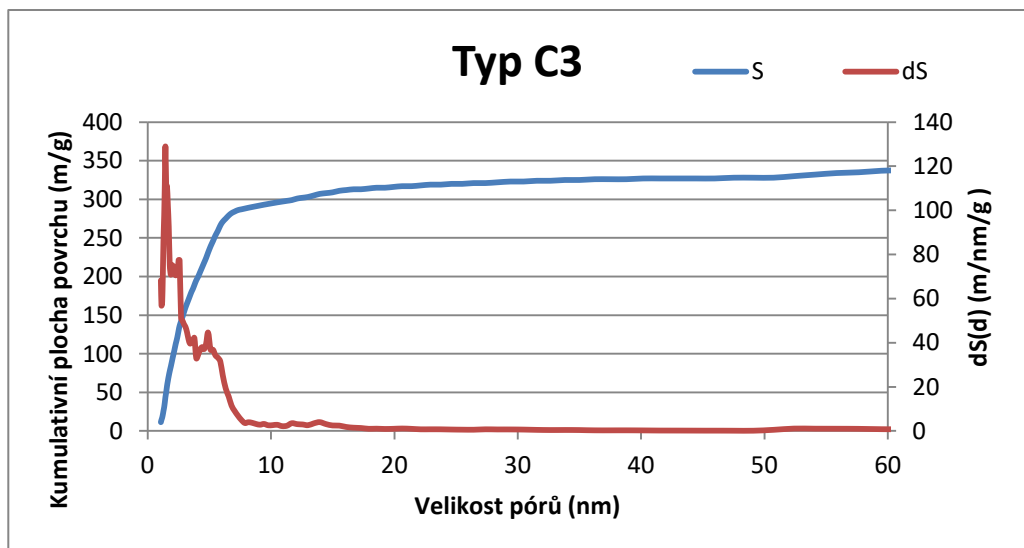
Graf 2: Distribuce šířek pórů nanočástic typu C1.

U nanočástic typu C2 (graf 3) byl naměřen specifický měrný povrch $325 \text{ m}^2/\text{g}$. Oproti nanočásticím typu C1, lze zde pozorovat širší distribuci velikosti pórů, avšak nebyly zde zjištěny žádné mikropóry. Nanočástice typu C2 tedy obsahují pouze mezopóry a nejvyšší píky byly dosaženy při šířce póru 2,6 nm, 3,2 nm, 4,9 nm a 6 nm.



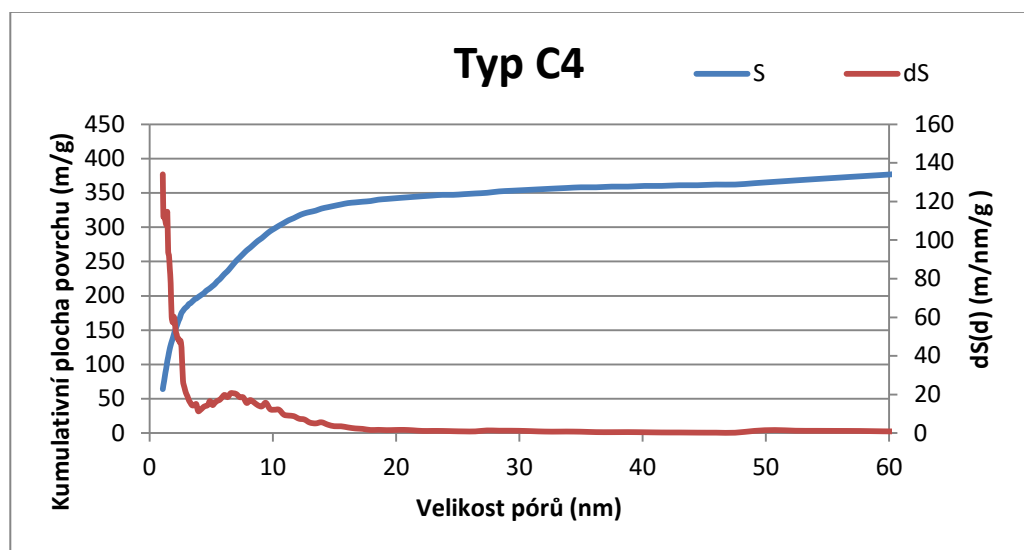
Graf 3: Distribuce šířek pórů nanočástic typu C2.

Z připravených nanočástic typu C mají typ C3 největší specifický měrný povrch, který je $400 \text{ m}^2/\text{g}$. Nanočástice typu C3 obsahují velké množství mikropórů o šířce okolo 1,4 nm, ale jsou zde vidět i slabší píky v oblasti mezopórů, konkrétně 2,6 nm a 4,9 nm. Hodnota 4,9 nm nemusí představovat póry, ale spíše mezičásticový prostor.



Graf 4: Distribuce šířek pórů nanočástic typu C3

Poslední z měřených částic typ C4 (graf 5) má specifický měrný povrch $390 \text{ m}^2/\text{g}$, což je jen lehce nižší než u předchozího typu C3. U tohoto typu částic byla zjištěna přítomnost mikropórů o šířce 1 nm, 1,4 nm a 1,9 nm.

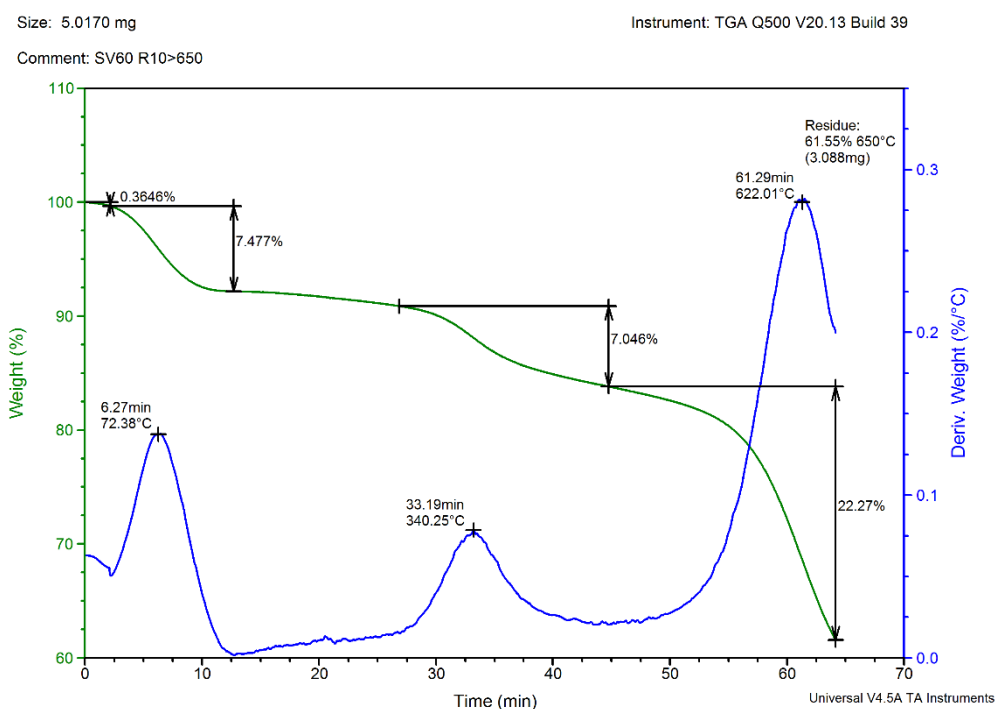


Graf 5: Distribuce šířek pórů nanočástic typu C4.

4.4. TERMOGRAVIMETRICKÁ ANALÝZA

Termogravimetrická analýza byla použita především ke zjištění tepelné stability jednotlivých částic, což bylo využito pro tepelnou stabilizaci a tepelnou sterilizaci částic. Pro ukázkou výsledné gravimetrické křivky byly vybrány nanočástice typu B. Gravimetrické křivky zbylých vzorků lze nalézt v příloze (příloha 6 až 10).

U nanočástic typu B (obr. 13) nastává první hmotnostní úbytek téměř hned po zahřátí, kdy dochází k odstranění zbytkové vlhkosti. Následuje oblast termické stability a při zahřátí vzorku zhruba na 300 °C následuje druhý hmotnostní úbytek. Zde nejspíš dochází k rozpadu organických částí, což u částic nechceme. Proto byla stanovena teplota stabilizace částic na maximální hodnotu 250 °C. U všech nanočástic typu C byla tato teplota 220 °C.



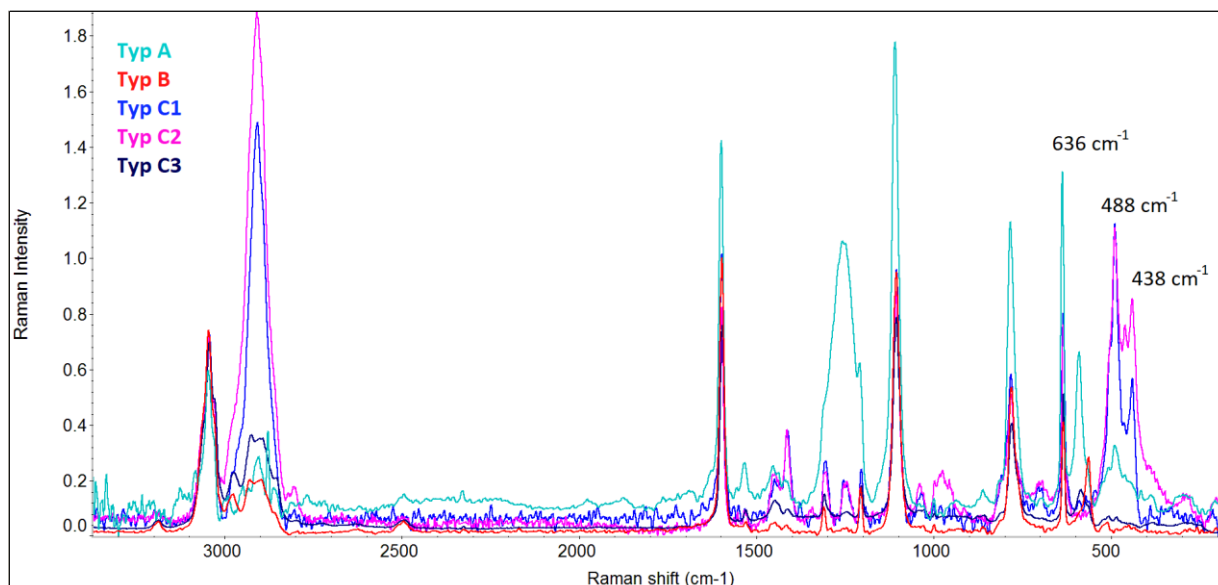
Obrázek 13: Gravimetrická křivka nanočástic typu B.

4.5. RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

Pro ověření přítomnosti sulfidických můstků byla použita Ramanova spektroskopie, která je citlivá na přítomnost -S-S- vazeb. Jak lze vidět na obrázku 14, Ramanova spektroskopie odhalila -S-S- vazbu u nanočástic typu C1 a C2. U zbylých testovaných vzorků charakteristické vibrace -S-S- vazby na 438 a 488 cm^{-1} nejsou. Vazba -S-C- s vibracemi na

636 cm^{-1} byla pozorována u všech testovaných vzorků. (Liu et al. 2007) Lze tedy říci, že nanočástice typu C1 a C2 obsahují stabilní vazbu -S-S-.

Pro lepší přehlednost výsledků Ramanovy spektroskopie, jsou spektra jednotlivých vzorků uvedena v příloze (příloha 11 až 14).



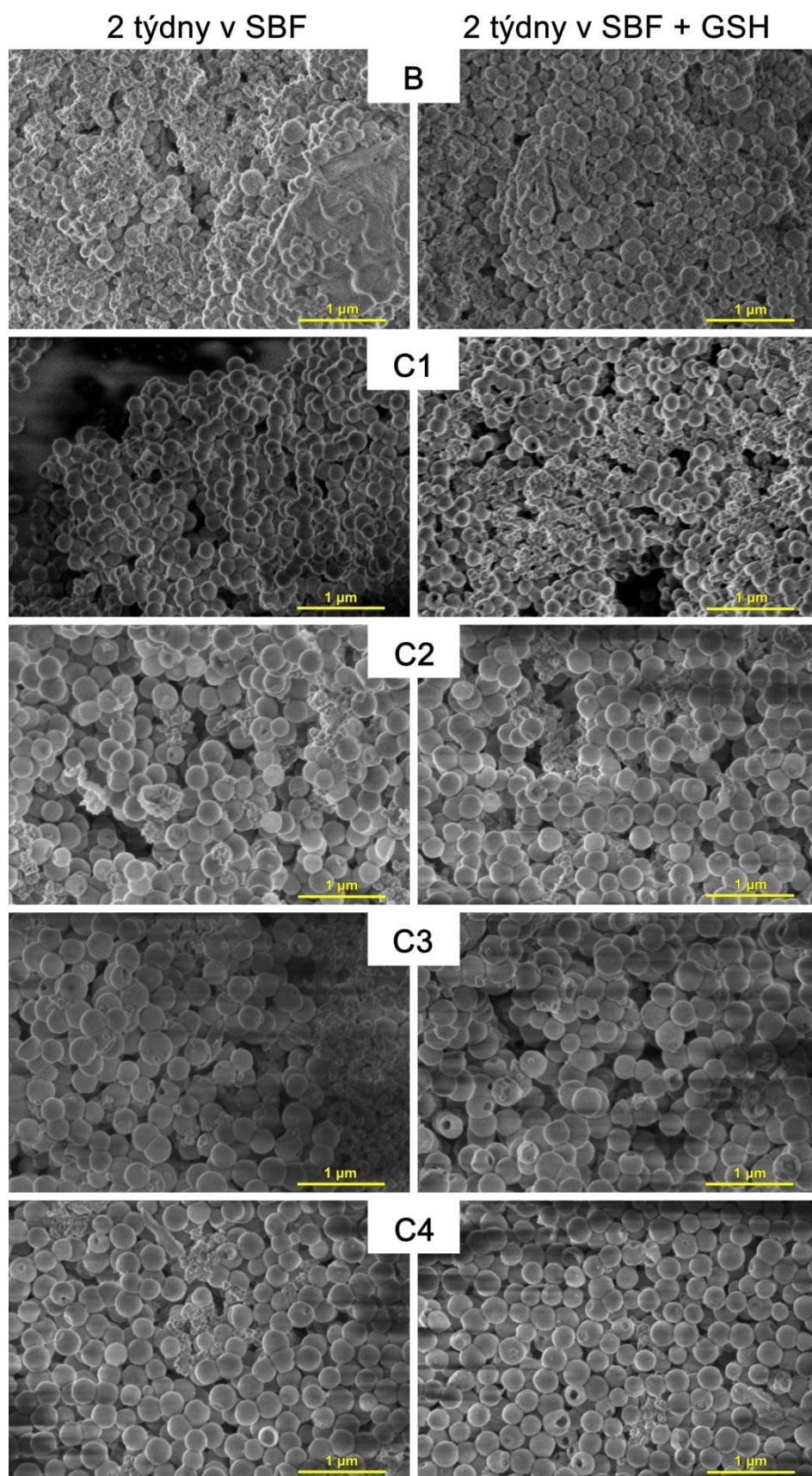
Obrázek 14: Porovnání Ramanových spekter všech připravených vzorků.

4.6. DEGRADABILITA ČÁSTIC PODLE SKENOVACÍHO ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU

Pro lepší vyhodnocení rozpadu částic v SBF vlivem přítomnosti GSH, byly pozorovány současně i částice a jejich degradace v čistém roztoku SBF. Bohužel i přes prokázání přítomnosti -S-S- vazby u nanočástic typu C1 a C2, nebyly pomocí SEM (obr. 15) pozorovány žádné známky rozpadu částic.

Na snímcích ze SEM lze vidět malé útvary, které by mohly představovat rozpadlé částice, avšak energiově disperzní analýza (EDS) ukázala, že se jedná o anorganické soli, které obsahuje SBF. Ani u jednoho vzorku není viditelný rozdíl mezi částicemi, které byly v roztoku se GSH a které nikoli. Zároveň není ani u jednoho vzorku patrné, že by se částice jakkoli po dvou týdnech rozpadaly.

Pokus byl opakován při větší koncentraci GSH a namísto SBF byl rozpuštěn ve vodě. Výsledek testování však zůstává stejný. Neobjevily se žádné známky štěpení.



Obrázek 15: Porovnání degradace vzorků po 2 týdnech v roztoku SBF a SBF + GSH.

4.7.VÝSLEDKY IMPLEMENTACE LÉČIV ZÍSKANÉ Z UV-VIS

Testování probíhalo za předpokladu, že čím více léčiva se začlení do nanočástic, tím méně léčiva bude ve výsledném supernatantu. A naměřená absorbance supernatantu bude doplňkovou hodnotou k absorbanci implementovaného léčiva.

I přes mnohá opakování testů se změnou podmínek (doba a způsob loadování léčiva, rychlost stáčení centrifugy, množství léčiva, poměr léčiv a nanočástic v roztoku) byly pokusy o zavedení léčiv do připravených nanočástic nezdařené. Jak můžeme vidět v tabulkách 9 a 10 čisté léčivo pohltilo méně světla než supernatant z roztoku léčiva s nanočásticemi. Což byl přesně opačný jev, než se očekávalo.

Tabulka 9: Výsledky UV-Vis spektroskopie z implementace L-dopy do nanočástic po dobu 24 hod.

Název	Naměřená absorbance
čistá L-dopa	2,872
A	2,954
B	2,979
C1	2,858
C2	2,987
C3	2,844
C4	2,916

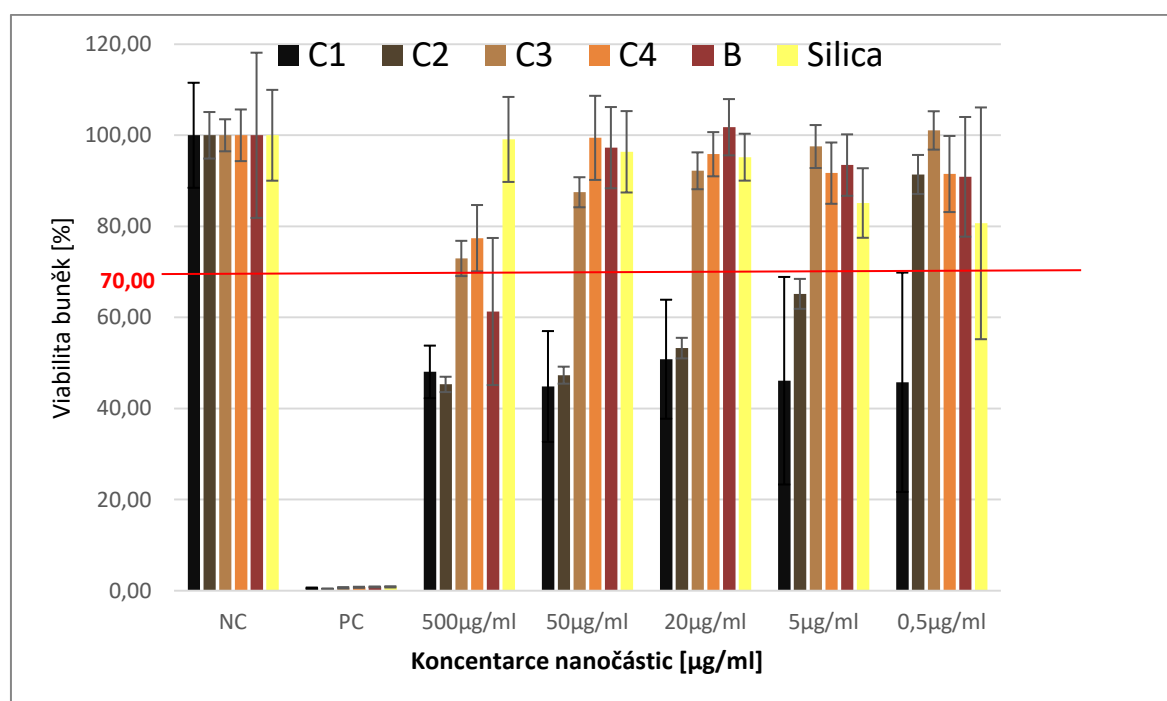
Tabulka 10: Výsledky UV-Vis spektroskopie z implementace doxorubicinu do nanočástic po dobu 24 hod.

Název	Naměřená absorbance
čistý DOX	2,889
A	2,939
B	2,962
C1	2,989
C2	2,974
C3	2,920
C4	2,935

Příčin neúspěchu může být několik. Je možné, že při testování došlo k nedokonalému stočení částic a zbylé částice v supernatantu mohly ovlivňovat naměřenou absorbanci. Dalším možným negativním jevem je, že při stačení mohlo docházet vlivem odstředivé síly k vyplavování molekul léčiva ven z nanočástic. Možná byla pro implementaci do připravených částic vybrána nevhodná léčiva. Implementace léčiv do připravených nanočástic je značně ovlivněna i nábojem na povrchu částic. Zda je toto příčina neúspěchu by mohl potvrdit/vyvrátit zeta-potenciál, ten ale z časových důvodů změřen nebyl.

4.8. VÝSLEDKY CYTOTOXICITY

Mnou připravené částice byly podrobeny testům cytotoxicity a pro srovnání byly provedeny testy i na komerčních křemičitých nanočásticích, které označuji jako „Silica“. Testování bylo prováděno pro koncentrační řadu od 0,5 μg do 500 μg nanočástic v 1 ml roztoku. Za hranici, kdy jsou materiály považovány za toxické a kdy nikoli je brána hodnota, kdy je viabilita buněk rovna 70 %. Materiály s nižší viabilitou jsou považovány za toxické.



Graf 6: Výsledky testování cytotoxicity.

Jak je patrné z výsledků testování (graf 6), nanočástice typu C1 jsou toxické ve všech testovaných koncentracích. Nanočástice typu C2 vyšly také toxické s výjimkou nejnižší koncentrace 0,5 $\mu\text{g/ml}$, kdy dosahovaly viability buněk 90%. Pro koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ se

toxicita nanočástic typu C2 pohybovala těsně pod stanovenou hranicí. Zbylé nanočástice typu C (tedy typy C3 a C4) jsou netoxické a to i pro nejvyšší testovanou koncentraci 500 µg/ml, kdy se viabilita buněk pohybovala těsně nad hranicí toxicity. Nanočástice typu B jsou toxické jen při nejvyšší koncentraci, zbylé koncentrace dosahují viability buněk přes 90 %. Komerční nanočástice vyšly zcela netoxické pro všechny koncentrace, nižší viabilita však byla naměřena u nejnižší testované koncentrace, lze ale kvůli velké odchylce předpokládat chybu během testování.

4. ZÁVĚR

- ❖ Třemi různými chemickými postupy bylo připraveno 6 druhů hybridních nanočástic na bázi organosilanů. Tyto nanočástice byly charakterizovány pomocí SEM, TEM, dusíkové adsorpce, termogravimetrické analýzy a Ramanovy spektroskopie.
- ❖ U nanočástic typu A se jedná spíše o shluk amorfních částic. Tyto částice byly na základě jejich struktury a Ramanovy spektroskopie vyhodnoceny jako nevydařené a nevhodné pro medicínské aplikace, proto na nich neproběhly všechny druhy testování.
- ❖ U dvou typů připravených nanočástic (C1, C2) se pomocí Ramanovy spektroskopie potvrdila přítomnost požadované disulfidické vazby, která je důležitá pro následnou degradaci částic v přítomnosti GSH.
- ❖ Tři typy připravených nanočástic (B, C3, C4) lze považovat za netoxické do koncentrace do 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dva druhy nanočástic (C3, C4) vyšly netoxické i pro nejvyšší testovanou koncentraci 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nanočástice typu C2 byly netoxické pouze při koncentraci 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nanočástice typu C1 byly vyhodnoceny jako toxické pro všechny testované koncentrace.
- ❖ I přestože se neprokázala degradabilita částic a nepodařilo se do nich implementovat léčivo, lze v této oblasti výzkumu dále pokračovat s jinými typy biomolekul a jinými degradačními činidly. Připravené nanočástice mají velký potenciál, především zásluhou možnosti jejich další funkcionalizace a případné aplikace v dalších oblastech.

5. LITERATURA

ANON., nedatováno. *ISO/TR 18401:2017(en), Nanotechnologies — Plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series* [online] [vid. 2019-11-05]. Dostupné z: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:18401:ed-1:v1:en>

ARKLES, Barry, 2006. Hydrophobicity, Hydrophilicity and Silanes. *Paint and Coatings Industry*. **22**, 114.

ASHBY, M. F. a Y. J. M. BRÉCHET, 2003. Designing hybrid materials. *Acta Materialia* [online]. **51**(19), The Golden Jubilee Issue. Selected topics in Materials Science and Engineering: Past, Present and Future, 5801–5821. ISSN 1359-6454. Dostupné z: [doi:10.1016/S1359-6454\(03\)00441-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6454(03)00441-5)

BARBER, D. J. a I. C. FREESTONE, 1990. An investigation of the origin of the colour of the lycurgus cup by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry* [online]. **32**(1), 33–45. ISSN 0003-813X. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x](https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x)

BAYDA, Samer, Muhammad ADEEL, Tiziano TUCCINARDI, Marco CORDANI a Flavio RIZZOLIO, 2020. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* [online]. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, **25**(1), 112. Dostupné z: [doi:10.3390/molecules25010112](https://doi.org/10.3390/molecules25010112)

BINNS, Chris, 2010. *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*. B.m.: John Wiley & Sons. ISBN 978-1-118-01706-7.

BOYES, William K., Rui CHEN, Chunying CHEN a Robert A. YOKEL, 2012. The neurotoxic potential of engineered nanomaterials. *NeuroToxicology* [online]. **33**(4), Neurotoxicity and Neurodegeneration: Local Effect and Global Impact, 902–910. ISSN 0161-813X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.neuro.2011.12.013](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.12.013)

BRUS, Jiří a Petr KOTLÍK, 1998. Sol-gel Polykondenzace alkoxysilanů, struktura a vlastnosti siloxanových materiálů. *Chemické listy*. **92**, 302–311.

CROISSANT, Jonas, Xavier CATTOËN, Michel Wong Chi MAN, Audrey GALLUD, Laurence RAEHM, Philippe TRENS, Marie MAYNADIER a Jean-Olivier DURAND, 2014. Biodegradable ethylene-bis(propyl)disulfide-based periodic mesoporous organosilica nanorods and nanospheres for efficient in-vitro drug delivery. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* [online]. **26**(35), 6174–6180. ISSN 1521-4095. Dostupné z: [doi:10.1002/adma.201401931](https://doi.org/10.1002/adma.201401931)

CROISSANT, Jonas G., Yevhen FATIEIEV a Niveen M. KHASHAB, 2017. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Advanced Materials* [online]. **29**(9), 1604634. ISSN 1521-4095. Dostupné z: [doi:10.1002/adma.201604634](https://doi.org/10.1002/adma.201604634)

EHLERDING, Emily B, Feng CHEN a Weibo CAI, 2015. Biodegradable and Renal Clearable Inorganic Nanoparticles. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)* [online]. **3**(2), 1500223. ISSN 2198-3844. Dostupné z: doi:10.1002/advs.201500223

FAHMI, Amir, Torsten PIETSCH, Cesar MENDOZA a Nicolas CHEVAL, 2009. Functional Hybrid Materials. *Materials Today* [online]. **12**, 44–50. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(09)70159-2

FOJTÍK, Anton, 2014. *Nano - fascinující fenomén současnosti: nanočástice, nanostruktury a nanotechnologie - důmyslné formy hmoty: od objevu fenoménu po biomedicínské aplikace*. 1. vyd. Praha [i.e. Dobruška]: COMTES FHT. ISBN 978-80-260-7135-8.

GILMAN, Henry. a Frederick J. MARSHALL, 1949. Cleavage of Some Organosilanes by Hydrogen Chloride. *Journal of the American Chemical Society* [online]. B.m.: American Chemical Society, **71**(6), 2066–2069. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja01174a049

GÓMEZ-ROMERO, Pedro a Clément SANCHEZ, 2005. Hybrid materials. Functional properties. From Maya Blue to 21st century materials. *New Journal of Chemistry* [online]. **29**, 57–58. Dostupné z: doi:10.1039/b416075b

GUAN, Buyuan, Le YU a Xiong LOU, 2017. Formation of Single-Holed Cobalt/N-Doped Carbon Hollow Particles with Enhanced Electrocatalytic Activity toward Oxygen Reduction Reaction in Alkaline Media. *Advanced Science* [online]. **4**, 1700247. Dostupné z: doi:10.1002/advs.201700247

CHU, Zhiqin, Silu ZHANG, Chun YIN, Ge LIN a Quan LI, 2014. Designing nanoparticle carriers for enhanced drug efficacy in photodynamic therapy. *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Royal Society of Chemistry, **2**(6), 827–832. Dostupné z: doi:10.1039/C4BM00024B

IONESCU, Emanuel a Ralf RIEDEL, 2012. Polymer Processing of Ceramics. In: *Ceramics and Composites Processing Methods* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, s. 235–270 [vid. 2020-04-15]. ISBN 978-1-118-17666-5. Dostupné z: doi:10.1002/9781118176665.ch7

JIAN, Fan, Yi ZHANG, Jing WANG, Kai BA, Runyi MAO, Wenli LAI a Yunfeng LIN, 2012. Toxicity of biodegradable nanoscale preparations. *Current Drug Metabolism* [online]. **13**(4), 440–446. ISSN 1875-5453. Dostupné z: doi:10.2174/138920012800166517

KICKELBICK, Guido, 2007. *Hybrid Materials: Synthesis, Characterization, and Applications*.

LI, Xiaomin, Lei ZHOU, Yong WEI, Ahmed Mohamed EL-TONI, Fan ZHANG a Dongyuan ZHAO, 2015. Anisotropic Encapsulation-Induced Synthesis of Asymmetric Single-Hole Mesoporous Nanocages. *Journal of the American Chemical Society* [online]. B.m.: American Chemical Society, **137**(18), 5903–5906. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.5b03207

LIN, Lisen, Jibin SONG, H. YANG a X. CHEN, 2018. Yolk-Shell Nanostructures: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. *Advanced materials* [online]. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201704639

LIU, J., Q. YANG, L. ZHANG, D. JIANG, X. SHI, J. YANG, H. ZHONG a C. LI, 2007. Thioether-bridged Mesoporous Organosilicas: Mesophase Transformations Induced by the Bridged Organosilane Precursor. *Advanced Functional Materials* [online]. **17**(4), 569–576. ISSN 1616-3028. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.200600379

LIU, Ruchuan, 2014. Hybrid Organic/Inorganic Nanocomposites for Photovoltaic Cells. *Materials* [online]. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, **7**(4), 2747–2771. Dostupné z: doi:10.3390/ma7042747

MACKENZIE, John D., 1994. Structures and properties of Ormosils. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* [online]. **2**(1), 81–86. ISSN 1573-4846. Dostupné z: doi:10.1007/BF00486217

MAGGINI, Laura, Ingrid CABRERA, Amparo RUIZ-CARRETERO, Eko A. PRASETYANTO, Eric ROBINET a Luisa De COLA, 2016. Breakable mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale* [online]. B.m.: The Royal Society of Chemistry, **8**(13), 7240–7247. ISSN 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/C5NR09112H

MAYS, T., 2007. A new classification of pore sizes. *Studies in Surface Science and Catalysis - STUD SURF SCI CATAL* [online]. **160**, 57–62. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-2991(07)80009-7

MURUGADOSS, Sivakumar, Dominique LISON, Lode GODDERIS, Sybille VAN DEN BRULE, Jan MAST, Frederic BRASSINNE, Noham SEBAIHI a Peter H. HOET, 2017. Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Archives of Toxicology* [online]. **91**(9), 2967–3010. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-017-1993-y

NASROLLAHZADEH, Mahmoud, S. Mohammad SAJADI, Mohaddeseh SAJJADI a Zahra ISSAABADI, 2019. Chapter 1 - An Introduction to Nanotechnology. In: Mahmoud NASROLLAHZADEH, S. Mohammad SAJADI, Mohaddeseh SAJJADI, Zahra ISSAABADI a Monireh ATAROD, ed. *Interface Science and Technology* [online]. B.m.: Elsevier, An Introduction to Green Nanotechnology, s. 1–27 [vid. 2020-04-15]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8

PRIEBE, M. a K. FROMM, 2015. Nanorattles or yolk-shell nanoparticles--what are they, how are they made, and what are they good for? *Chemistry* [online]. Dostupné z: doi:10.1002/chem.201405285

REJAB, Mohd, Mohammad Hazim MOHAMAD HAMDAN, Quanjin MA, Januar SIREGAR, Dandi BACHTIAR a Yusrizal MUCHLIS, 2019. Historical Development of Hybrid Materials. In: [online]. ISBN 978-0-12-803581-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.10546-6

SHI, Jiao Yi, Chang An WANG, Zhi Jun LI, Qiong WANG, Yuan ZHANG a Wei WANG, 2011. Heterogeneous Organocatalysis at Work: Functionalization of Hollow Periodic Mesoporous Organosilica

Spheres with MacMillan Catalyst. *Chemistry – A European Journal* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 17(22), 6206–6213. ISSN 0947-6539. Dostupné z: doi:10.1002/chem.201100072

SIBREAX, 2012. Technology. *SiBreax* [online]. [vid. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://sibreax.com/index.php/technology/>

TANG, Fangqiong, Linlin LI a Dong CHEN, 2012. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Advanced Materials* [online]. 24(12), 1504–1534. ISSN 0935-9648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201104763

TANASA, Fulga; ZANOAGA, Madalina. POLYMER BASED HYBRID MATERIALS FOR AEROSPACE APPLICATIONS. *Scientific Research & Education in the Air Force-AFASES*, 2012, 1.

TRAVAGLINI, Leana, Pierre PICCHETTI, Ricardo TOTOUAO, Eko ADI PRASETYANTO a Luisa De COLA, 2019. Highly degradable imine-doped mesoporous silica particles. *Materials Chemistry Frontiers* [online]. B.m.: Royal Society of Chemistry, 3(1), 111–119. Dostupné z: doi:10.1039/C8QM00438B

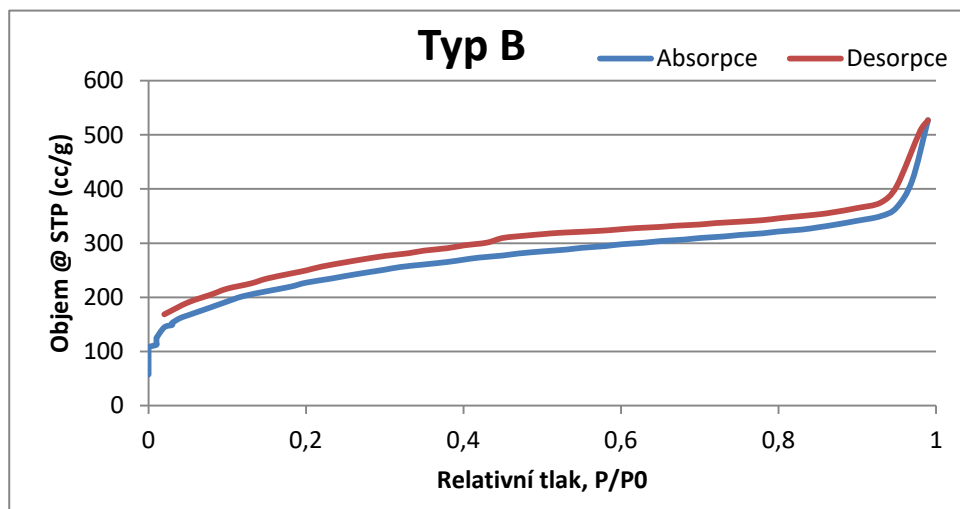
VALLET-REGÍ, María, Montserrat COLILLA a Blanca GONZÁLEZ, 2010. Medical Applications of Organic–Inorganic Hybrid Materials Within the Field of Silica-Based Bioceramics. *Chemical Society reviews* [online]. 40, 596–607. Dostupné z: doi:10.1039/c0cs00025f

WILHELM, Michaela, Christian SOLTSMANN, Dietmar KOCH a Georg GRATHWOHL, 2005. Ceramers—functional materials for adsorption techniques. *Journal of the European Ceramic Society* [online]. 25(2), European Materials Research Society 2004, Symposium Q: Polymer Derived Ceramics (PDCs), 271–276. ISSN 0955-2219. Dostupné z: doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2004.08.008

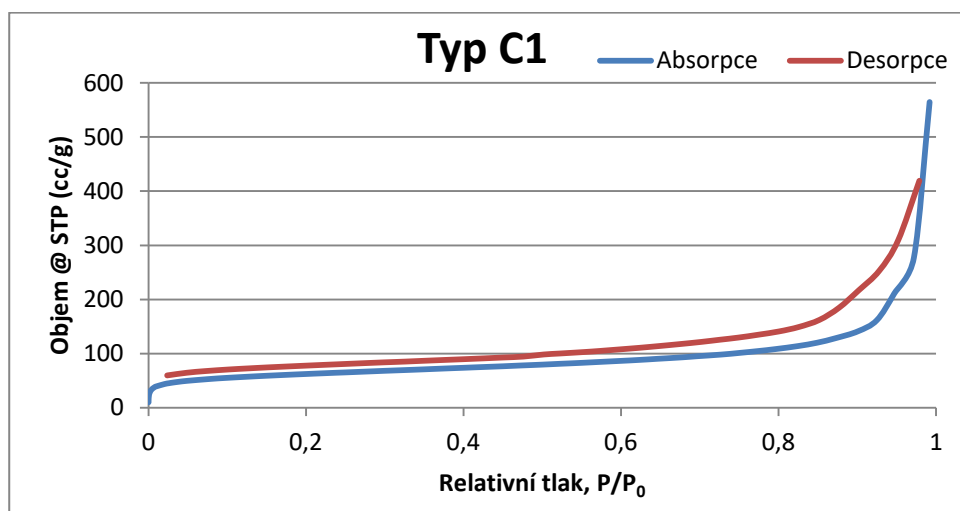
XU, Jie, Aijing MA, Zhemi XU, Xiaokong LIU, Dewei CHU a Haolan XU, 2015. Synthesis of Au and Pt Hollow Capsules with Single Holes via Pickering Emulsion Strategy. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 119. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.5b09478

ZHU, Yun-Pei a Zhong-Yong YUAN, 2015. History and Classification of Non-Siliceous Hybrid Materials. In: Yun-Pei ZHU a Zhong-Yong YUAN, ed. *Mesoporous Organic-Inorganic Non-Siliceous Hybrid Materials: Basic Principles and Promising Multifunctionality* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, SpringerBriefs in Molecular Science, s. 7–23 [vid. 2020-04-14]. ISBN 978-3-662-45634-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-45634-7_2

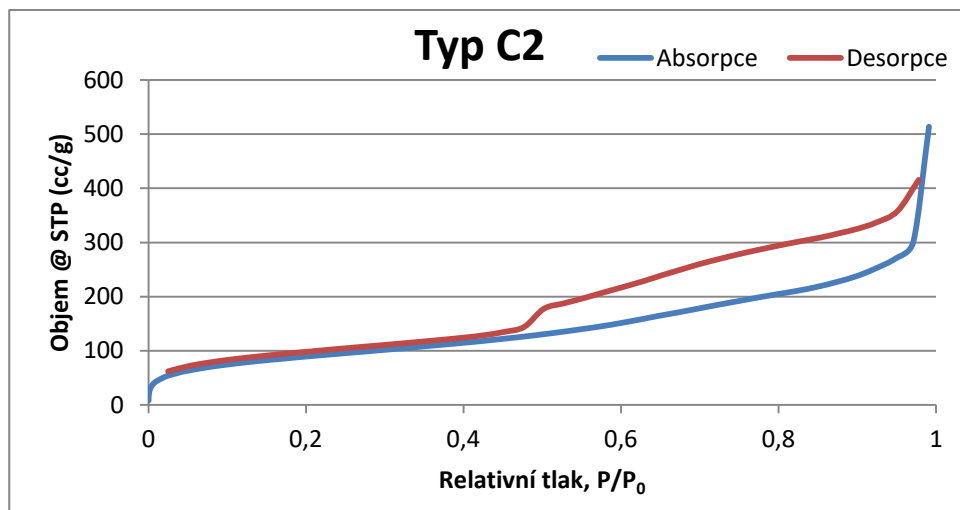
6. PŘÍLOHY



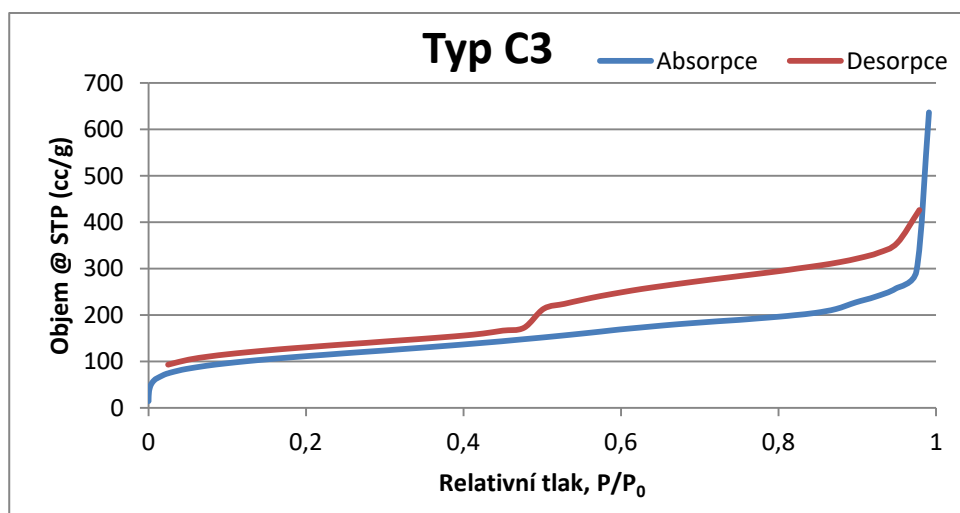
Příloha 1: Adsorpční izoterma získaná nanočástic typu B.



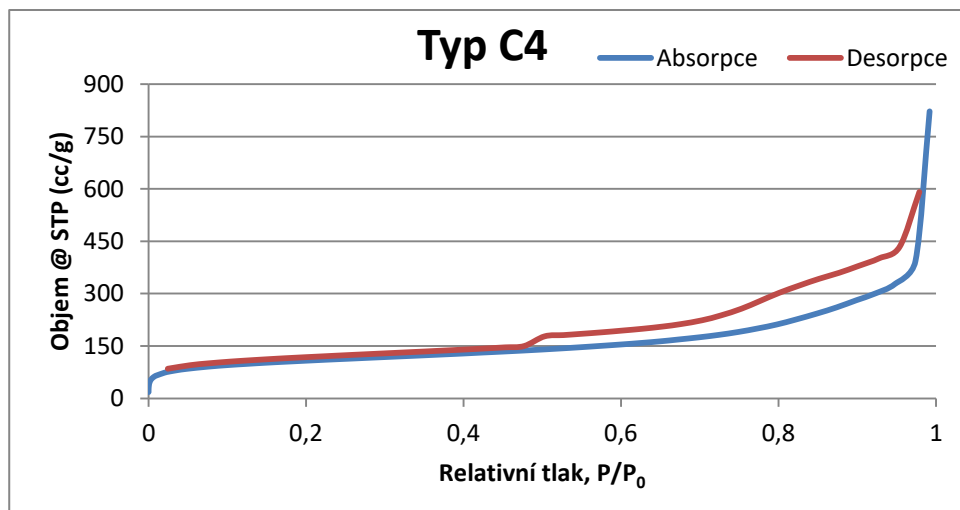
Příloha 2: Adsorpční izoterma získaná nanočástic typu C1.



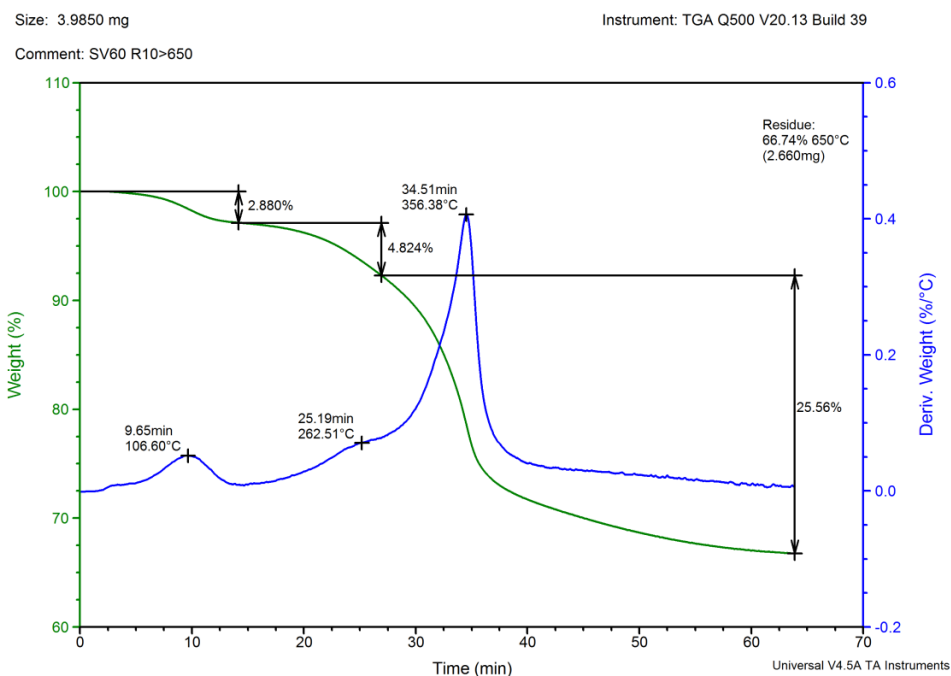
Příloha 3: Absorpční izoterma získaná nanočástic typu C2.



Příloha 4: Absorpční izoterma získaná nanočástic typu C3.



Příloha 5: Adsorpční izoterma získaná nanočástic typu C4.

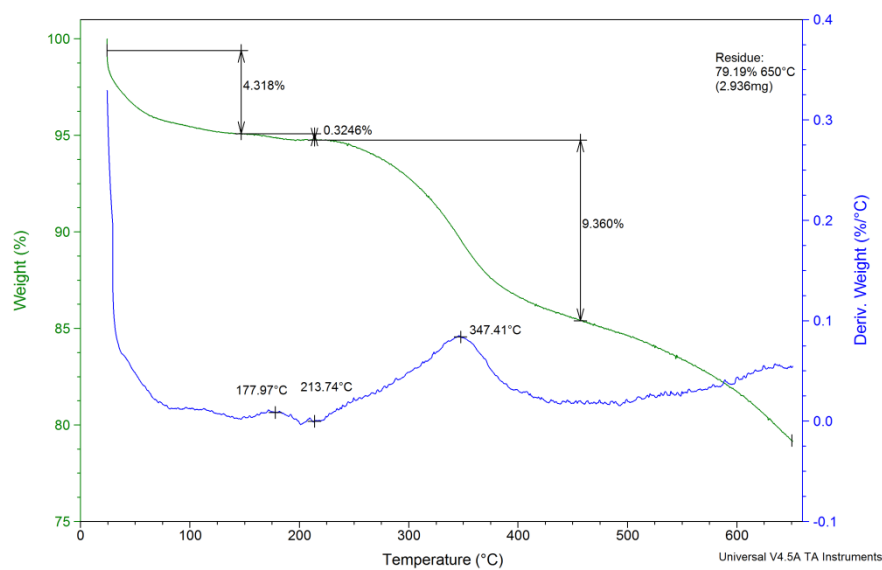


Příloha 6: Gravimetrická křivka nanočástic typu A.

Sample: CH1-final
Size: 3.7070 mg

File: CH1-final_M2.001
Instrument: TGA Q500 V20.13 Build 39

Comment: SA60 R10>650

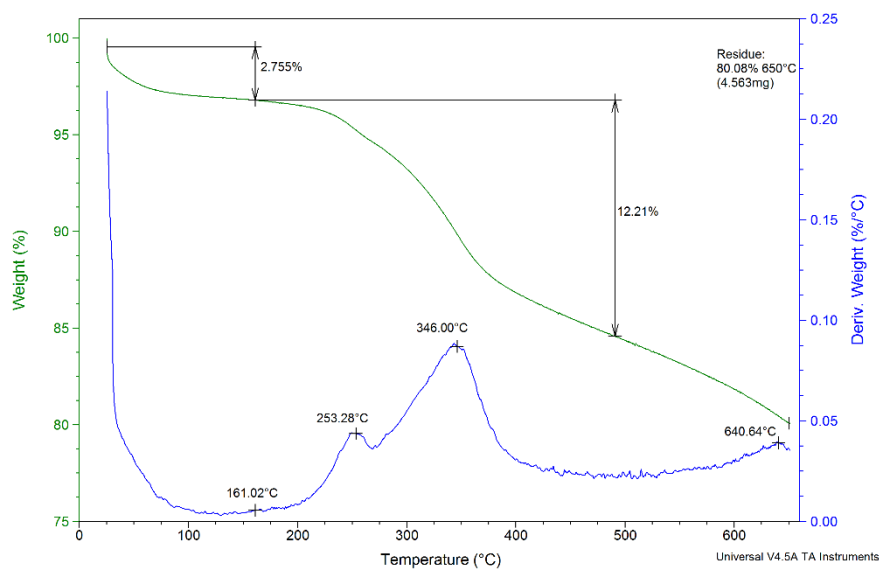


Příloha 7: Gravimetrická křivka nanočástic typu C1.

Sample: CH2
Size: 5.6980 mg

File: CH2_M2.001
Instrument: TGA Q500 V20.13 Build 39

Comment: SA60 R10>650

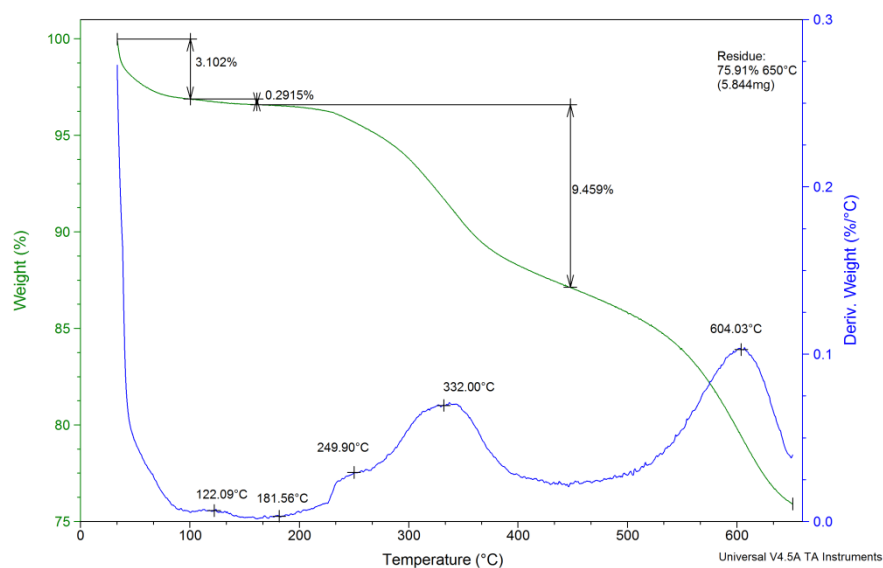


Příloha 8: Gravimetrická křivka nanočástic typu C2.

Sample: CH3-final
Size: 7.6990 mg

File: CH3-final_M2.001
Instrument: TGA Q500 V20.13 Build 39

Comment: SA60 R10>650

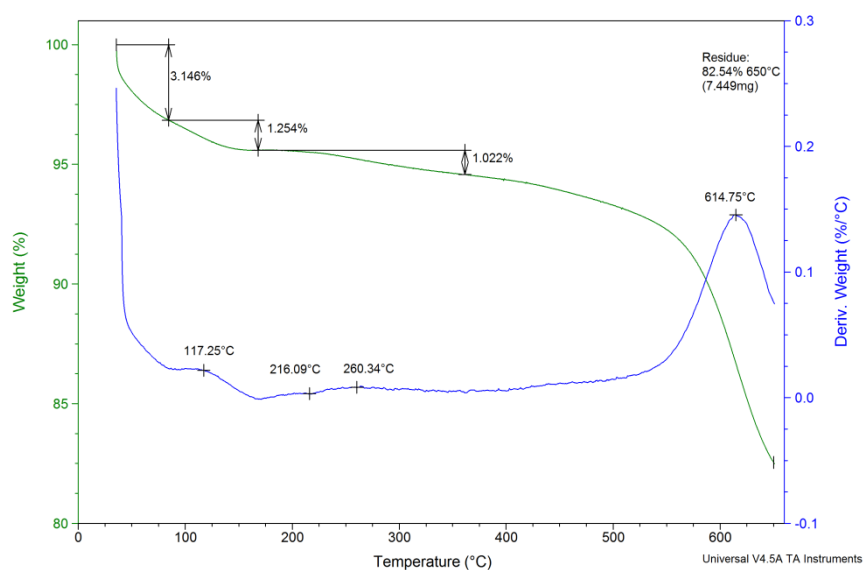


Příloha 9: Gravimetrická křivka nanočástic typu C3.

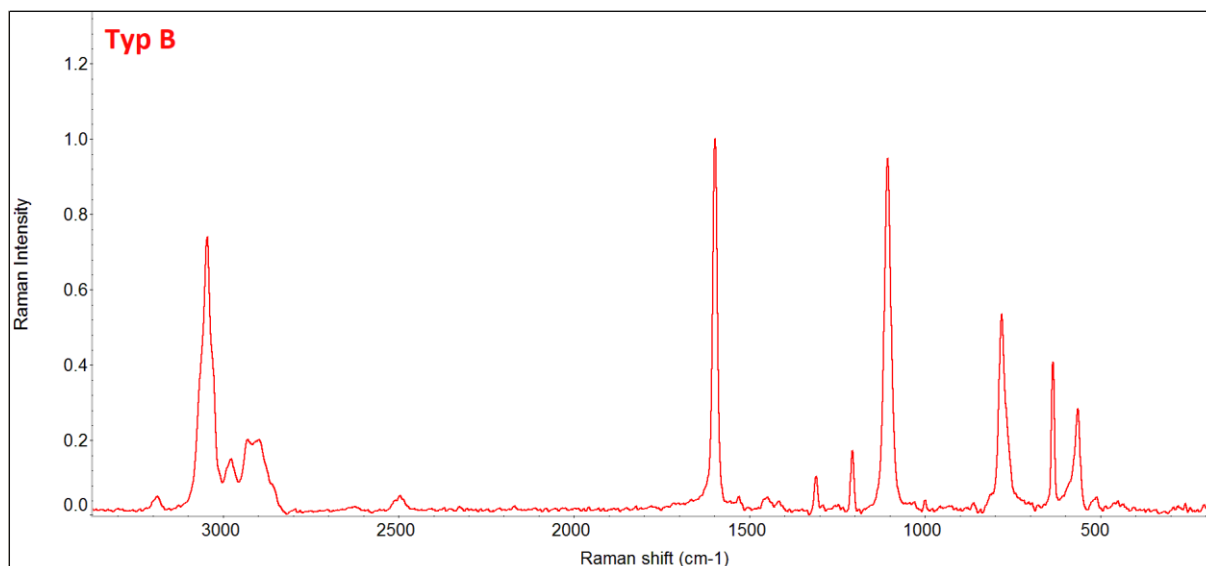
Sample: CH4 EXT
Size: 9.0240 mg

File: CH4 EXT_M2.001
Instrument: TGA Q500 V20.13 Build 39

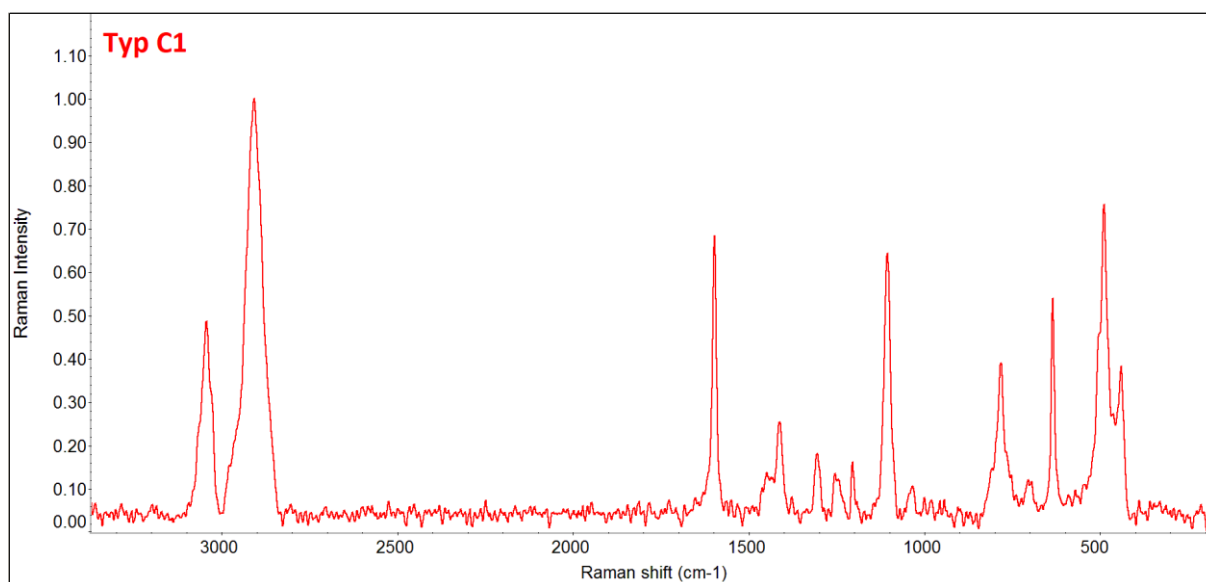
Comment: SA60 R10>650



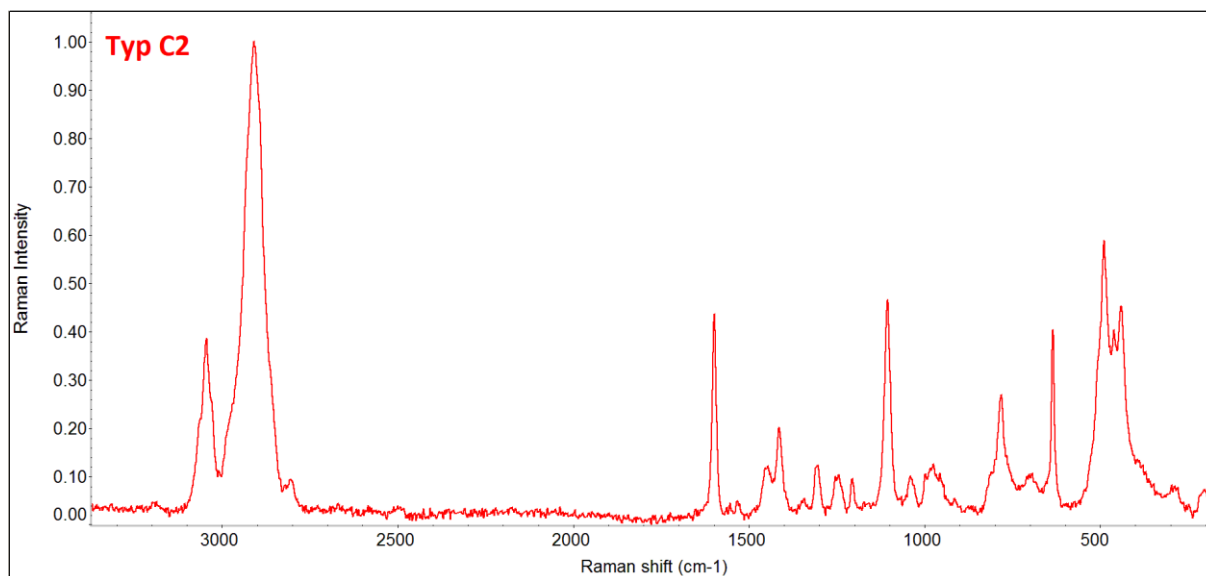
Příloha 10: Gravimetrická křivka nanočástic typu C4.



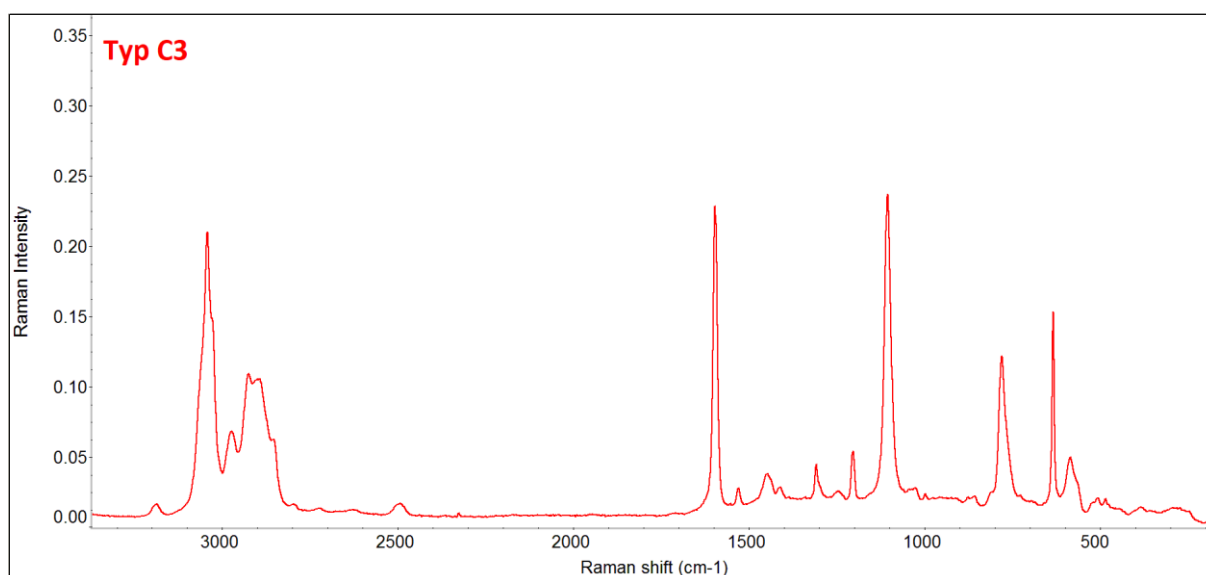
Příloha 11: Spektrum nanočástic typu B získané Ramanovou spektroskopií.



Příloha 12: Spektrum nanočástic typu C1 získané Ramanovou spektroskopií.



Příloha 13: Spektrum nanočástic typu C2 získané Ramanovou spektroskopií.



Příloha 14: Spektrum nanočástic typu C3 získané Ramanovou spektroskopií.