

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA AVBELJ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA AVBELJ

**RAZVOJ METODE ZA VGRAJEVANJE TEŽKO TOPNIH UČINKOVIN V  
SKUPKE SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV ŽELEZOVEGA OKSIDA**

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR POORLY SOLUBLE DRUG LOADING  
INTO SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLE CLUSTERS**

MASTER'S STUDY PROGRAMME INDUSTRIAL PHARMACY

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm. in somentorstvom dr. Slavka Kralja. Vzorce superparamagnetnih nanodelcev iNANOvative™ je prispevalo podjetje Nanos Scientifica d.o.o. Slike superparamagnetnih nanodelcev s presevnim elektronskim mikroskopom je izvedel dr. Slavko Kralj.

### **Zahvala**

*Iskreno se zahvaljujemizr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm. in dr. Slavku Kralju za usmerjanje in vse nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Raziskovati tako zanimivo in aktualno tematiko mi je bilo res v veliko veselje!*

*Zahvaljujem se tudi družini in bližnjim, ki so me podpirali in spodbujali skozi vsa leta študija. V pravih trenutkih ste me poslušali, mi pomagali in polepšali dneve. Brez vas bi bila leta zagotovo manj pisana.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm. in somentorstvom dr. Slavka Kralja.

Maja Avbelj

## VSEBINA

1. UVOD.....	1
1.1. MAGNETNE LASTNOSTI .....	1
1.2. PREGLED METOD VGRADNJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN V SUPERPARAMAGNETNE POROZNE NANODELCE SILIKE .....	3
1.3. MAGNETNO USMERJANJE NANODELCEV .....	13
2. NAMEN DELA .....	15
3. MATERIALI IN METODE .....	16
3.1. MATERIALI .....	16
3.2. LABORATORIJSKI PRIBOR .....	18
3.3. APARATURE .....	18
3.4. METODE .....	19
4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	29
4.1. DELNO RAZTAPLJANJE MAGNETNEGA JEDRA SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV iNANOvative™ .....	29
4.2. LIOFILIZACIJA DISPERZIJ SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV IN DOLOČANJE NJIHOVE MASNE KONCENTRACIJE .....	32
4.3. POLNJENJE DELCEV Z BARVILOM.....	33
4.4. TOPNOST TETRADEKANOLA V ETANOLNO-VODNIH RAZTOPINAH ..	34
4.5. TOPNOST KARVEDILOLA V RAZTOPINI TETRADEKANOLA.....	34
4.6. OPTIMIZACIJA METODE ZA VGRAJEVANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE V DELNO VOTLE SUPERPARAMAGNETNE NANODELCE.....	35
4.7. VGRAJEVANJE ZU V DELCE .....	40
4.8. UPORABA ULTRACENTRIFUGIRANJA V PRESKUSU SPROŠČANJA ZDRAVILNE UČINKOVINE .....	53
4.9. VREDNOTENJE SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV Z ZDRAVILNO UČINKOVINO ZA UPORABO V NAMENE ZDRAVLJENJA .....	55
5. SKLEP .....	59
6. LITERATURA .....	60

## Kazalo slik

Slika 1: Učinkovitost zdravljenja (vpliv na velikost tumorja) z DOX v različnih odmerkih in različnih formulacijah ter vpliv magnetnega ciljanja, b) vpliv magnetnega polja na lokacijo delcev v organizmu .....	15
Slika 2: Strukturna formula tetradekanola.....	16
Slika 3: Strukturna formula IBU. ....	16
Slika 4: Strukturna formula KAR.....	17
Slika 5: Strukturna formula barvila Nile Red.....	17
Slika 6: Ločba delno votlih superparamagnetnih nanodelcev od disperznega medija v magnetnem polju. ....	19
Slika 7: Postopek priprave delno votlih superparamagnetnih nanodelcev.....	20
Slika 8: Postavitev vzorcev med liofilizacijo. ....	20
Slika 9: Postavitev mikrocentrifurke na magnetu in prikaz ločbe delcev. ....	25
Slika 10: Postopek ločevanja superparamagnetnih nanodelcev v magnetnem polju in vgrajevanje zdravilne učinkovine.....	26
Slika 11: Postavitev vsebnika na magnetu med sproščanjem.....	27
Slika 12: Osnovna disperzija superparamagnetnih nanodelcev iNANOvative™ (levo) in disperzijadelcev z delno raztopljenimi magnetnimi jedri (desno).....	29
Slika 13: TEM slika zgradbe nanodelcev iNANOvative™.....	31
Slika 14: TEM slika delno votlih superparamagnetnih nanodelcev.....	31
Slika 15: Profil sproščanja ZU s korekcijo (modra krivulja) (n=1) in brez korekcije (n=1) (rdeča krivulja) ozadja meritev. Poskus smo izvedli z vzorcem 4 (500 µl disperzije delcev v 3 ml vode).....	36
Slika 16: a) Vpliv tetradekanola na ločevanje delcev v magnetnem polju, b) agregati delcev,.....	40
Slika 17: Sproščena masa IBU iz superparamagnetnih nanodelcev v katere smo ZU vgradili iz 0,5 % - 10% raztopin IBU v raztopini tetradekanola v etanolu (n=1). ....	42
Slika 18: Vpliv deleža tetradekanola v topilu za vgrajevanje na sproščanje IBU iz delcev, v katere smo ZU vgrajevali iz 5 % raztopine IBU (n=1). ....	44
Slika 19: Vpliv deleža tetradekanola v raztopini za vgrajevanje na sproščanje IBU iz delcev, v katere smo vgrajevali ZU iz 2,5 % raztopine IBU (n=1). ....	46
Slika 20: Vpliv deleža tetradekanola v raztopini za vgrajevanje na sproščanje KAR iz delcev, v katere smo vgrajevali ZU iz 1 % raztopine KAR (n=1). ....	48

Slika 21: Vpliv uporabe ultrazvoka za redispergiranje agregatov na hitrost sproščanja KAR (n=1). .....	50
Slika 22: Primerjava profilov sproščanja KAR in IBU iz delcev v katere smo vgradili ZU iz 1 % raztopine ZU v 10 % raztopini tetradekanola v etanolu (n=1). .....	51
Slika 23: Sproščanje IBU iz delcev, v katere smo vgrajevali ZU iz 5 % raztopine IBU, ki je bila raztopljena v 25 % (m/m) raztopini tetradekanola v etanolu (n=3). .....	52
Slika 24: Disperzija delcev pred ultracentrifugiranjem (levo) in po ločbi (desno). .....	53
Slika 25: Količina sproščene učinkovine, ki smo jo določili po postopku ultracentrifugiranja (n=1). .....	54

## Kazalo preglednic

Preglednica I: Pregled metod polnjenja mezoporoznih nanodelcev iz silike z ZU in največji deleži vgrajene ZU. ....	5
Preglednica II: Rast tumorja brez in z izpostavitvijo magnetni hipertermiji [13]. ....	8
Preglednica III: Vpliv magnetnih nanodelcev na tumorje jeter kuncev [18]. ....	9
Preglednica IV: Vpliv magnetne hipertermije rast tumorjev in sintezo HSP [19]. ....	10
Preglednica V: Neželeni učinki, ki so se pojavili ob zdravljenju možganskega tumorja z magnetno hipertemijo. ....	13
Preglednica VI: Primerjava učinkovitosti različnih načinov ciljanja tumorjev na mišjem modelu raka debelega črevesa [25]. ....	14
Preglednica VII: Pogoji priprave delno votlih superparamagnetnih nanodelcev. ....	20
Preglednica IX: Masna koncentracija delcev v vzorcu 5 in vpliv ločb pri postopku čiščenja in polnjenja delcev, ki je predstavljen na sliki 9. ....	32
Preglednica XI: Topnost KAR v etanolni raztopini tetradekanola. ....	35
Preglednica XII: Potek optimizacije metode za vgrajevanje zdravilne učinkovine v delno votle superparamagnetne nanodelce in glavne ugotovitve. Natehtane mase in dodani volumni topila so zbrani v prilogi I. ....	39
Preglednica XIII: Nastanek s prostim očesom vidnih aglomeratov pri poskusih sproščanja ZU iz nanodelcev. ....	40

Preglednica XIV: Vpliv segrevanja na količino sproščene ZU in delež vgrajene ZU v odvisnosti od koncentracije ZU v raztopini za vgrajevanje v različnih časovnih točkah (n=1). .....	43
Preglednica XV: Sproščena količina IBU iz delcev in celokupna količina vgrajene ZU, ki smo jo vgrajevali iz 5 % raztopine IBU, ki smo ga v delce vgradili s pomočjo različnih topil, in masa ZU, ki se je vgradila v delce (n=1). .....	45
Preglednica XVI: Zbrani rezultati sproščanja iz superparamagnetnih nanodelcev v katere smo ZU vgradili iz 2,5 % raztopine IBU, ki smo ga v delce vgradili s pomočjo različnih topil, in masa ZU, ki se je vgradila v delce (n=1). .....	47
Preglednica XVII: Zbrani rezultati sproščanja KAR iz delcev, v katere smo ZU vgrajevali iz 1 % raztopine KAR s pomočjo različnih topil in masa KAR, ki se je vgradila v delce (n=1). .....	49
Preglednica XVIII: Zbrani rezultati sproščanja KAR iz delcev, v katere smo ZU vgrajevali iz 1 % raztopine KAR in preverili vpliv ultrazvoka na sproščanje KAR iz delcev (n=1)...	50
Preglednica XIX: Zbrani rezultati sproščene mase KAR in IBU iz delcev, v katere smo ZU vgrajevali iz 1 % raztopine ZU s pomočjo 10 % (m/m) raztopine tetradekanola v etanolu in masa ZU, ki se je vgradila v delce (n=1). .....	51
Preglednica XX: Povzetek poskusov vgrajevanja ZU v delno votle superparamagnetne nanodelce (n=1). .....	57

## POVZETEK

Magnetni nanodelci imajo mnogo pozitivnih lastnosti, ki bi jih lahko izkoristili tudi v biomedicini in z njimi izboljšali učinkovitost zdravljenja bolezni. Magnetne nanodelce lahko obložimo in s tem dosežemo boljšo stabilnost in možnost vezave tarčnih molekul na površino, s pomočjo magnetnega polja pa delce lahko usmerjamo ali jih segrevamo. Na površino lahko dodamo tudi porozen sloj iz silicijevega dioksida, ki omogoča vgrajevanje zdravilne učinkovine v pore. Z eno vrsto delcev tako lahko dosežemo ciljanje tarčnega organa, dostavo zdravilne učinkovine, segrevanje tkiva in kontrolirano sproščanje.

Delci *iNANOvative*<sup>TM</sup>, ki smo jih uporabili v naših poskusih, imajo maghemitno jedro in ovoj iz poroznega silicijevega dioksida. Prostor, ki je namenjen vgrajevanju zdravilne učinkovine, smo želeli povečati, zato smo s klorovodikovo kislino delno raztopili magnetno jedro. Ugotovili smo, da je optimalen čas raztapljanja 2 min 30 s, saj so bili delci še vedno magnetno odzivni, a so imeli hkrati v strukturi dovolj prostora za vgradnjo zdravilne učinkovine.

Nato smo razvili postopek polnjenja nanodelcev z zdravilno učinkovino. Uporabili smo dve težko topni modelni zdravilni učinkovini – ibuprofen in karvedilol. Vgradili smo ju z inkubiranjem nanodelcev v raztopini zdravilne učinkovine. Kot topilo za pripravo raztopine smo uporabili zmes tetradekanola in etanola ter nato spektrofotometrično preučevali sproščanje.

Preverili smo, kakšen vpliv ima koncentracija ibuprofena v raztopini na vgrajevanje in na količino vgrajenega ibuprofena in tudi kakšen vpliv ima delež tetradekanola v raztopini na vgrajevanje ibuprofena in karvedilola. Ugotovili smo, da tetradekanol uspešno zadrži sproščanje ibuprofena in karvedilola, znatnih količin karvedilola pa brez tetradekanola sploh nismo mogli vgraditi. V nekaterih primerih je tetradekanol povezoval delce, ki so tvorili z očesom vidne agregate, kar je ena izmed težav, ki jo moramo rešiti. V delce smo uspeli vgraditi od 0,071 mg do 0,936 mg ibuprofena na mg delcev in od 0,052 mg do 0,185 mg karvedilola na mg delcev.

***Ključne besede: magnetni nanodelci, magnetno ciljanje, vgrajevanje učinkovine, tetradekanol, težko topna zdravilna učinkovina***



## ABSTRACT

Magnetic nanoparticles have various advantages that could exploit to improve efficacy of treatment of various diseases. Magnetic nanoparticles can be coated and, thus, better colloidal stability can be achieved, as well as the targeting ligands can be attached to the surface.. The nanoparticles can be guided in the body using external magnetic field gradient and their exposure to alternating magnetic field results in local hyperthermia in the target tissue. Addition of a porous silica shell on the magnetic core enables drug incorporation in the pores. Thus, application of such delivery system enables simultaneous targeting of a specific organ, drug delivery, tissue hyperthermia and the controlled drug release. In our experiments we used *iNANOvative*<sup>TM</sup> nanoparticles, composed of maghemite core coated with a porous silica shell. To increase the loading capacity of nanoparticles, we have partly dissolved the magnetic core with hydrochloric acid. We have shown that the optimal incubation time in hydrochloric acid is 2 min 30 s, since the nanoparticles were still magnetically-responsive, but they had some additional space for drug loading in their structure.

Later on we developed a method for incorporation of drugs into partially hollow nanoparticles. We used two poorly water soluble drugs, namely ibuprofen and carvedilol. They were incorporated in nanoparticles by incubation of particles in the drug solution in mixture of tetradecanol and ethanol. The drug release from the particles was studied spectrophotometrically.

The impact of ibuprofen concentration in drug solution on ibuprofen entrapment efficacy and the impact of tetradecanol on dissolution profiles of ibuprofen and carvedilol was studied. We found out, that tetradecanol successfully prolongs the release of both drugs. Evenmore, carvedilol could have been incorporated in the particles only by using tetradecanol. One of the problems that have to be addressed is bridging phenomena of tetradecanol – in some cases tetradecanol causes formation of particle aggregates. To sum up, we have successfully incorporated 0.071 mg – 0.946 mg of ibuprofen per one mg of particles and 0.052 – 0.185 mg of carvedilol per one mg of particles.

***Keywords: magnetic nanoparticles, magnetic targeting, drug loading, tetradecanol, poorly soluble drug***

## SEZNAM OKRAJŠAV

AMF – izmenično magnetno polje (*angl. alternating magnetic field*)

DOX - doksorubicin

HSP – proteini toplotnega šoka (*angl. heat shock protein*)

IBU – ibuprofen

KAR - karvedilol

PTX – paklitaksel

RGD - tripeptid *arginin-glicin-asparaginska kislina*

SLP – specifična izguba toplote (*angl. specific loss power*)

ZU – zdravilna učinkovina

## 1. UVOD

Magnetni nanodelci so kljub več kot petdesetim letom raziskav šele v zadnjih desetletjih pridobili na veljavi tudi na področju biomedicine. Z uporabo magnetnih nanodelcev lahko izboljšamo varnost in učinkovitost zdravljenja. Raziskovanje poteka predvsem na področju rakavih obolenj. Uporabljamo lahko neobložene magnetne nanodelce, vendar je prednost obloženih nanodelcev (ang. *core-shell particles*) ta, da lahko enostavno spremenimo njihovo površino in tako zagotovimo ustrezno stabilnost nanodelcev v kompleksnih bioloških sistemih ter omogočimo njihovo ciljanje. Raziskovalci pogosto proučujejo porozne nanodelce, ki imajo lupini podobno oblogo/prevleko iz silicijevega dioksida (silike) in hkrati v notranjosti kristalinično magnetno jedro oz. magnetni nanodelec. Jedro takšnih delcev običajno predstavljajo delci maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ali magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), saj njihova uporaba omogoča kompromis med uporabnimi magnetnimi lastnostmi in nizko toksičnostjo. Le-ta je zaradi široke uporabe nanodelcev v različne biomedicinske namene dobro raziskana. Maghemit in magnetit sta pri regulatornih organih prepoznana kot varna materiala [1]. Takšne nanodelce lahko uporabimo za pregrevanje obolelega tkiva z disipacijo toplote na osnovi magnetne hipertermije, za ciljano dostavo zdravilnih učinkovin ali za diagnosticiranje, kjer magnetne nanodelce uporabijo kot T2 kontrastna sredstva pri slikanju z magnetno resonanco. Magnetni nanodelci so tudi široko uporabni pri magnetni separaciji celic iz medija, kjer celice označimo z magnetnimi delci in nato s pomočjo magnetnega polja ločimo iz medija. Magnetne delce za lažjo uporabo običajno suspendiramo v tekočem mediju in takšno koloidno stabilno suspenzijo imenujemo magnetna tekočina (ferofluid). Za pripravo takšne suspenzije imajo nanodelci železovega oksida premer manjši od 15 nm, kar jim zagotavlja superparamagnetne lastnosti. Nanodelci v tem velikostnem območju ostanejo dispergirani zaradi Brownovega gibanja oz. termičnih fluktuacij in se magnetno ne aglomerirajo [2]. Nanodelce lahko stabiliziramo z nabitimi molekulami na njihovi površini (npr. nabite površinsko aktivne snovi) in hidrofilnimi polimeri, kar preprečuje aglomeriranje delcev in ohranja koloidno stabilnost magnetne tekočine tudi v prisotnosti močnega zunanega magnetnega polja.

### 1.1. MAGNETNE LASTNOSTI

Za razumevanje obnašanja magnetnih nanodelcev moramo razumeti fizikalne osnove, ki jih nato izkoriščamo pri njihovi uporabi. Za vse magnetne materiale je značilno, da se

individualni atomski magnetni momenti v snovi ob postavitvi snovi v magnetno polje jakosti  $H$  usmerijo pod vplivom zunanega polja in pripomorejo k odzivu t.j. k nastanku magnetnega dipolnega momenta [3]. Vse snovi so do neke mere magnetne, glede na njihov odziv na zunanje magnetno polje pa jih razdelimo glede na susceptibilnost  $\chi$  [4].

Večina materialov izkazuje zelo šibek magnetni odziv v prisotnosti zunanega magnetnega polja in jih zaradi nizke magnetne susceptibilnosti pogosto poimenujemo nemagnetni materiali. Takšnim nemagnetnim materialom pravimo strokovno paramagnetni (zelo majhna pozitivna magnetna susceptibilnost) in diamagnetni (zelo majhna negativna magnetna susceptibilnost). Magnetni materiali izkazujejo urejeno stanje spinov in so magnetni tudi brez prisotnosti zunanega magnetnega polja. Takšnim materialom pravimo feromagnetni in ferimagnetni materiali. Predpona fero-/feri- se nanaša na naravo sklopitvenih interakcij elektronov atomov znotraj materiala [3].

Za uporabo v medicini so zanimivi predvsem *feromagnetni materiali*, ki imajo zelo visoko susceptibilnost. Magnetne lastnosti fero-/feri- magnetnih materialov pa so odvisne od velikosti delcev/kristalov, kjer z manjšanjem velikosti monodomenskih nanodelcev v nanometrsko območje le-ti preidejo v superparamagnetno stanje. V tem stanju magnetni moment celotnega delca prosto rotira zaradi termičnih fluktuacij, medtem ko so posamezni magnetni momenti atomov med seboj urejeni. Superparamagnetizem je pojav, kjer se feromagnetni oziroma ferimagnetni materiali obnašajo kot paramagnetni v odsotnosti zunanega magnetnega polja. Superparamagnetni nanodelci se zelo hitro »namagnetijo« že pri majhnih vrednostih zunanega magnetnega polja in se po umiku iz zunanega magnetnega polja zopet obnašajo kot nemagnetni materiali (paramagnetizem). Zaradi visoke magnetizacije (super) in paramagnetnih oz. nemagnetnih lastnosti v odsotnosti zunanega magnetnega polja te materiale imenujemo superparamagnetni materiali. Superparamagnetizem se pojavlja pri fero-/ferimagnetnih nanodelcih pod določeno kritično velikostjo nanodelcev, ki znaša za železove okside približno 15 nm [2]. Pomembna prednost superparamagnetnih materialov pred večjimi fero-/feri-magnetnimi materiali je v relativno enostavni pripravi koloidno stabilnih suspenzij, saj se superparamagnetni nanodelci magnetno ne aglomerirajo.

## 1.2. PREGLED METOD VGRADNJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN V SUPERPARAMAGNETNE POROZNE NANODELCE SILIKE

Vsestranskost superparamagnetnih poroznih nanodelcev silike omogoča, da v delce vgradimo tudi zdravilne učinkovine (ZU). Na polnjenje takšnih poroznih delcev vplivajo tako lastnosti delcev kot ZU. *Iraji S.* je preučil, kako povečevanje koncentracije galne kisline v raztopini za vgrajevanje in čas inkubiranja vplivata na količino vgrajene ZU v mezoporozne nanodelce silike [5]. Galno kislino je v porozne nanodelce silike vgradil tako, da jo je raztopili v heksanu in delce inkubiral v raztopini galne kisline. Z daljšim časom inkubiranja se je v nanodelce vgradilo več galne kisline. Preskusil je 6 različnih raztopin s koncentracijo galne kisline od 1 mg/ml do 50 mg/ml. Ugotovil je, da količina vgrajene ZU preneha naraščati, ko koncentracija galne kisline v raztopini za vgradnjo v nanodelce doseže 40 mg/ml. To je pripisal interakcijam med površino delcev in ZU. Nanodelci so imeli na površini vezane proste amino skupine, ki z galno kislino, ta ima namreč v svoji strukturi hidroksilno in karboksilno skupino, tvorijo vodikove vezi. Avtor raziskave predvideva, da se je plato pri vgrajevanju ZU pojavil takrat, ko so bila vezavna mesta za ZU na površini delcev zasedena [5].

V naslednji raziskavi so raziskovalci primerjali dve različni metodi polnjenja mezoporoznih nanodelcev silike z ibuprofenom (IBU), ki so ga raztopili v heksanu. IBU je primerna molekula za vgrajevanje in prirejeno sproščanje, saj preko karboksilnih skupin tvori s silanolnimi skupinami na stenah por nanodelcev vodikove vezi [6]. Pri prvi metodi so delce inkubirali 24 ur v raztopini IBU v heksanu. S takšnim postopkom so vgradili 0,3 mg IBU/mg delcev. Napolnjene delce so nato prenesli v diske, ki so jih uporabili v nadaljnjih poskusih. Pri drugi metodi so diske napolnili s praznimi nanodelci in z raztopino IBU inkubirali celoten disk. Predvidevali so, da je postopek vgrajevanja ZU zaradi dodatne difuzijske bariere daljši, zato so si izbrali čas inkubiranja 72 ur. Tudi v tem primeru se je v delce vgradilo 0,3 mg IBU/mg delcev. Količina vgrajenega IBU se tako ni razlikovala med postopkoma, razlika pa se je pokazala pri sproščanju ZU iz diskov. Ugotovili so, da se je iz delcev, ki so bili napolnjeni po metodi 2, sprostil v 72 urah skoraj 100 % IBU, medtem ko se je iz delcev, ki so jih napolnili z metodo 1 v enakem časovnem obdobju sprostil le 80 % IBU. Razliko so pripisali stiskanju že napolnjenih delcev (metoda 1), ki zapre pore, pri metodi 2 pa se pore zaprejo že med stiskanjem praznih delcev, zato se ZU napolni le v proste pore. Ob sproščanju je tako difuzijska pot sproščanja enaka poti polnjenja, torej ni

novih blokiranih por. To kaže tudi na to, da je za sproščanje ZU pomembno, kdaj izvedemo polnjenje delcev, če tehnološki postopek izdelave farmacevtske oblike vključuje stiskanje delcev [6].

Poleg tega so želeli ovrednotiti še vpliv velikosti por na vgradnjo IBU. Najprej so sintetizirali delce, ki so imeli dva različna premera por – 2,5 nm in 1,8 nm. Ugotovili so, da se je v obeh primerih vgradila enaka količina IBU, zato so zaključili, da velikost por ne vpliva na količino vgrajene ZU. Velikost por prav tako ni signifikantno vplivala na hitrost sproščanja IBU iz nanodelcev. To so pripisali velikosti molekule, saj velikost IBU znaša le 1,0 nm x 0,6 nm [6].

Vpliv interakcije ZU z ogrodjem delcev na sproščanje so pokazali tudi *Zhang in sodelavci* [7]. V mezoporozne nanodelce iz silike so vgradili telmisartan, ki s silanolnimi skupinami na površini nanodelcev in v porah tvori šibke vodikove vezi. Za primerjavo so pripravili še delce, ki so jim na površino vezali aminopropilne skupine. Amino skupina na nanodelcih in karboksilna skupina telmisartana lahko tvorita močne elektrostatske vezi. Rezultati so potrdili povezavo med profilom sproščanja telmisartana in lastnostmi površine nanodelcev. Iz delcev z nespremenjeno površino (silanolne skupine na površini), se je v prvih 15 min sprostil 96 % ZU, kar je potrdilo tezo, da so vodikove vezi med ZU in nanodelci prešibke, da bi zadržale sproščanje. V primerjavi s profilom raztapljanja same ZU je bilo sproščanje ZU iz nanodelcev celo hitrejše, kar so znanstveniki pripisali dejstvu, da se je v delce vgradila amorfn oblika ZU, ki ima večjo hitrost raztapljanja kot kristalinična oblika [7].

V nasprotju s sproščanjem ZU iz osnovnih nanodelcev se je ZU iz nanodelcev s funkcionalizirano površino sproščala zadržano. Po 45 min se je iz delcev z aaminskimi skupinami na površini sprostil le 30 % ZU. Le-ta se je sproščala še nadaljnjih 24 ur. Sproščanje ustreza Higutchijski enačbi, saj je razmerje med sproščenim telmisartanom in kvadratnim korenem časa linearno [7].

V preglednici I smo zbrali literaturni pregled metod polnjenja nanodelcev mezoporozne silike z ZU. V vseh primerih so v porozne nanodelce silike ZU vgradili z inkubiranjem delcev v raztopini ZU. Najpogostejši čas inkubiranja je bil 24 ur [3, 4, 6, 7]. V primeru vgrajevanja telmisartana so vzorec med inkubiranjem še sonicirali, saj so s tem želeli povečati vgrajeno količino ZU [7]. Pri nekaterih metodah so po polnjenju tudi spirali površino nanodelcev [5, 8, 9]. Nanodelce, ki so jih inkubirali z galno kislino, so od medija ločili s centrifugiranjem in nato spirali z etanolom. Postopek spiranja so ponovili trikrat [5]. Delce z daunorubicinom so prav tako od medija ločili s centrifugiranjem, jih nato z

etanolom sprali trikrat in posušili pod znižanim tlakom [8]. Tudi delce s celastrolom so centrifugirali in spirali s cikloheksanom. V tej raziskavi je bil delež vgrajene ZU glede na maso delcev zelo majhen, saj je znašal le 3 %. Tak rezultat so raziskovalci pripisali funkcionalnim skupinam na površini. Nanodelci so imeli na silanolne skupine vezane sladkorje, ki so verjetno blokirali pore med polnjenjem [9].

**Preglednica I: Pregled metod polnjenja mezoporoznih nanodelcev iz silike z ZU in največji deleži vgrajene ZU.**

<i>(Modelna) ZU</i>	<i>Način polnjenja</i>	<i>Čas inkubiranja</i>	<i>Spiranje</i>	<i>Največji masni delež vgrajene ZU</i>	<i>Vir</i>
galna kislina	inkubiranje v raztopini ZU	24 in 48 ur	DA	0,46	[5]
IBU	inkubiranje v raztopini ZU	24 in 72 ur	NE	0,3	[6]
telmisartan	Inkubiranje v raztopini ZU in soniciranje	10 ur	NE	0,6	[7]
daunorubicin	inkubiranje v raztopini ZU	24 ur	DA	0,08	[8]
celastrol	inkubiranje v raztopini ZU	24 ur	DA	0,03	[9]

### 1.2.1. UPORABA MAGNETNIH NANODELCEV V BIOMEDICINI

Ena izmed najpomembnejših lastnost magnetnih delcev je, da delce lahko s pomočjo izmeničnega magnetnega polja (*angl. alternating magnetic field, AMF*) segrevamo. Temu pojavu pravimo **magnetna hipertermija**. Prve omembe zdravljenja s hipertermijo segajo presenetljivo daleč v zgodovino. Obstajajo zapisi, da so že prebivalci Starega Egipta tumorje zdravili s segretim palicami. Moderna znanost je uporabo hipertermije obudila v 60. letih prejšnjega stoletja, ko so raziskovalci opazili občutljivost presajenih mišjih tumorjev na povišano temperaturo [10].

Hipertermija je definirana kot zmeren dvig temperature nad telesno temperaturo [10]. Z uporabo hipertermije želimo doseči lokalno segrevanje tkiva, ki bi uničilo rakave celice in hkrati čim manj poškodovalo zdrave celice. Segrevanje bi lahko lokalno omejili tako, da bi za segrevanje uporabili magnetne delce, ki jih dostavimo v rakavo tkivo. Raziskovalci hipertermijo pogosto omenjajo kot komplementarno metodo k ustaljenim pristopom zdravljenja, saj bi tako lahko uničili tudi rakave celice, ki so odporne na kemoterapevtike in obsevanje. Smrt celic lahko povzroči izpostavitve temperaturam, ki so višje od 42 °C, njihovo preživetje pa je odvisno tako od temperature kot od časa izpostavitve povišani temperaturi. Kljub obširnimi raziskavam mehanizmi celične smrti še niso povsem poznani. Pri temperaturah, ki so nižje od 45 °C, je smrt celic posledica apoptoze, pri višjih

temperaturah pa nekroze. Slednji mehanizem nekateri raziskovalci imenujejo termoablacija, vendar pa ostre ločnice med hipertermijo in termoablacijo ni [10]. Apoptoza je posledica porušanja homeostaze, ki se zgodi zaradi denaturacije in agregiranja proteinov; spremeni se tudi viskoznost celičnih membran, kar spremeni transport snovi čez membrane. To bi lahko izkoristili za izboljšano dostavo ZU. Hipertermijo lahko uporabimo tudi za drugačen namen, in sicer lahko tumor segrevamo na nekoliko nižjo temperaturo (39-42 °C), kar poveča pretok krvi in oksigenacijo tumorja ter omogoča izboljšano dostavo ZU [10].

Obstaja tudi pojav pri uporabi hipertermije v terapiji, ki ga imenujemo *termotoleranca*. Če celice izpostavimo povišanim temperaturam v območju do 45 °C, se le-te na takšno okolje prilagodijo. Raziskovalci poročajo, da se lahko termotoleranca pojavi že po polurnem segrevanju tkiva. Običajno je le-ta odraz sinteze proteinov toplotnega šoka (*angl. heat shock proteins*, HSP), poleg tega pa se aktivira sinteza proteinov, ki jih celica potrebuje za okrevanje po izpostavitvi povišani temperaturi. HSP preprečujejo apoptozo in agregiranje proteinov ter pomagajo, da se proteini ponovno zvišejo v nativno konformacijo [10].

### 1.2.2. LASTNOSTI MAGNETNIH NANODELCEV ZA UPORABO PRI HIPERTERMII

Pri načrtovanju nanodelcev za uporabo pri hipertermiji je pomembno, da sintetiziramo magnetne nanodelce, ki omogočajo čim večjo specifično izgubo toplote (*angl. specific loss power*, SLP), saj je tudi največja količina delcev, ki jo lahko injiciramo, omejena. Eden izmed načinov, kako dosežemo optimalno segrevanje tkiva je, da imajo delci čim ožjo **porazdelitev velikosti**. Skupina raziskovalcev pod vodstvom *Gonzalesa-Weimullerja* je proučevala vpliv velikosti delcev na SLP [11]. Uporabili so nanodelce železovega oksida s premeri od 4,6 nm do 11,2 nm. Vzorce delcev so izpostavili AMF z amplitudami 12,4 - 24,5 kA/m. Ugotovili so, da se SLP poveča z večanjem amplitude magnetnega polja in da je odvisna tudi od premera delcev. Pri konstantni amplitudi magnetnega polja 24,5 kA/m so preverili vpliv velikosti delcev na SLP. Ugotovili so, da imajo največji SLP pri danih pogojih delci s premerom 12,5 nm. To sovпада z rezultati izračunov, saj je za dane pogoje največji izračunan SLP pri nanodelcih premera 11,2 nm in delci, pri katerih so določili največji SLP so bili po velikosti najbližji teoretični vrednosti optimalne velikosti delcev. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je SLP odvisna od premera delcev, zato lahko z ožanjem porazdelitve velikosti delcev povečamo SLP, prav tako pa si pri načrtovanju lastnosti delcev lahko pomagamo z matematičnimi izračuni [11].



Na segrevanje pod vplivom zunanjega magnetnega polja vpliva tudi **oblika delcev**. Raziskovalna skupina *Di Corata* je primerjala SLP delcev različnih oblik in različne zgradbe [12]. SLP delcev so raziskovali tudi v biološkem okolju celične linije raka jajčnikov. Preučevali so SLP delcev različnih velikosti delcev (od 10 nm do 25 nm), ki so bili različnih oblik in zgradb. Uporabili so maghemitne delce (sferični, kubični, večjedrni delci), sferične delce kobaltovega ferita in kompozitne nanodelce iz maghemita in zlata. Celice so najprej inkubirali s sferičnimi nanodelci maghemita in dve uri po dodatku delcev celicam merili SLP. Ta se je s časom zmanjševal, kar je pokazalo, da so vrednosti izmerjene v vodnem okolju drugačne od tistih, ki so jih izkazovali delci v biološkem okolju (celična kultura).

Nato so določili SLP za vse vzorce v vodnem okolju, na membrani celic in v celicah. Padec SLP ni bil odvisen od položaja delcev v celici, saj se je zmanjšal tako za delce na celični membrani kot tiste, ki jih je celica že privzela. Padec SLP je bil odvisen od oblike delcev, saj je bil najmanjši pri sferičnih maghemitnih delcih in kompozitnih delcih iz maghemita in zlata, kjer se je v obeh primerih zmanjšal za polovico glede na meritve v vodi. Največjo razliko so ugotovili za delce kobaltovega ferita in skupke maghemitnih delcev, kjer se je SLP zmanjšal za desetkrat. Raziskovalci zmanjšanje SLP pripisujejo povečanim interakcijam med delci, ki so v celicah združeni v veziklih in hkrati prisotni v celičnem okolju, ki je glede na vodo bolj viskozno [12]. Raziskovalci *Sadat et al.* so želeli interakcije med delci ovrednotiti tako, da so primerjali segrevanje samih delcev s segrevanjem delcev, ki so jih stabilizirali s poliakrilno kislino ali jih vgradili v polistirenski nosilec, s čimer so zagotovili majhne razdalje med delci. Ugotovili so, da se z zmanjšanjem razdalje med delci zmanjša SLP delcev. Razdalje med delci so raziskovalci zmanjšali tudi tako, da so povečali koncentracijo delcev v ferrofluidu. Tudi to je povzročilo zmanjšanje SLP [13].

Magnetni nanodelci lahko vstopijo tudi v celice, na kar vplivajo tako površinske lastnosti kot oblika delcev. Raziskovalci so sintetizirali maghemitne delce velikosti 30, 50, 70 in 120 nm, ki so jih prekrili s slojem silicijevega dioksida in opazovali njihovo sposobnost prehoda v celice. Njihove lastnosti so primerjali z lastnostmi delcev s premerom 20 nm in 50 nm, ki so imeli na površini vezan dekstran. Ugotovili so, da se je po 2 h inkubiranja velik delež delcev nahajal v celicah. Pregled pod elektronskim mikroskopom je pokazal, da so se delci nahajali v veziklih, kar kaže na aktiven privzem delcev v celice. Ugotovili so tudi, da obloga silike pripomore k večjemu privzemu delcev v celice [14].

### 1.2.3. HIPERTERMIJA Z MAGNETNIMI NANODELCI NA CELIČNIH IN ŽIVALSKIH MODELIH

Magnetne delce je velika večina raziskovalcev v tumorje injicirala. Cilj razvoja magnetnih nanodelcev pa je, da bi nanodelce s pomočjo magnetnega polja lahko vodili do tumorjev, kjer bi nato vstopili v celice. Dostavni sistemi, ki so jih raziskovalci uporabljali za vnos magnetnih nanodelcev, in nato opazovali njihov učinek na zmanjševanje velikosti tumorjev, so zelo raznoliki. Ena izmed zanimivejših idej je vgradnja ferrofluida v implantat, ki nastane *in situ* po injiciranju formulacije v tumor. Tak pristop je primeren predvsem za tumorje blizu površine telesa, ker so le-ti za injiciranje lahko dostopni. Implantati so primerna rešitev tudi zato, ker lahko z njihovo uporabo povzročimo embolijo in tako prekinemo dotok krvi v tumorsko tkivo, hkrati pa lahko na mestu implanta z uporabo AMF povzročimo lokalno segrevanje tkiva [15].

Z magnetno hipertermijo lahko nadzorujemo tudi sproščanje ZU. ZU lahko vgradimo v trdne lipidne nanodelce v katere smo vgradili magnetne nanodelce. Magnetni nanodelci, ki jih izpostavimo AMF, povzročijo segrevanje trdnih lipidnih nanodelcev, kar povzroči taljenje lipidov in omogoči difuzijo ZU iz delcev. Raziskava je pokazala, da so takšni nanodelci biokompatibilni, saj niso povzročili hemolize ter aktivacije trombocitov in komplemента; pokazali so tudi, da s pomočjo hipertermije pa celice tudi ubijamo. Trdni lipidni nanodelcih iz gliceriltrimiristata so imeli v jedru vgrajene nanodelce železovega oksida. V poskusu na celični liniji raka debelega črevesja so ugotovili, da je po izpostavitvi hipertermiji preživelo le 52 % celic v primerjavi s kontrolnimi vzorci celic, ki so jih inkubirali le z nanodelci [16].

Obstaja pa že kar nekaj študij na živalskih tumorjih, kjer so takšne nanodelce injicirali v tumorje. *Dennis s sodelavci* je mišim injiciral magnetne nanodelce v tumorje raka prsi in proučeval učinkovitost zdravljenja s hipertermijo [13]. Rezultati, ki so zbrani v preglednici II, so pokazali, da z naraščanjem amplitude AMF raste tudi maksimalna temperatura ( $T_{\max}$ ) v tumorjih, ki zavre njihovo rast.

Preglednica II: Rast tumorja brez in z izpostavitvijo magnetni hipertermiji [13].

Amplituda AMF [kA/m]	Čas izpostavitve pogojem hipertermiji [min]	Odmerek injiciranih delcev $4,98 \text{ mg/cm}^3$	$T_{\max}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Čas, v katerem se je velikost tumorja podvojila (dan)
31,8	15	DA	$37 \pm 1$	$4 \pm 2$
43,8	15	DA	$47 \pm 3$	$10 \pm 6$
55,7	10	DA	$52 \pm 3$	$50 \pm 15$
43,8	20	NE	$40 \pm 2$	$5 \pm 2$
0	0	NE	/	$2,3 \pm 0,7$

Tudi izpostavitve tumorjev samemu magnetnemu polju je zavirala rast tumorjev, za kar so vzrok vrtilni tokovi v tkivu, ki nastanejo zaradi visoke amplitude AMF. To povzroči nespecifično in neželeno segrevanje tkiv. Takšno segrevanje je nasprotno temu, kar želimo doseči z magnetnimi nanodelci. Rezultati kažejo, da je uporaba hipertermije smotrni pristop k zdravljenju rakavih obolenj, vendar morajo imeti delci visok SLP, ki omogoči zadostno lokalno segrevanje tkiva, saj je zaradi nespecifičnega segrevanja tkiv pri izpostavitvi AMF povečevanje amplitude AMF omejeno [17].

*Du in sod.* so preverjali, kakšen je vpliv hipertermije na rast jetrnih tumorjev pri kuncih [18]. Magnetitne nanodelce z nespremenjeno površino, premerom 10 nm in s koncentracijo 100 mg/ml so injicirali v tumor jeter. Želena temperaturo so dosegli po 5-10 min in nato tumor segrevali nadaljnjih 30 min. Velikost tumorja so merili 14 in 28 dni po injiciranju delcev. Spremljali so tudi temperaturo in ugotovili, da je temperatura na robu in v sredici tumorja hitro porasla; temperatura pa je narasla tudi 1 cm od roba tumorja v zdravem tkivu, vendar je bila le-ta še vedno 10 stopinj nižja od tiste v tumorju. Kljub temu je tak dvig temperature v zdravem tkivu lahko nevaren za zdrave celice, saj lahko povzroči nekrozo zdravih celic. Prvi in zadnji dan poskusa so preverili tudi lokacijo delcev. Ugotovili so, da so ostali v jetrih in niso potovali po telesu. Kot je razvidno iz rezultatov strnjenih v preglednici III, je hipertermija povzročila nekrozo tumorskega tkiva in enakomerno razporeditev delcev v tumorju. Zdravljenje s hipertermijo je bilo še posebej učinkovito, ko so ga po petih dneh ponovili, saj je bila nekroza tumorskega tkiva v tem primeru skoraj popolna [18].

**Preglednica III: Vpliv magnetnih nanodelcev na tumorje jeter kunccev [18].**

Injicirana tekočina	AMF, 30 min	Razporeditev delcev	Nekroza tumorskega tkiva
Fiziološka raztopina	NE	/	Minimalna
Magnetna tekočina	NE	Večji skupki	Minimalna
Magnetna tekočina	DA - takoj po injiciranju	Manjši skupki	Večja področja nekroze
Magnetna tekočina	DA -takoj po injiciranju in čez 5 dni	Homogeno porazdeljeni skupki	Skoraj popolna nekroza tkiva

V naslednji študiji so na mišjem modelu preskusili učinkovitost injiciranih delcev na rast tumorjev malignega melanoma. Nanodelce so vgradili v liposome s pozitivnim nabojem, ki imajo desetkrat večjo afiniteto za vstop v tumorske celice v primerjavi z liposomi brez naboja, saj je naboj celičnih membran negativen. Z enako vrsto delcev je druga skupina raziskovalcev *in vitro* dokazala, da povišanje temperature povzroči smrt celic in indukcijo

imunskega sistema, rezultate pa so preveriti tudi *in vivo*. Poskus so izvajali na štirih skupinah miši. V vsaki skupini je bilo deset živali. Opazovali so tudi temperaturo v zdravem tkivu 0,5 cm od roba tumorja in ugotovili, da je temperatura pri segrevanju tumorja na 46 °C narasla do 37 °C, kar je za zdravljenje sprejemljivo. Ugotovitve so zbrane v preglednici IV [19].

Preglednica IV: Vpliv magnetne hipertermije rast tumorjev in sintezo HSP [19].

Skupina živali	MAGNETNO POLJE	RAST TUMORJEV	ŽIVE ŽIVALI PO 120 DNEH	HSP [ng/mg tumorskega tkiva]
	Tarčna temperatura [°C]			
I	/	Linearna	0 (vse mrtve po 30 dneh)	0,17 ± 0,06
	/			
II	DA, 30 min	7 dni zavrta rast tumorjev, nato linearna	0 (vse mrtve po 40 dneh)	1,6 ± 0,2
	43 °C			
III	DA, 30 min	4/10 miši brez tumorjev, ostale različna rast	3	1,3 ± 0,1
	46 °C			
IV	DA, 30 min 5. dan dodatno injiciranje in hipertermija	9/10 miši brez tumorjev	6	/
	46 °C			

Študija je še posebej zanimiva, ker so opazovali tudi izražanje HSP, ki je bilo največje pri segrevanju tumorjev na 43 °C. Rezultat kaže, da je bila vzrok celične smrti pri segrevanju tumorja na 46 °C nekroza, saj HSP izražajo še žive celice v boju proti povišani temperaturi. Rezultati tudi dokazujejo, da je termotoleranca pojav, ki lahko zmanjša učinkovitost zdravljenja [19].

Glede na izsledke predhodnih raziskav so preverili tudi, ali zdravljenje s hipertermijo spodbudi delovanje imunskega sistema. Živalim, ki so v poskusih iz preglednice IV preživele, so ponovno implantirali rakave celice. Rakave celice pa so vsadili tudi skupini živali brez raka, ki niso sodelovale v predhodni raziskavi. Opazovali so razvoj tumorjev v obeh skupinah. Po šestih dneh so se pri vseh prej zdravih živalih razvili tumorji, medtem ko je 66 % že predhodno ozdravljenih živali zavrnilo tumorske celice. Te živali tudi po enem mesecu niso razvile tumorjev, kar potrjuje njihovo hipotezo, da imunski sistem po ozdravitvi prepozna celice malignega melanoma in jih učinkovito odstrani [19].

#### 1.2.4. KLINIČNE ŠTUDIJE IN UPORABA HIPERTERMJE PRI LJUDEH

Spodbudni rezultati študij na živalih so prinesli tudi klinične študije in celo prva zdravljenja z magnetno hipertermijo. Hipertermija ni nov način zdravljenja, saj

raziskovalci in zdravniki že dlje časa uporabljajo za segrevanje tumorjev aplikatorje, ki s pomočjo elektromagnetnega valovanja dovedejo energijo in tako segrevajo področje tumorja. Zelo pogosto omenjajo uporabo hipertermije za zdravljenje raka dojk. Nizozemski raziskovalci so spremljali 248 bolnic z recidivnim rakom dojk, ki ga ni bilo mogoče operirati. Rezultati zdravljenja s hipertermijo so bili nekoliko slabši kot pri danes uveljavljenem operativnem zdravljenju, vendar se zapleti po operativnem zdravljenju pojavijo pri 41 % bolnikov. Prednost uporabe hipertermije so bili zelo blagi neželeni učinki. Predvsem je segrevanje povzročilo opekline in to kar pri 57 bolnikih od 248. Trije od njih so imeli tudi subkutane opekline, vendar so se vse pozdravile spontano [20].

V zadnjih letih pa so se pojavile že prve klinične študije, v katerih so za segrevanje tumorjev uporabili magnetne nanodelce. V vseh kliničnih študijah z magnetnimi nanodelci so uporabili delce istega nemškega proizvajalca, ki se že uporabljajo za zdravljenje in so registrirani kot medicinski pripomoček [21, 22, 23]. Delci so sestavljeni iz treh glavnih komponent: magnetitnega jedra, ki je obdano z oblogo iz silicijevega dioksida, ta pa ima na površini vezane aminske skupine. Premer delcev v vseh zgoraj omenjenih raziskavah je znašal 12-15 nm, koncentracija železa v ferrofluidu pa je bila 112 mg/ml. Prav tako so vsi uporabili isto frekvenco magnetnega polja (100 kHz), temperaturo pa so uravnavali s spremembo amplitude magnetnega polja.

Podjetje MagForce® med drugim izvaja klinične študije za zdravljenje raka prostate. 10 pacientov s ponovitvijo raka prostate se je odločilo, da bodo sodelovali v klinični študiji faze I. Ferrofluid so pacientom injicirali v prostato skozi presredek, termoterapijo pa so izvedli šestkrat s tedenskimi razmiki. Med zdravljenjem so v tumorju želeli doseči temperature v območju 42–46 °C. Za zdravljenje so uporabljali amplitude magnetnega polja med 4 kA/m in 5 kA/m, ki so jih bolniki še lahko prenašali, medtem ko so večje amplitude in s tem višje temperature povzročile pekoč občutek ali topo bolečino v območju presredka in dimelj. Prav tako se je v tem predelu pri nekaterih pacientih temperatura na površini kože dvignila vse do 44 °C. Določili so tudi čas v katerem je bilo več kot 90 % prostate podvržene temperaturi 43 °C ali več, saj je pri hipertermiji pomemben čas izpostavitve tkiva povišani temperaturi. Ta čas se je zelo razlikoval od pacienta do pacienta, povprečen čas je znašal 7,8 min, variiral pa je vse od 3,5 min do 136,4 min. Rezultati kažejo, da je bila temperatura tkiva zelo heterogena in večinoma veliko nižja, kot je bilo želeno in potrebno [21].

Še večji del raziskav pa je usmerjen na področje možganskega raka, glioblastoma multiforme, ki je zelo hitro napredujoč in zelo težko ozdravljiv. Pri novo odkritem raku zdravljenje poteka po ustaljenem postopku, saj gre za operativno odstranitev tumorja, obsevanje in sočasno dajanje temozolomida. Pri ponovnem pojavu tumorja se zdravljenje razlikuje od primera do primera, saj ni uveljavljenih smernic. Nemški raziskovalci so izvajali klinično fazo II na treh bolnikih za zdravljenje glioblastoma tako, da so magnetne delce injicirali v tumor ob sočasni kemoterapiji ali obsevanju. Delce so injicirali na več mest, da so dosegli čim bolj homogeno razporeditev delcev v tumorskem tkivu. Po smrti so paciente pregledali in ugotovili, da so se nanodelci zadržali na mestu injiciranja, okrog njih pa je bilo nekrotično področje. Magnetni nanodelci so se večinoma nahajali v makrofagih in manj v celicah tumorja, kar kaže, da je vstop delcev v tumor omejen. Pri dveh sta bili najvišji izmerjeni temperaturi med zdravljenjem 49,5 °C in 65,6 °C, eden pacient pa je med študijo zaradi bolezni umrl [22].

Predstavili so tudi rezultate drugega dela klinične faze II zdravljenja glioblastoma z magnetnimi nanodelci, ki so ga izvedli na 59 pacientih. V raziskavi so obsevanje združili z dodatnimi šestimi zdravljenji z enourno hipertermijo dvakrat tedensko. Glede na volumen tumorja so injicirali od 0,5 ml do 11,6 ml (povprečno 4,5 ml) magnetne tekočine, kar povprečno znese 0,28 ml ferofluida na cm<sup>3</sup> tumorja. Srednja temperatura med zdravljenjem je znašala 51,2 °C in maksimalna 82 °C [23].

Kot primarnega pokazatelja učinkovitosti klinične študije so določili preživetje po diagnozi prve ponovitve bolezni. Z dodatno uporabo hipertermije so preživetje izboljšali iz 6,2 meseca na 13,4 mesecev. Sekundarni pokazatelj učinkovitosti zdravljenja je bilo preživetje po prvi diagnozi tumorja. Ta je s 14,6 mesecev ob sočasni uporabi magnetnih nanodelcev narasla na 23,2 mesecev. Ugotovili so, da na primarni pokazatelj učinkovitosti zdravljenja signifikantno vpliva samo velikost tumorja ob vstopu v zdravljenje in ne lokacija ali prejšnja zdravljenja [23].

Opazovali so tudi neželene učinke, ki so navedeni v preglednici V. Glavoboli so bili blagi in so izzveneli po koncu terapije razen pri treh bolnikih, pri katerih so morali terapijo zaradi bolečin prekiniti. Zaradi pojava krčev predlagajo, da bi terapijo kombinirali z uporabo antiepileptikov, saj so epiletični napadi pri bolnikih z možganski tumorji pogosti. Samo dvema (3,0 %) so se napadi krčev ali motorične motnje med časom terapije pojavili prvič, tako da so zaključili, da so bolniki terapijo dobro prenašali [23].

Nemško podjetje MagForce® zdravljenje z magnetnimi nanodelci izvaja v petih nemških klinikah, imajo pa dovoljenje za zdravljenje na območju Evropske unije. Izvajajo tudi novo klinično študijo, ki primerja učinkovitost monoterapije z nanodelci s kombinacijo z obsevanjem pri bolnikih s ponavljajočim glioblastomom. Ta raziskava je v teku, vanjo pa je vključenih 269 pacientov [24].

Preglednica V: Neželjeni učinki, ki so se pojavili ob zdravljenju možganskega tumorja z magnetno hipertermijo.

Neželjeni učinek	POGOSTOST
Znojenje med terapijo	33 (50 %)
Občutek toplote na mestu nanodelcev	31 (47 %)
Krči	15 (22,7 %)
Motorične motnje	14 (21,2 %)
Tahikardija	12 (18,2 %)
Spremembe krvnega tlaka	10 (15,1 %)
Hipotonija	7 (10,6 %)
Hipertonija	3 (4,5 %)
Glavobol	9 (13,6 %)
Telesna temperatura preseže 38 °C	6 (9,1 %)

### 1.3. MAGNETNO USMERJANJE NANODELCEV

Poleg uporabe v magnetni hipertermiji lahko magnetne lastnosti delcev izkoristimo tudi za njihovo magnetno usmerjanje [25]. Delci se pri pasivnem ciljanju zadržijo na mestu tumorja, ker ima slednji hitro rastoče žilje, to povzroči nastanek defektov v zgradbi žilne stene, poleg tega je okrnjena tudi limfna drenaža v območju tumorja, kar delcem omogoča povečan prehod in zadrževanje v tumorju. Temu pojavu pravimo učinek povečane prepustnosti in zadrževanja. Število raziskav pri katerih so tumorje ciljali s pomočjo magnetnega polja je zelo majhno in omejeno na živalske modele [26]. Pri usmerjanju igra ključno vlogo velikost delcev, saj se z magnetnim usmerjanjem večji delci zaradi večje magnetne odzivnosti lažje gibljejo nasproti toku krvi. Skupki magnetnih nanodelcev s premerom do 1  $\mu\text{m}$  se pri tem odrežejo še posebej dobro [3].

Razliko med pasivnim, aktivnim in magnetnim ciljanjem tumorjev je proučeval *Schleich s sodelavci* [26]. Magnetne nanodelce so vgradili v večje polimerne delce in zraven vgradili še paklitaksel (PTX). Aktivno ciljanje so dosegli z vezavo liganda na površino delcev, ki je prepoznal specifično molekulo/makromolekulo na površini rakavih celic. V omenjeni študiji so raziskovalci vezali tripeptid arginin-glicin-asparaginska kislina (RGD) na delce, ki so tako prepoznali integrin  $\alpha_v\beta_3$ , ki je prekomerno izražen na površini endotelija novonastalega tumorskega žilja ter na površini tumorskih celic. Preverili so tudi, ali

magnetno usmerjanje delcev v tumor s stalnim magnetnim poljem poveča nalaganje delcev v tumorju.

Ugotovitve, ki so zbrane v preglednici VI, kažejo, da so delci s PTX učinkovito zavirali rast tumorjev. Vsi delci, ki so aktivno ali magnetno ciljali tumor, so bili bolj učinkoviti od pasivnega ciljanja. Razlike v učinkovitosti med aktivnim ciljanjem na tarčne molekule in magnetnim ciljanjem so bile zelo majhne. Ko so skupaj uporabili oba pristopa ciljanja, je bil čas preživetja najdaljši. Tako so sklenili, da je sočasna uporaba aktivnega in magnetnega ciljanja obetaven pristop za zdravljenje tumorjev [26].

Preglednica VI: Primerjava učinkovitosti različnih načinov ciljanja tumorjev na mišjem modelu raka debelega črevesa [25].

Skupina miši (6 živali)	Sestava formulacije	Povprečni čas preživetja od začetka zdravljenja [dan]
Kontrolna skupina	Fosfatni pufer in delci z magnetnimi jedri.	10
Pasivno ciljanje	V delcih vgrajen PTX in magnetna jedra.	13
Aktivno ciljanje	V delcih vgrajen PTX in magnetna jedra, dodatno na površin RGD peptid.	14,7
Magnetno ciljanje*	V delcih vgrajen PTX in magnetna jedra.	15
Aktivno in magnetno ciljanje*	V delcih vgrajen PTX in magnetna jedra, dodatno na površin RGD peptid.	21,5

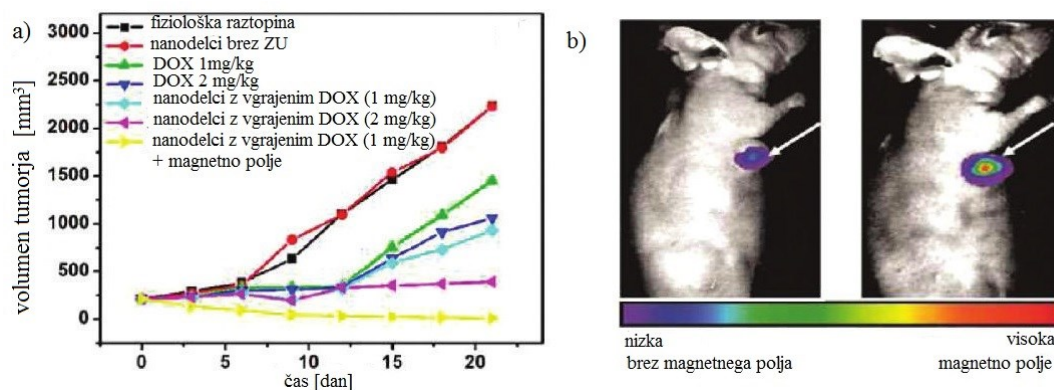
\* ciljanje z vzpostavitvijo magnetnega polja z uporabo magneta nad tumorjem)

V podobni študiji so *Zhang in sodelavci* delce s pomočjo permanentnega magneta usmerili na mesto tumorja [27]. Sintezirali so mezoporozne hidrofilne nanodelce, ki so imeli v votli notranjosti prostor za ZU in manjše nanodelce magnetita, ki so bili obdani z oblogo iz silicijevega dioksida. Naprej so na celični liniji določili vrednosti IC<sub>50</sub> doksorubicina (DOX) v različnih formulacijah, s katero so želeli ovrednotiti razlike v koncentraciji DOX, ki je zavrl rast celic hepatocelularnega raka za polovico (IC<sub>50</sub>). Ugotovili so, da je IC<sub>50</sub> samega DOX 0,7 µg/ml, v nanodelcih pa se je le-ta zmanjšala na 0,25 µg/ml, z izpostavitvijo magnetnemu polju pa je padla na 0,12 µg/ml. Iz IC<sub>50</sub> vrednosti vidimo, da lahko s spremembo dostavnega sistema izboljšamo učinkovitost zdravljenja. Večjo učinkovitost DOX v nanodelcih so pripisali temu, da se je ZU sproščala prirejeno. Izboljšanje je bilo še bolj očitno pri izpostavitvi magnetnemu polju, ki je pomagalo pri specifičnem nalaganju delcev v tumorju.

Učinkovitost zdravljenja so nato preverili še *in vivo* na miših, ki so jim na bok vsadili hepatocelularne tumorje. Proučevali so dveh odmerkov DOX in kot referenčni formulaciji uporabili fiziološko raztopino in nanodelce brez ZU. ZU so tudi vgradili v nanodelce, ki so



jih s pomočjo magneta usmerili na mesto tumorja. Rezultati so prikazani na sliki 1 in kažejo, da lahko magnetne nanodelce z magnetom učinkovito zadržimo na mestu tumorja in hkrati izboljšamo učinkovitost zdravljenja [27].



Slika 1: Učinkovitost zdravljenja (vpliv na velikost tumorja) z DOX v različnih odmerkih in različnih formulacijah ter vpliv magnetnega ciljanja, b) vpliv magnetnega polja na lokacijo delcev v organizmu. Povzeto po: Zhang s sod. [26].

## 2. NAMEN DELA

Magnetni nanodelci predstavljajo aktualno, a še zelo neizkoriščeno področje, ki bi pri zdravljenju lahko prineslo veliko prednosti, kot je npr. izboljšanje učinkovitost zdravljenja rakavih bolezni. Namen magistrske naloge je pripraviti porozne magnetno odzivne nanodelce in razviti metodo vgrajevanja modelne ZU v takšne nanodelce. Izhajali bomo iz komercialno dostopnih delcev iNANOvative™, ki so skupki superparamagnetnih nanodelcev maghemita obdani s porozno oblogo iz silicijevega dioksida. V prvem delu raziskav bomo z metodo delnega raztapljanja maghemita v strukturi iNANOvative™ pripravili delno votle, a magnetno odzivne nanodelce. Tako bomo znotraj delcev pripravili prostor za vgrajevanje učinkovine. V naslednjem koraku bomo razvili metodo polnjenja votlih magnetno odzivnih nanostruktur z izbrano težko topno modelno ZU (karvedilol (KAR) ali IBU). ZU bomo raztopili v zmesi tetradekanola in etanola ter ugotovljali vpliv sestave tako pripravljene raztopine na vgrajevanje ZU v nanodelce. V zadnjem delu raziskav bomo proučili profil sproščanja vgrajene ZU in vpliv koncentracije ZU v izhodni etanolni raztopini na njeno vgradnjo ZU v nanodelce.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

- *Klorovodikova kislina* (37 %, analitska čistost, Merck, Nemčija)
- *Etanol* (absolutni)
- *Tetradekanol* (97 % 1-tetradekanol, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija)

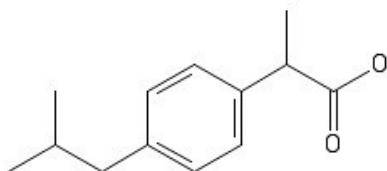
Tetradekanol ali miristol alkohol je pri sobni temperaturi trdna snov, ki smo jo uporabili kot (so)topilo za ZU. Izbrali smo ga zato, ker ima temperaturo tališča 37-39 °C in raztaplja veliko težko topnih ZU. Uporabili smo tetradekanol, ki je bil v obliki belih pelet. Molekulsko formulo tetradekanola prikazuje slika 2 [28].



Slika 2: Strukturna formula tetradekanola.

- *Ibuprofen* (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija)

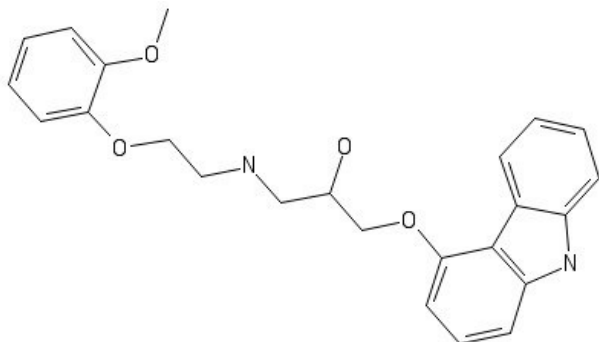
IBU je nesteroidna protivnetna ZU, ki je slabo topna, a ima dobro sposobnost prehajanja bioloških membran, zato jo po biofarmaceutskemu klasifikacijskem sistemu uvrščamo v razred II. Topnost IBU v prečiščeni vodi znaša 56 mg/l [29]. Strukturno formulo IBU prikazuje slika 3.



Slika 3: Strukturna formula IBU.

- Karvedilol (Krka d.d., Novo mesto, Slovenija)

KAR je neselektivni zaviralec receptorjev beta, ki se uporablja pri zdravljenju hipertenzije, angine pektoris in kroničnega srčnega popuščanja. Topnost KAR je močno odvisna od pH; pri nevtralnem pH znaša 23 mg/l [30]. Strukturno formulo KAR prikazuje slika 4.



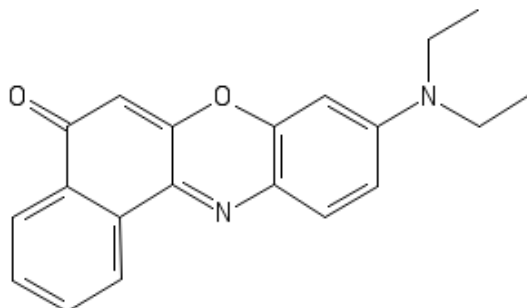
Slika 4: Strukturna formula KAR.

- iNANOvative™ (datum priprave: 15. 3. 2015)

Magnetni nanodelci iNANOvative™ so sestavljeni iz magnetnega jedra in obloge iz silicijevega dioksida. Magnetno jedro predstavlja večje število posameznih 10 nm maghemitnih nanodelcev [31]. Delci iNANOvative™ so dispergirani v prečiščeni vodi in imajo nespremenjeno površino, zato imajo na površini izpostavljene silanolne skupine [32]. Povprečna velikost delcev z oblogo iz silicijevega dioksida določena s presežno elektronsko mikroskopijo je 120 nm, masna koncentracija delcev v osnovni disperziji pa 5 mg/ml [33].

- Flourescentno barvilo Nile Red

Barvilo Nile Red je hidrofobno barvilo, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 553 nm. Uporablja se tudi za označevanje intracelularnih lipidov in hidrofobnih lipidnih domen [34]. Strukturno formulo barvila prikazuje slika 5.



Slika 5: Strukturna formula barvila Nile Red.

### 3.2. LABORATORIJSKI PRIBOR

- viala (5 ml, 20 ml)
- bučke (10 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml)
- steklene pipete (0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)
- mehanske pipete Biohit (10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l in 1000-5000  $\mu$ l) (Biohit, Finska)
- nastavki za pipete (Biohit, Finska)
- mikrocentrifugirke (1,5 ml, 3,0 ml)
- centrifugirke (10 ml, 50 ml)
- merilni valj (50 ml)
- štoparica
- tehtalni čolniček
- magneti za magnetna mešala
- prijemalka za epruvete
- plastične kapalke (5 ml)

### 3.3. APARATURE

- precizna tehtnica Mettler Toledo XS205 dual range (Mettler Toledo, Švica)
- centrifuga Centric 332 A (Iskra, Železniki, Slovenija)
- UV-VIS spektrofotometer Hewlett Packard 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA)
- ultrazvočna kopel Iskra Sonis 4 (Iskra, Železniki, Slovenija)
- vibracijsko mešalo Vibramix10 Vortex (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- ultracentrifuga Sorvall® WX 100 (Waltham, Massachusetts, ZDA)
- magnetno mešalo IKA RCT basic (IKA WERKE, Staufen, Nemčija)
- Stresalnik Vibromix 10 Vortex (Domel, Železniki, Slovenija)

### 3.4. METODE

#### 3.4.1. PRIPRAVA DELNO VOTLIH MAGNETNO ODZIVNIH NANODELCEV

Iz osnovne disperzije delcev iNANOvative™ smo z dodatkom koncentrirane klorovodikove kisline raztopili del magnetnih jeder, ki se nahajajo v notranjosti delcev.

V prvih dveh poskusih smo spreminjali pogoje delnega raztapljanja magnetnih jeder delcev tako, da smo spreminjali koncentracijo HCl:

- 3 ml suspenzije delcev smo dodali 2 ml koncentrirane HCl in inkubirali 4 min ali
- 3 ml suspenzije delcev smo dodali 3 ml koncentrirane HCl in inkubirali 3 min.

Vse vzorce, ki smo jih uporabili za vrednotenje sproščanja ZU, pa smo pripravili po naslednjem postopku:

- 3 ml suspenzije delcev smo dodali 3 ml koncentrirane HCl in inkubirali 2 min 30 s.

Delno raztapljanje delcev smo izvajali v digestoriju, zaščiteni s primerno zaščitno opremo (očala in rokavice) tako, da smo v 50 ml centrifugirko z mehansko pipeto odmerili 3 ml

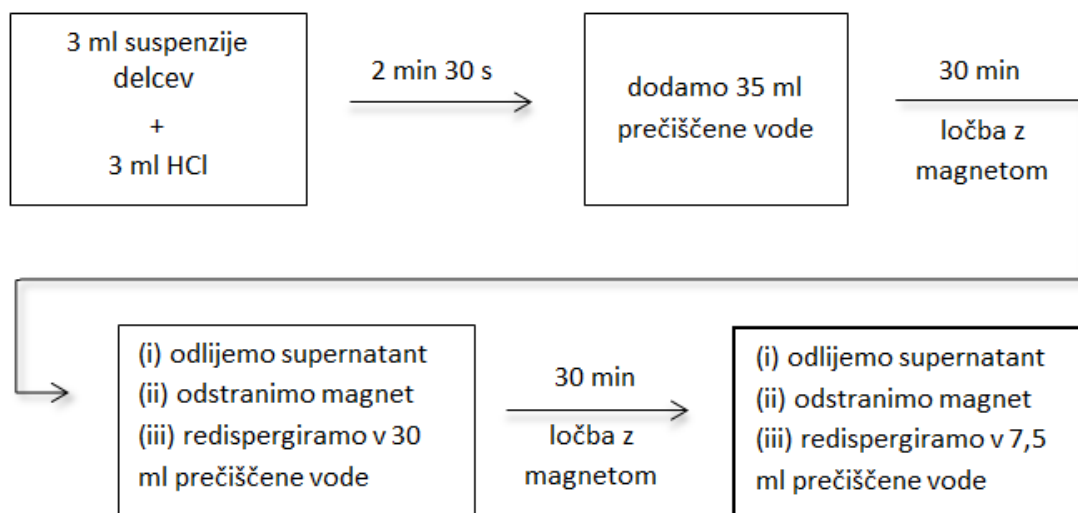


Slika 6: Ločba delno votlih superparamagnetnih nanodelcev od disperznega medija v magnetnem polju.

suspenzije delcev iNANOvative™ in ji dodali 3 ml koncentrirane HCl. Po predhodno določenem času smo z merilnim valjem v centrifugirko dodali 35 ml prečiščene vode in suspenzijo rahlo premešali. Delce smo nato s pomočjo magneta zbrali ob robu centrifugirke (slika 6). Magnet je bil dovolj močan, da je delce zadržal ob robu centrifugirke in omogočil ločbo supernatanta od delcev brez večjih izgub delcev.

Po pol ure ločevanja v magnetnem polju smo supernatant odlili v poseben odpad, magnet odstranili in delce sprali tako, da smo jih ponovno suspendirali v 30 ml prečiščene vode ter jih znova zbrali ob robu vsebnika. Po odstranitvi supernatanta smo zbrane delce redispersgirali v 7,5 ml prečiščene vode. Te vzorce smo nato uporabljali v nadaljnjih poskusih. Za poskuse vgrajevanja in sproščanja modelne učinkovine smo pripravili tri paralelke izpraznjenih delcev, dobljene vzorce pa smo nato združili in homogeno pomešali. Shema postopka priprave

vzorcev je prikazana na sliki 7. Vse različice postopka delnega raztapljanja delcev so prikazane v preglednici VII.

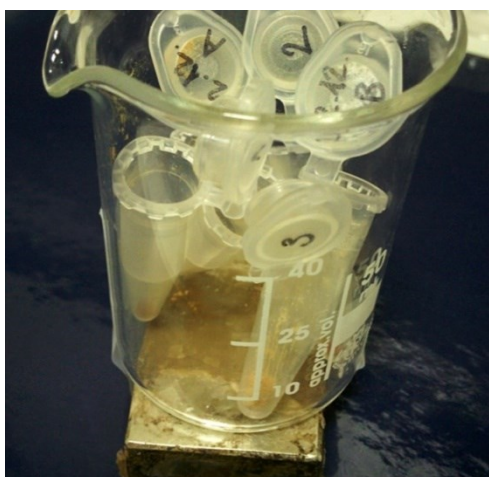


Slika 7: Postopek priprave delno votlih superparamagnetnih nanodelcev.

Preglednica VII: Pogoji priprave delno votlih superparamagnetnih nanodelcev.

Vzorec	Volumen disperzije izhodnih nanodelcev	Volumen koncentrirane HCl	Čas inkubiranja
1	3 ml	2 ml	4 min
2	3 ml	3 ml	3 min
3	3 ml	3 ml	2,5 min
4	3 ml	3 ml	2,5 min
5	3 ml (3 paralelke)	3 ml	2,5 min

### 3.4.2. DOLOČANJE MASNE KONCENTRACIJE DELNO VOTLIH SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV



Slika 8: Postavitev vzorcev med liofilizacijo.

Masno koncentracijo delcev v vzorcih smo določili s pomočjo liofilizacije, tako da smo 500  $\mu$ l ali 250  $\mu$ l alikvote vzorca s pipeto odmerili v mikrocentrifugirke in jih postavili v čašo tako, da vsebina ni iztekla, kot je to prikazano na sliki 8. Nato smo čašo z mikrocentrifugirkami prenesli v zamrzovalnik, kjer je bila temperatura  $-22$  °C. Ko so vzorci zmrznili ( $\sim 2$  h), smo jih prenesli v liofilizator. Pod čašo smo podstavili magnet, ki je

delce med sušenjem zadržal v mikrocentrifugirkah. Liofilizacija je potekala čez noč, tako da je faza sušenja trajala okrog 16 ur.

Liofilizirali smo naslednje vzorce:

- Vzorce 1, 2 in 5 z delno raztopljenim magnetnim jedrom (500 µl),
- Vzorec 5, ki smo ga sprali in sčistili kot v procesih polnjenja (250 µl).

Masno koncentracijo delcev smo določili na podlagi poskusa v treh paralelah. Najprej smo označili mikrocentrifugirke in jih stehali. Nato smo vanje odmerili 500 µl (masa delcev z delno raztopljenim magnetnim jedrom vzorca 5) ali 250 µl (vpliv procesov čiščenja in polnjenja na maso delcev) vzorca in izvedli liofilizacijo. Naslednji dan smo mikrocentrifugirke stehali in gravimetrično določili spremembo mase. S pomočjo te informacije smo izračunali maso delcev v ml vzorca.

### *3.4.3. VGRAJEVANJE BARVILA V VOTLE NANODELCE*

#### Vgrajevanje barvila v nanodelce brez magnetnega jedra

Da bi ugotovili, če s postopkom inkubiranja v raztopini modelne snovi v nanodelce lahko vgradimo želeno snov, smo delce inkubirali v raztopini barvila in tako vizualno preverili, če je to mogoče. V 10 ml centrifugirko smo natehtali 10 mg liofiliziranih votlih nanodelcev silicijevega dioksida, ki so bili brez magnetnega jedra. Liofiliziranim nanodelcem smo s pomočjo pipete dodali 20 µl raztopine barvila Nile Red in jih 10 min inkubirali na povišani temperaturi. To smo storili tako, da smo segreto vodo nalili v 100 ml čašo in centrifugirko tesno zaprli ter vpeli v držalo. Zmes barvila in delcev smo po 10 min sprali s 5 ml 60 % EtOH. Nanodelce smo nato ločili od medija s pomočjo centrifugiranja pri 1500 rpm 6 min. Po ločbi delcev od medija smo jih ponovno sprali s 60 % EtOH in centrifugirali pri enakih pogojih. Naodelce smo nato še dodatno 5 min segrevali na vodni kopeli, saj smo s tem želeli preveriti, ali bo povišana temperatura povzročilo dodatno sproščanje barvila. Ob vsakem opravljenem koraku smo opazovali barvo nanodelcev in supernatanta. Po ponovnem centrifugiranju smo delce redispergirali v 1,5 ml vode in jih opazovali.

#### Vgrajevanje barvila v magnetno odzivne nanodelce

Odmerili smo 500 µl liofiliziranih nanodelcev vzorca 2 z delno raztopljenim magnetnim jedrom. Postopek polnjenja z barvilom je bil enak kot pri delcih brez magnetnega jedra, le da smo namesto ločbe s centrifugiranjem uporabili postopek ločevanja v magnetnem polju, saj so bili nanodelci magnetno odzivni.

#### *3.4.4. PROUČEVANJE TOPNOSTI TETRADEKANOLA V ETANOLNO-VODNIH RAZTOPINAH*

Tetradekanol smo prenesli v vialo in ga na vodni kopeli stalili ( $T > 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). 50  $\mu\text{l}$  staljenega tetradekanola smo s pipeto prenesli v 10 ml centrifurke s 5 ml zmesi etanola in vode. Na tak način smo preverili topnost tetradekanola v 40 %, 45 %, 50 %, 55 % in 60 % (V/V) etanolno-vodnih raztopinah.

#### *3.4.5. PROUČEVANJE TOPNOSTI KARVEDILOLA V ETANOLNI RAZTOPINI TETRADEKANOLA*

Pripravili smo raztopine KAR v etanolni raztopini tetradekanola tako, da smo v 1,5 ml mikrocentrifurke natehtali KAR in nato s pipeto dodali 500  $\mu\text{l}$  topila. Topnost smo preverjali v topilu, ki je vsebovalo 50 % (m/m) tetradekanola v absolutnem etanolu. Po dodatku topila smo zmes premešali na vibracijskem mešalu in inkubirali čez noč. Določali smo največjo m/V koncentracijo KAR, pri kateri ostane ZU raztopljena tudi čez noč. Začeli smo z 20 % m/V raztopino KAR in nato njegovo koncentracijo zmanjševali, dokler se vsa ZU ni raztopila. Pripravili smo 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % in 1,0 % m/V raztopino KAR v 50 % raztopini tetradekanola v absolutnem etanolu.

#### *3.4.6. PRIPRAVA RAZTOPIN ZU V ETANOLNI RAZTOPINI TETRADEKANOLA*

V 15 ml centrifugirkah smo pripravili topila za vgrajevanje ZU, ki so bila sestavljena iz različnih razmerij etanola in tetradekanola. To smo storili tako, da smo v centrifugirko natehtali tetradekanol in nato s pomočjo kapalke v vsebnik, ki je bil na tehtnici, dotehtali potrebno količino etanola. Vsebnik smo zaprli in počasi krožno mešali, da se je tetradekanol raztopil.

Pripravili smo naslednja topila v masnih razmerjih:

- Etanol
- Tetradekanol : etanol = 10 : 90,
- Tetradekanol : etanol = 25 : 75,
- Tetradekanol : etanol = 50 : 50.

Pripravili smo raztopine ZU v etanolni raztopini tetradekanola, ki so predstavljene v preglednici VIII.



Preglednica VIII: Raztopine ZU, ki smo jih uporabili za vgrajevanje v delno votle magnetne nanodelce.

TETRADEKANOL : ETANOL (m:m)			
Etanol	10 : 90	25 : 75	50 : 50
1,0 % KAR	1,0 % KAR	1,0 % KAR	1,0 % KAR
2,5 % IBU	0,5 % IBU	2,5 % IBU	2,5 % IBU
5,0 % IBU	1,0 % IBU	5,0 % IBU	5,0 % IBU
	2,5 % IBU		
	5,0 % IBU		
	7,5 % IBU		
	10 % IBU		

Raztopine ZU smo pripravili tako, da smo v 1,5 ml mikrocentrifugirko natehtali ZU in dodali 500 µl topila. Zmes smo mešali na vibracijskem mešalu dokler se vsa ZU ni raztopila.

### 3.4.7. SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE KAR IN IBU

#### Priprava umeritvene premice za KAR

Približno 10 mg KAR smo natančno natehtali v tehtalni čolniček. V merilnem valju smo predhodno pripravili 20 ml metanola in KAR s tehtalnega čolnička z metanolom previdno sprali v 500 ml bučko, ki smo jo nato s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. V bučko smo dodali magnetek in vzorec pri sobni temperaturi na magnetnem mešalu mešali eno uro. Iz osnovne raztopine smo pripravili pet raztopin v območju od 1,027 µg/ml do 7,192 µg/ml KAR in jim izmerili absorbance pri 241 nm. Ali je bila ena ura za raztapljanje ZU dovolj, smo preverili tako, da smo naredili še eno paralelo, pri kateri smo ZU na magnetnem mešalu mešali dve uri ter nato naredili ustrezne redčitve. Umeritveno premico smo v nadaljevanju raziskav razširili do koncentracije KAR 20,00 µg/ml. Postavili smo jo na podlagi 8 točk, od katerih so bile 3 dodatne glede na koncentracijsko območje prve umeritvene premice.

#### Priprava umeritvene premice za IBU

Približno 10 mg IBU smo natančno natehtali v tehtalni čolniček in ga z njega z metanolom (20 ml) sprali v 500 ml bučko. Bučko smo nato s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. V bučko smo dodali magnetka in vzorec pri sobni temperaturi mešali eno uro. Umeritveno premico smo naredili v območju od 2,12 µg/ml do 21,2 µg/ml IBU na podlagi osmih točk pri valovni dolžini 222 nm.

#### Poprava ozadja meritev

Ker lahko delci in topilo vplivajo na absorbanco vzorca, smo ta vpliv preverili tako, da smo vzorce pripravili po postopku, ki smo ga uporabljali za polnjenje delno votlih

nanodelcev. Namesto v raztopini ZU smo v teh raziskavah delce čez noč inkubirali le v etanolni raztopini tetradekanola. Naslednji dan smo delce ločili v magnetnem polju in merili ozadje dve uri popolnoma enako, kot bi merili sproščanje ZU.

Vpliv »ozadja« na rezultate meritev absorbance učinkovine smo skušali odpraviti z uporabo programske opreme. Program ChemStation, ki smo ga uporabljali, omogoča, da s pomočjo absorbance pri dveh izbranih valovnih dolžinah med posameznimi meritvami odštejemo ozadje. Določili smo dve valovni dolžini, kjer je absorbiralo samo ozadje in ne ZU. S pomočjo naklona premice, ki smo ga določili preko teh dveh točk, smo motnjo ozadja ekstrapolirali do valovne dolžine, kjer je absorbirala ZU. Takšen način poprave ozadja je ustrezal našim vzorcem, kar smo potrdili tako, da smo popravo ozadja uporabili na rezultatih merjenja absorbance ozadja. Tako smo pri valovnih dolžinah, kjer sta absorbirali naši ZU, ozadje odšteli in pričakovali vrednosti čim bližje 0. Pri KAR smo za popravo ozadja izbrali valovni dolžini 350 nm in 400 nm, pri IBU pa 242 nm in 350 nm, saj pri teh valovnih dolžinah ZU ne absorbirata svetlobe.

#### *3.4.8. VGRAJEVANJE MODELNE ZDRAVILNE UČINKOVINE V DELNO VOTLE SUPERPARAMAGNETNE NANODELCE IN VREDNOTENJE SPROŠČANJA V VODNEM MEDIJU*

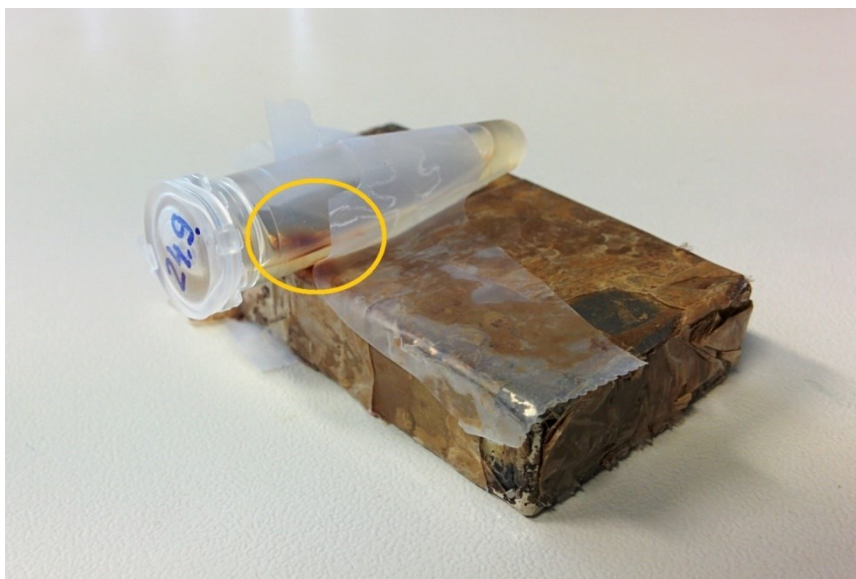
Za pripravo vzorcev smo uporabljali 1,5 ml mikrocentrifugirke. Pri prvih poskusih vgrajevanja učinkovine v nanodelce smo le-to izvajali brez uporabe ultrazvočne kopeli.

Sprva smo določili glavne točke postopka, ki so opisane v nadaljevanju. Po ločitvi delno votlih nanodelcev od medija smo le-te najprej sprali z etanolom, jih ločili v magnetnem polju od supernatanta in redispergirali v raztopini ZU ter nato čez noč inkubirali. Zjutraj smo v mikrocentrifugirki ločili raztopino ZU od vsebnika, delce redispergirali v mililitru vode in jih s pomočjo te disperzije prenesli v vsebnik, kjer smo opazovali sproščanje v vodi.

Pri prvih poskusih, kjer smo razvijali metodo priprave in vgrajevanja ZU v nanodelce smo uporabljali 500 µl vzorca delcev, volumen pa smo nato zmanjšali, da smo lahko zagotovili sink pogoje, saj smo s tem omejili celokupno količino ZU, ki se je sprostila v medij. V vseh primerih smo za vrednotenje sproščanja uporabljali 250 µl vzorca delcev, izjema je

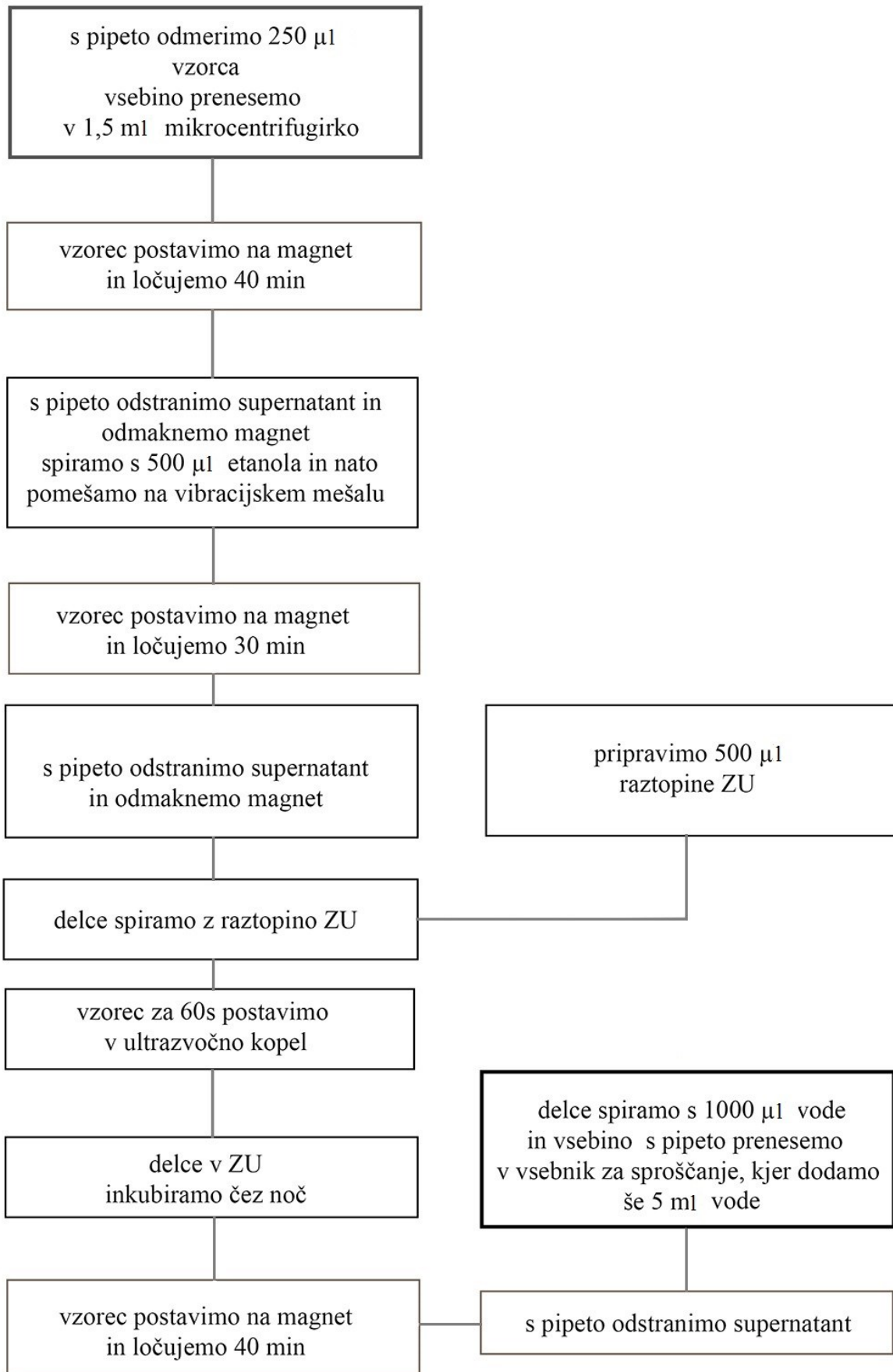
bila le pri opazovanju vpliva tetradekanola na vgradnjo KAR, kjer smo uporabili 500  $\mu$ l vzorca.

Postavitev mikrocentrifugirke med ločevanjem delcev v magnetnem polju kaže slika 9. Leta je bila posneta na koncu ločevanja delcev v magnetnem polju po spiranju delcev z etanolom in pred dodatkom raztopine ZU. Pri ločevanju smo vsebnik pritrdili z lepilnim trakom na magnet, da se tekom ločevanja ni premikal. Na obkroženem delu slike lahko vidimo delce, ki so se zbrali ob magnetu. Kot je razvidno tudi iz barve supernatanta, ločba ni popolna, zato smo supernatant z zaostankom delcev odstranili v poseben odpad.



Slika 9: Postavitev mikrocentrifurke na magnetu in prikaz ločbe delcev.

Na sliki 10 je shematično predstavljen optimiziran postopek vgrajevanja ZU v delno votle superparamagnetne nanodelce.



Slika 10: Postopek ločevanja superparamagnetnih nanodelcev v magnetnem polju in vgrajevanje zdravilne učinkovine.



Slika 11: Postavitev vsebnika na magnetu med sproščanjem.

Sproščanje učinkovine iz superparamagnetnih nanodelcev smo proučevali tako, da smo spektrofotometrično merili absorbanco modelne ZU v prej določenih časovnih točkah. Po dodatku prvega ml vode v mikrocentrifugirko in prenosu delcev v večji vsebnik smo le-tega med sproščanjem postavili na magnet, kot to prikazuje slika 11. Sproščanje učinkovine smo spektrofotometrično spremljali tako, da smo merili absorbanco supernatanta prvih 60 min vsakih 5 minut in nato vsakih 10 min do 120 min.

Meritev smo izvedli tako, da smo iz vsebnika s pipeto v kiveto prenesli 2,7 ml supernatanta in izvedli meritev absorbance z UV-VIS spektrofotometrom. Vzorec smo nato kvantitativno prenesli nazaj v vialo, pri čimer smo pazili, da smo vsebino iz kivete čim bolj natančno odstranili. Med meritvami smo skrbeli, da je bila koncentracija ZU v mediju vsaj trikrat nižja od nasičene topnosti (sink pogoji). Želeli smo ugotoviti, koliko ZU se sprost po 14 urah. Zato smo po 120 min dodali še svež medij in naslednji dan izmerili končno absorbanco. Po tej meritvi smo vialo še 5 min segrevali na približno 55 °C in ponovno izmerili absorbanco vzorca, s čimer smo želeli ugotoviti, ali se iz delcev sprosti še kaj ZU.

### 3.4.9. LOČEVANJE SUPERPARAMAGNETNIH DELCEV Z ULTRACENTRIFUGIRANJEM IN VREDNOTENJE SPROŠČANJA

Za ločevanje delcev od disperznega medija smo proučili tudi ultracentrifugiranje. Predvidevali smo, da se sproščanje v majhnem volumnu prečiščene vode ustavi zaradi nasičenja raztopine z ZU, saj smo proučevali sproščanje težko topnih ZU.

V delno votle delce smo ZU vgradili po opisanem postopku, razliko smo naredili le v zadnjem koraku. Delce smo od raztopine ZU ločili v magnetnem polju in jim nato namesto 6 ml dodali 250 µl vode, saj smo želeli z manjšim dodatkom vode doseči nasičenje raztopine. Teh 250 µl smo nato razdelili na pet mikrocentrifugirk, ki so predstavljale pet časovnih točk. Količino sproščene ZU smo določili v naslednjih časovnih

točkah: 5 min, 20 min, 35 min, 50 min in 65 min. Nato smo z dodatkom vode v mikrocentrifugirko, kjer je že bilo 50  $\mu$ l disperzije nanodelcev, želeli ponovno omogočiti sproščanje ZU. Najprej smo vodo dodali v mikrocentrifugirko, kjer smo opazovali sproščanje pri 65 min in nato vsakih 15 min v naslednje mikrocentrifugirke, da smo jih lahko naenkrat centrifugirali. Vodo, s katero smo želeli sprostiti raztapljanje smo najprej dodali vzorcu, ki smo ga sproščali 65 min in nato na 15 min vse do zadnjega vzorca.

5 min po dodatku vode zadnjemu vzorcu smo mikrocentrifugirke odnesli do ultracentrifuge, kjer smo že predhodno nastavili ustrezne pogoje ločevanja. Delce smo centrifugirali 5 min pri 30.000 obratih/min. V supernatantih vzorcev smo nato spektrofotometrično določili koncentracijo ZU.

Na ta način smo poskusili določiti sproščeno maso ZU dvema vzorcema. Volumen vode smo predvideli na podlagi predhodno izvedenih poskusov sproščanja.

Pripravljeni vzorci :

- 2,5 % IBU (*tetradekanol : etanol = 10 : 90*)

250  $\mu$ l vzorca delno votlih nanodelcev, ki smo jih inkubirali v raztopini IBU, smo razdelili v pet 1,5 ml mikrocentrifugirk in z vodo dopolnili do 1,5 ml.

- 10 % IBU (*tetradekanol : etanol = 10 : 90*)

250  $\mu$ l vzorca delno votlih nanodelcev, ki smo jih inkubirali v raztopini IBU, smo razdelili v pet 50 ml centrifugirk, ki smo jih z vodo dopolnili do 15 ml.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. DELNO RAZTAPLJANJE MAGNETNEGA JEDRA SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV iNANOvative™

Naš vhodni vzorec so bili nanodelci, ki so sestavljeni iz skupka superparamagnetnih nanodelcev železovega oksida obloženi s slojem porozne silike. Slika 12 (levo) prikazuje osnovno disperzijo delcev iNANOvative™. Takšni delci imajo zelo omejen prostor za vgrajevanje ZU, saj se le-ta lahko vgradi le v pore silike.

Da bi kapaciteto vgrajevanja povečali, smo del magnetnega jedra (del superparamagnetnih delcev železovega oksida) raztopili z inkubiranjem iNANOvative™ v koncentrirani HCl. Rezultati prvih dveh poskusov (vzorca 1 in 2) so pokazali, da so bili izbrani pogoji raztapljanja tj. 4 min inkubiranja 3 ml osnovne disperzije magnetnih nanodelcev z dodatkom 2 ml koncentrirane HCl preblagi, saj je bila notranjost delcev še vedno zelo zapolnjena z magnetnimi jedri, kar smo spremljali s presevno elektronsko mikroskopijo. Po drugi strani so bili delci, ki smo jih inkubirali 3 min z dodatkom 3 ml koncentrirane HCl, preveč izpraznjeni, kar je povzročilo slabšo magnetno odzivnost.



Slika 12: Osnovna disperzija superparamagnetnih nanodelcev iNANOvative™ (levo) in disperzija delcev z delno raztopljenimi magnetnimi jedri (desno).

Odločili smo se, da bomo za naše nadaljnje raziskave vzorce pripravili tako, da bomo 3 ml disperzije delcev dodali 3 ml koncentrirane HCl in inkubirali 2 min in 30 s. Kljub uporabi vedno enakih pogojev praznjenja (delnega raztapljanja magnetnih jeder) delcev, smo v fazi ločevanja delcev v magnetnem polju med njimi opazili razlike. Vzorca 3 in 4 sta bila pripravljena na enak način, vendar sta se pri ločevanju v magnetnem polju obnašala različno, saj so se delci pri vzorcu 4 ločevali opazno počasneje kot pri vzorcu 3. Iz tega razloga smo se odločili, da bomo za poskuse vgrajevanja ZU in vrednotenje sproščanja pripravili tri paralele delcev, ki smo jih

nato združili in tako dobili povprečen homogen izhodni vzorec. Na sliki 12 (levo) vidimo osnovno disperzijo superparamagnetnih nanodelcev iNANOvative™, (desno) pa vzorec 5 po delnem raztapljanju magnetnih jeder (po združitvi vseh treh pripravljenih paralelnih vzorcev). Že po barvi vzorca vidimo, da je koncentracija železa, ki daje disperziji značilno rjavo barvo, v desnem vzorcu manjša, saj je barva manj intenzivna.

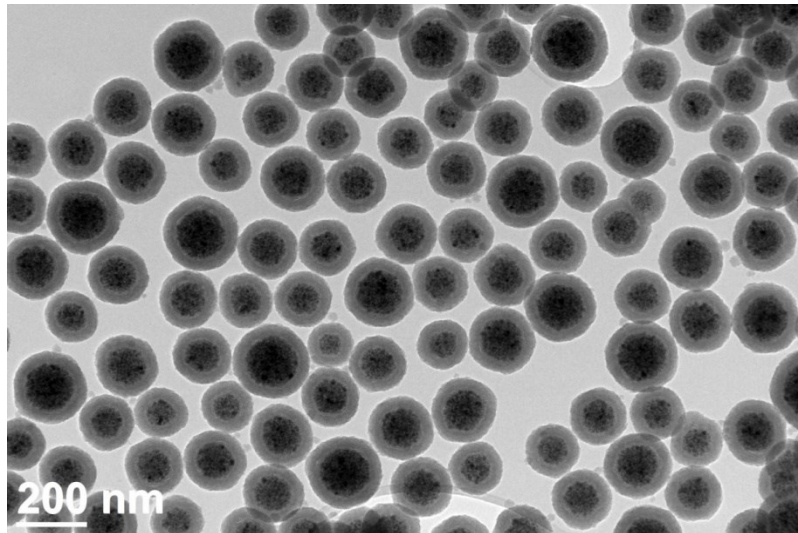
Opazili smo tudi, da so se po dodatku HCl delci v disperziji združili v skupke, ki so lahko povzročili neenakomerno raztapljanje magnetnih jeder, kar se je odrazilo na njihovi magnetni odzivnosti, ki se je med vzorci razlikovala. V takšnem vzorcu so lahko prisotni delci z različnimi lastnostmi tj. od delcev, ki so neprimerni za polnjenje, ker niso votli, do delcev, ki so popolnoma izpraznjeni in posledično niso magnetno odzivni.

Raztapljanje magnetnih jeder smo ustavili tako, da smo dodali določen volumen (30 ml) prečiščene vode in delce ločili od disperznega medija v magnetnem polju. S takšnim postopkom ločevanja smo poleg nevgrajene ZU odstranili tudi delce, ki so bili preslabo magnetno odzivni. Kljub temu pa so se lahko med delce, ki so magnetno odzivni, ujeli tudi magnetno slabo odzivni ali neodzivni delci, zato je ključno, da zagotovimo karseda enakomerno raztapljanje magnetnih jeder in tako pripravo homogene populacije delcev s primerljivo magnetno odzivnostjo.

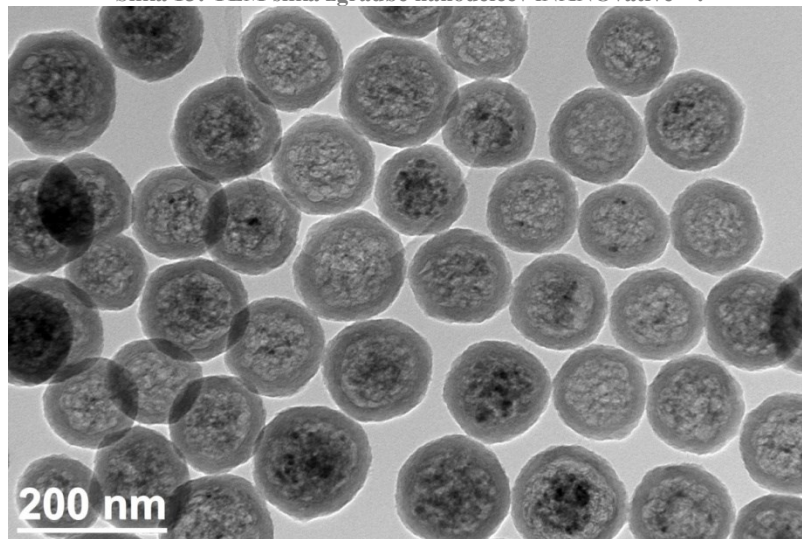
Čim bolj enakomerno raztapljanje bi lahko dosegli tako, da bi imeli vhodni delci površino modificirano tako, da bi zagotavljala njihovo stabilnost v kislih pogojih tj. da bi imeli na površini namesto silanolnih skupin funkcionalne skupine, ki bi bile pri nizkem pH medija nabite, kar bi zagotavljalo elektrostatsko stabilizacijo delcev tudi pri nizkih pH. Naš cilj pa je bil izdelati votle superparamagnetne nanodelce, s čim bolj ponovljivimi lastnostmi, ki zagotavljajo tudi ponovljivo vgrajevanje ZU in ustrezno magnetno odzivnost dostavnega sistema.

Zgradbo vhodnih nanodelcev in pripravljenih delno votlih superparamagnetnih nanodelcev smo pregledali s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM). Slike dokazujejo, da je v notranjosti delno votlih nanodelcev manj železovega oksida, kar se na sliki vidi kot manj temna sredica delcev v primerjavi z vhodnimi delci (sliki 13 in 14). Na obeh slikah delcev se jasno vidi tudi obloga iz silike, ki obdaja sredico delcev.





Slika 13: TEM slika zgradbe nanodelcev iNANOvative™.



Slika 14: TEM slika delno votlih superparamagnetnih nanodelcev.

*Zhang s sodelavci* je magnetno odzivne nanodelce pripravili na način, ki je zelo podoben našemu [27]. Njegovi delci so imeli v primerjavi z našimi drugačno sestavo. V jedru delcev so bili železovi oksidi, ki so bili obloženi s silicijevim dioksidom, to jedro pa je bilo obloženo še z dodatno oblogo, ki se v prihodnjih korakih ni raztopila. Prostor za ZU so želeli ustvariti z raztapljanjem obloge iz silicijevega dioksida. Ugotovili so, da se z daljšanjem časa raztapljanja silikatne obloge večja kapaciteta za vgrajevanje DOX. To sovпада z našimi predpostavkami, da daljši čas raztapljanja in bolj koncentrirana HCl omogočita nastanek bolj votlih delcev, kar omogoča vgradnjo večje količine ZU.

## 4.2. LIOFILIZACIJA DISPERZIJ SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV IN DOLOČANJE NJIHOVE MASNE KONCENTRACIJE

Osnovne disperzija superparamagnetnih nanodelcev, ki smo jo uporabili za pripravo delno votlih superparamagnetnih nanodelcev, je imela koncentracijo 5 mg/ml. Delno votle superparamagnetne nanodelce smo pripravili z delnim raztapljanjem magnetnih jeder, zato se je masna koncentracija delcev po postopku raztapljanja zmanjšala, kar smo spremljali gravimetrično, tako da smo disperzijo po raztapljanju in spiranju ter ločevanju v magnetnem polju liofilizirali. Tako smo preverili, kakšna je sprememba v masni koncentraciji vzorca, ko smo izvedli delno raztapljanje magnetnega jedra, kar je opisano v poglavju 3.4.1. Kot vidimo iz rezultatov, ki so zbrani v preglednici IX, se je koncentracija zmanjšala iz 5 mg/ml na 3,53 mg/ml.

Zanimalo nas je tudi, kolikšna je še dodatna izguba delcev med postopkom ločevanja v magnetnem polju tekom polnjenja delcev z učinkovino. Naredili smo vse korake s slike 9, le da nismo dodali raztopine ZU. Ugotovili smo, da je masna koncentracija delno votlih delcev v vzorcu, ki smo ga uporabili za opazovanje sproščanja, 2,87 mg/ml.

Preglednica IVIII: Masna koncentracija delcev v vzorcu 5 in vpliv ločb pri postopku čiščenja in polnjenja delcev, ki je predstavljen na sliki 9.

m (mikrocentrifugirka) (mg)	m (mikrocentrifugirka + liofilizirani delci) (mg)	sprememba mase (mg)	koncentracija (mg/ml)
<i>delci z delno raztopljenim magnetnim jedrom (vzorec 5)</i>			
926,23	928,14	1,91	3,82
948,48	950,06	1,58	3,16
942,94	944,74	1,80	3,60
povprečje:		1,76 ± 0,14	<b>3,53 ± 0,24</b>
<i>koncentracija delcev po postopku predstavljenem na sliki 9 (brez inkubiranja z ZU)</i>			
945,96	946,61	0,65	2,60
982,10	982,85	0,75	3,00
944,49	945,24	0,75	3,00
povprečje:		0,72 ± 0,05	<b>2,87 ± 0,19</b>

Pri določanju masne koncentracije delcev, kjer smo opazovali vpliv postopka čiščenja in polnjenja delcev z ZU, smo namesto 500 µl vzorca uporabili le 250 µl, saj je bila to tudi količina vzorca, ki smo jo uporabili v poskusih sproščanja, prav tako pa smo varčevali z vzorcem. Ugotovili smo, da je zmanjšanje masne koncentracije delcev v vseh vzorcih veliko. Bolj učinkovito ločevanje delno votlih delcev, ki so manj magnetno odzivni, bi lahko dosegli s pomočjo močnejšega magneta, ki bi omogočil manjšo izgubo delcev po postopku polnjenja z ZU; k manjši izgubi pa bi pripomoglo tudi bolj enakomerno

raztapljanje magnetnih jeder, kar bi zagotovilo primerljivo magnetno odzivnost vseh nanodelcev v vzorcu.

### 4.3. POLNJENJE DELCEV Z BARVILOM

Preden smo se lotili vgrajevanja učinkovin v delno votle superparamagnetne delce smo izvedli preliminarni poskus s polnjenjem relativno hidrofobnega barvila Nile Red, ki je dal vizualne informacije o poteku vgrajevanja. Izbrano barvilo je glede na hidrofobnost, podobno izbranim modelnim ZU. S poskusi smo ugotavljali, ali lahko z inkubiranjem mezoporoznih nanodelcev silike v raztopini barvila v talini tetradekanola le-to vgradimo v njihovo strukturo. Po inkubaciji z barvilom smo delcem dodali 60 % etanol in opazovali obarvanost supernatanta in delcev ter izvedli več stopenj spiranja delcev s 60% EtOH.

#### Polnjenje barvila v mezoporozne nanodelce silike brez magnetnega jedra

Mezoporozne nanodelce silike brez magnetnega jedra smo pripravili tako, da smo popolnoma raztopili magnetna jedra in delce primerno sprali. Po vgrajevanju barvila in prvem ločevanju nanodelce od etanolne raztopine s centrifugiranjem je bil supernatant močno obarvan. Po drugem spiranju z etanolom je bil le rahlo obarvan. Pri ločbi s centrifugiranjem smo dobili sediment, ki smo ga enostavno dispergirali z rahlim stresanjem. Na koncu smo preverili, ali segrevanje vzorca na vodni kopeli povzroči opazne spremembe barve supernatanta, saj je bilo barvilo/tetradekanol pri sobni temperaturi v trdnem stanju, zato smo vgrajevanje izvedli pri povišani temperaturi. Segrevanje ni povzročilo opazne spremembe. Disperzija izhodnih mezoporoznih nanodelcev silike je bila blede bele barve, zato smo zlahka opazili, ali se je barvilo vgradilo v delce, saj so se le-ti obarvali. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da je v delce mogoče vgraditi ZU s podobnimi lastnostmi kot jih je imelo barvilo. Po centrifugiranju smo delce redispergirali v 1,5 ml vode in opazovali obarvanost supernatanta. Obarvanost medija se v času dveh tednov ni znatno spremenila.

#### Delno votli nanodelci silike z magnetnim jedrom

Liofilizirali smo vzorca 1 in 2, kjer so imeli nanodelci delno raztopljen magnetna jedra. Odločili smo se, da barvilo poskusimo vgraditi v vzorec 2, ki je imel bolj izpraznjeno notranjost. Barva supernatanta je bila podobna kot pri vzorcu popolnoma izpraznjenih nanodelcev v katere smo vgrajevali barvilo. V prvem postopku ločbe je bil supernatant močno obarvan, po drugem spiranju pa je bilo opazno rahlo obarvanje. Segrevanje delcev tudi v tem primeru ni povzročilo spremembe obarvanja supernatanta. Ugotovili smo, da so

delno izpraznjeni superparamagnetni nanodelci primerni za vgrajevanje barvila in tako primerni tudi za nadaljnje poskuse vgrajevanja ZU. Liofirizirani delci, ki smo jih redispergirali v vodi, so bili v vseh primerih združeni v večje skupke.

#### 4.4. TOPNOST TETRADEKANOLA V ETANOLNO-VODNIH RAZTOPINAH

Tetradekanol smo v raziskavi uporabili kot pomožno snov pri vgrajevanju težko topne ZU v delno votle superparamagnetne nanodelce. Tetradekanol je pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju [28], pri temperaturi, ki je rahlo nad telesno (37-39 °C), pa je v tekočem, zato predvidevamo, da bi lahko z njegovo uporabo dosegli nadzorovano sproščanje učinkovine v tkivu na osnovi hipertermije. Za vgrajevanje učinkovine skupaj s tetradekanolom v delno votle superparamagnetne nanodelce smo pripravili raztopino tetradekanola v etanolu. Ugotovili smo, da tetradekanol ni topen v 40 % (V/V) in 45 % (V/V) raztopini etanola, saj se je zelo hitro oboril iz raztopine. Pri 50 % (V/V) in 55 % (V/V) je nastala opalescentna disperzija, medtem ko je pri 60 % (V/V) nastala bistra raztopina. Na podlagi dobljenih podatkov smo zaključili, da potrebujemo za popolno raztapljanje tetradekanola s koncentracijo 10 µl/ml raztopine tetradekanola v etanolno-vodni raztopini vsaj 60 % (V/V) etanolno-vodno raztopino. Ta podatek je pomemben pri načrtovanju spiranja prebitne količine ZU s površine delcev, saj moramo uporabiti medij, ki učinkovito spere nevgrajeno ZU in tetradekanol s površine delcev. Tekom raziskave smo naleteli na težave s kvantitativnim prenosom taline tetradekanola v etanolno-vodno raztopino, saj se je le-ta v nastavku pipete zelo hitro strdil, zato prenos ni bil kvantitativen. Da bi zmanjšali eksperimentalno napako, smo se odločili, da bomo pripravili koncentrirano raztopino tetradekanola v absolutnem etanolu in le-to odmerjali. Kljub dobri topnosti v etanolu, se tetradekanol raztaplja počasi, zato smo raztapljanje pospešili z rahlim stresanjem, saj hitrejše stresanje povzroči nastanek pene.

#### 4.5. TOPNOST KARVEDILOLA V RAZTOPINI TETRADEKANOLA

Topnost KAR v vodnem mediju je majhna [30], zato smo preverili njegovo topnost v 50 % (m/m) raztopini tetradekanola v absolutnem etanolu, da bi v nanodelce lahko vgradili čim večjo količino KAR. Rezultati so predstavljeni v preglednici XI. Pri 5 % (m/V) raztopini KAR smo opazili, da je oborine še zelo malo, zato smo dodali še 0,5 ml topila in po nekaj minutnem mešanju na vibracijskem mešalu smo dobili raztopino. Kljub temu smo naslednji dan opazili v vzorcu oborino, zato smo poskusili še s pripravo 1 % (m/V)

raztopine. KAR se je v takšnem topilu raztopil ob mešanju na vibracijskem mešalu in ostal raztopljen tudi naslednji dan.

Preglednica IX: Topnost KAR v etanolni raztopini tetradekanola.

<i>uporabljeno topilo je etanol : tetradekanol=50 : 50 (m:m)</i>	
20 % (m/V) KAR	zelo veliko oborine
10 % (m/V) KAR	veliko oborine
5 % (m/V) KAR	manj oborine
2,5 % (m/V) KAR	se raztopi, naslednji dan oborina
1 % (m/V) KAR	se raztopi

#### 4.6. OPTIMIZACIJA METODE ZA VGRAJEVANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE V DELNO VOTLE SUPERPARAMAGNETNE NANODELCE

Optimizacijo metode vgrajevanja ZU v delno votle superparamagnetne nanodelcev smo začeli tako, da smo najprej definirali ključne korake postopka: ločba delcev iz vodnega medija, spiranje delcev z absolutnim etanolom, inkubiranje delcev v raztopini ZU in ločevanje nevgrajene ZU. Vgradnjo ZU smo ovrednotili posredno s spremljanjem sproščanja ZU v vodnem mediju. Vsebnost smo določali spektrofotometrično s pomočjo umeritvenih premic za KAR ( $R^2=0,9993$ ) in IBU ( $R^2=0,9997$ ).

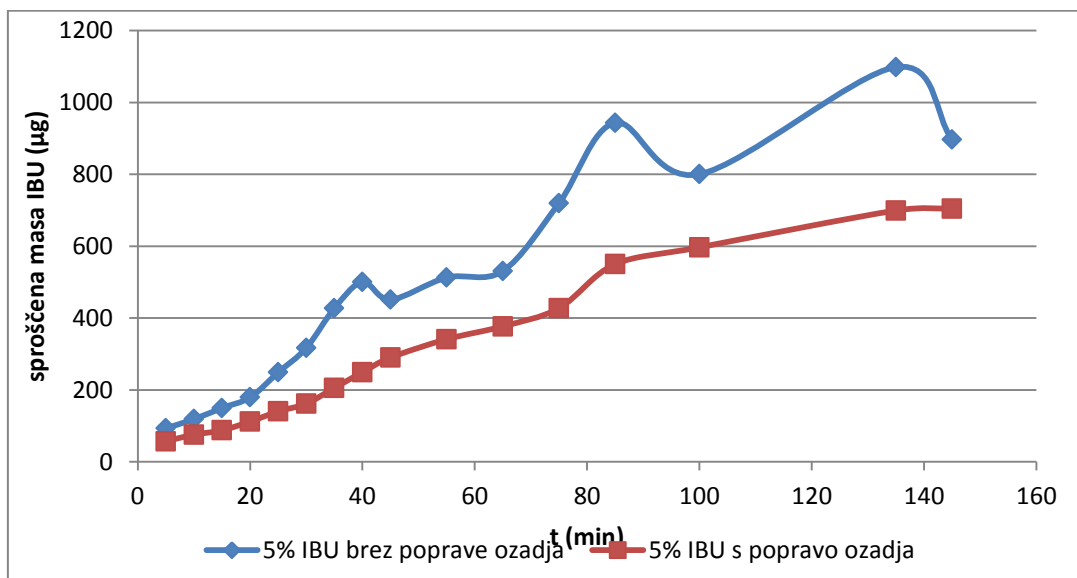
Vzorec 2 smo že uporabili za prve poskuse, s katerimi smo želeli ovrednotiti primernost metode polnjenja delcev, ko smo v delce vgradili barvilo. Izmed prvih dveh vzorcev smo za vgrajevanje ZU izbrali vzorec 2, ker so bili delci bolj votli in so imeli posledično v strukturi na voljo večji volumen za vgrajevanje ZU v primerjavi z delci vzorca 1. Delci so se hitro združili v večje skupke že med procesom čiščenja, zato je pomembno, da jih s pipeto s stene mikrocentrifugirke spiramo počasi, saj to delno omeji nastanek agregatov. Po inkubiranju delcev v raztopini z ZU so bili agregati še vedno prisotni. Tako smo imeli v mikrocentrifugirki del delcev, ki so bili posamezno dispergirani, in del v obliki agregatov. Poleg agregatov je po inkubiranju čez noč nastal sediment agregatov in posameznih delcev, ki pa smo ga z rahlim stresanjem zlahka redispergirali, agregatov pa nismo mogli ločiti ne s stresanjem in ne z mešanjem na vibracijskem mešalu. Agregati so bili vidni tudi med poskusom sproščanja, kar ni ustrezno, saj smo z agregati vnesli več nevgrajene ZU med delci kot bi jo s posameznimi delci. Nanodelce je v agregate povezoval tetradekanol, v katerem je bila raztopljena ZU. Tak sistem je neprimeren za uporabo, saj lahko aglomerati povzročijo hude neželene učinke, ki so posledica mehanske obstrukcije organov [35].

Najprej smo za vgrajevanje v delce uporabili 2,5 % (m/V) raztopino KAR. Kljub temu da se je med inkubiranjem čez noč 2,5 % (m/V) ZU oborila, smo delce ločili od medija in jih redispergirali v 1,5 ml prečiščene vode ter proučili sproščanje ZU iz takšnega sistema, da

bi lahko določili kakšen volumen medija potrebujemo v nadaljnjih poskusih sproščanja. Ugotovili smo, da smo uporabili premajhen volumen medija, ker smo presegli nasičeno topnost in smo zato volumen medija v nadaljnjih poskusih povečali, tako da smo namesto 1,5 ml uporabili v nadaljevanju 3 ml. Prav tako smo pri večjem volumnu medija lažje odvzeli vzorec za analizo na spektrofotometru in hkrati prenesli v kiveto manj delcev. Za analizo smo izbrali samo eno točko tj. 90 min po začetku sproščanja. Ugotovili smo, da brez ločevanja delcev od medija meritve ne moremo izvesti, ker agregati delcev motijo meritve in so spektri »nepravilnih« oblik. Delce smo od medija ločili s 15 min inkubiranjem v magnetnem polju. Z naslednjimi poskusi smo želeli čas magnetnega ločevanja skrajšati, zato smo preverili učinkovitost ločevanja po 10 min in 5 min inkubiranja v magnetnem polju in ugotovili, da je 5 min inkubiranja v magnetnem polju dovolj za učinkovito separacijo delcev od medija.

#### Poprava ozadja

Kasneje smo z opazovanjem vpliva ozadja ugotovili, da delci motijo meritve tako, da je naraščanje motnje linearno, zato smo lahko s pomočjo programske opreme popravili motnjo ozadja. Programska oprema, ki smo jo uporabili za popravo ozadja, je omogočila, da smo ozadje popravili za vsako meritve posebej, saj je bil vpliv odvisen od količine delcev v kiveti. Meritve smo tako lahko merili tudi brez ločevanja delcev v magnetnem polju. Vpliv ozadja se je tako s povečanjem začetnega volumna in kasnejšimi redčitvami zelo zmanjšal, saj je bilo število delcev v kiveti manjše. Primer profila sproščanja ZU pred in po korekciji ozadja prikazuje slika 15.



Slika 15: Profil sproščanja ZU s korekcijo (modra krivulja) (n=1) in brez korekcije (n=1) (rdeča krivulja) ozadja meritev. Poskus smo izvedli z vzorcem 4 (500 µl disperzije delcev v 3 ml vode).

### Ločevanje delcev v magnetnem polju

Med prvimi poskusi smo določili čas, ki je potreben za ločevanje delcev od disperznega medija v magnetnem polju med procesi čiščenja in polnjenja. Supernatant je bil v vseh primerih magnetnega ločevanja rahlo obarvan, kar kaže, da je vseboval majhen delež dispergiranih delcev, ki smo jih tako skupaj s supernatantom zavrgli. Močnejše je bil supernatant obarvan po prvem ločevanju delcev v magnetnem polju, po spiranju z etanolom pa je bil svetleje obarvan, tako sklepamo, da je bila ločba bolj učinkovita. Za ločevanje delcev iz vodnega medija smo vzorec v magnetnem polju inkubirali 40 min, po spiranju z etanolom pa 30 min. V fazi ločevanja delcev od raztopine ZU smo vzorec prav tako inkubirali v magnetnem polju 40 min, saj je krajši čas ločevanja vodil v preveliko izgubo delcev, daljši čas inkubiranja pa je povzročil nastanek aglomeratov, ki jih nismo mogli redispergirati. Po vseh postopkih ločevanja smo supernatant, ki smo ga zavrgli, zbirali v posebnem odpadu. Ugotavljali smo tudi, kakšna je najboljša postavitev vzorca v magnetnem polju med ločevanjem. Ugotovili smo, da supernatant lažje odvezemo, če so delci zbrani vzdolž vsebnika, torej, da je le-ta postavljen ležeče na magnetu (slika 9).

### Spiranje nevgrajene ZU s površine delcev

Delce smo želeli po postopku vgrajevanja ZU sprati, da bi z njihove površine odstranili nevgrajeno ZU. Za spiranje delcev smo najprej uporabili absolutni etanol in jih po spiranju 15 min ločevali v magnetnem polju. Preskus sproščanja iz tako pripravljenega dostavnega sistema je pokazal, da smo v fazi spiranja odstranili vso ZU, zato sproščanja KAR iz delcev nismo zaznali. Nato smo poskusili delce sprati s 50 % (V/V) etanolno-vodno raztopino in s krajšim 10 min časom ločbe v magnetnem polju. Tudi v tem primeru se je izkazalo, da sproščanja nismo zaznali, prav tako pa je bilo prvih nekaj spektrov neprimernih za določanje koncentracije. Pri naslednjem vzorcu smo prav tako spirali delce s 50 % (V/V) etanolno-vodno raztopino čas ločbe v magnetnem polju pa smo skrajšali na 5 min. Tudi ta pristop se je izkazal kot neprimeren, hkrati pa smo zaradi kratkega časa ločbe izgubili veliko delcev. Iz opisanih razlogov smo se odločili, da bomo vzorce za spremljanje sproščanja ZU pripravili brez spiranja njihove površine tj. brez odstranjevanja ZU s površine delcev.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno razviti drugo, bolj ustrezno metodo za spiranje nevgrajene ZU s površine delcev, saj bi tako preprečili (zmanjšali) začetno takojšnje sproščanje (»burst release«), ki je bilo izraženo pri vseh proučevanih vzorcih. Težavo bi

morda lahko zmanjšali tudi z uporabo močnejšega magnetnega polja, ki bi omogočalo krajši čas ločevanja delcev od medija, ali z drugačno zasnovno postopka čiščenja.

#### Dispergiranje agregatov delcev

Pri poskusih sproščanja ZU so se v vseh začetnih primerih pojavili večji skupki delcev. Ko so le-ti nastali med procesom čiščenja, jih z mešanjem in stresanjem nismo mogli redispergirati. Najprej smo se težave lotili tako, da smo zmanjšali delež tetradekanola v topilu na 25 % (m/m) in 10 % (m/m) in opazovali vpliv na obnašanje delcev med pripravo vzorca. Ugotovili smo, da se ZU kljub zmanjšanju deleža tetradekanola vgradi, opazili pa smo tudi, da z zmanjšanjem deleža tetradekanola delce lažje speremo s stene mikrocentrifugirke. Delci so se po dodatku vode popolnoma ločili le v primeru, ko tetradekanola ni bilo v topilu in je bil KAR raztopljen samo v etanolu. V tem primeru pa sproščanja KAR nismo mogli zaznati, saj je bila disperzija delcev zelo močno obarvana, posledično je bila oblika spektrov neprimerna za analizo sproščene ZU. Poskus smo tudi ponovili in dobili enake rezultate. Na podlagi predhodnih poskusov smo se odločili, da bomo za vgrajevanje ZU uporabili topilo z 10 % (m/m) tetradekanola. Čeprav je zmanjšanje deleža tetradekanola na 10 % (m/m) omogočilo, da je nastalo veliko manj agregatov, se nastanku agregatov še vedno nismo popolnoma izognili. Nato smo poskusili agregate, ki so nastali že med čiščenjem vzorca, redispergirati s soniciranjem v ultrazvočni kopeli (60 s). To smo storili zatem, ko smo delcem dodali raztopino ZU. Delci so se ločili in ločeni ostali ločeni tudi ves čas inkubiranja z ZU. Tudi ločba, s katero smo odstranili raztopino ZU, ni povzročila nastanka skupkov in tako smo delce lahko v vodi redispergirali brez nastanka vidnih agregatov.

#### Volumen medija

Med optimizacijo metode smo se odločili, da bomo pri poskusih z vzorcem 5 povečali začetni volumen s 3 ml na 6 ml. Na tak način smo zagotovili primerne pogoje za sproščanje, kar pomeni da je bila koncentracija ZU dovolj nizka, da njeno sproščanje ni omejevala topnost. Prav tako smo manjše vialo zamenjali za večje vsebnike, v katerih smo volumen lahko povečevali tudi do 20 ml. Zmanjšali smo tudi odmerek napolnjenih delcev – uporabili smo 250  $\mu$ l vzorca delcev namesto 500  $\mu$ l, kot smo to počeli v prvih poskusih, kar je zopet vplivalo na končno koncentracijo sproščene ZU.

#### Vpliv tetradekanola na ločbo

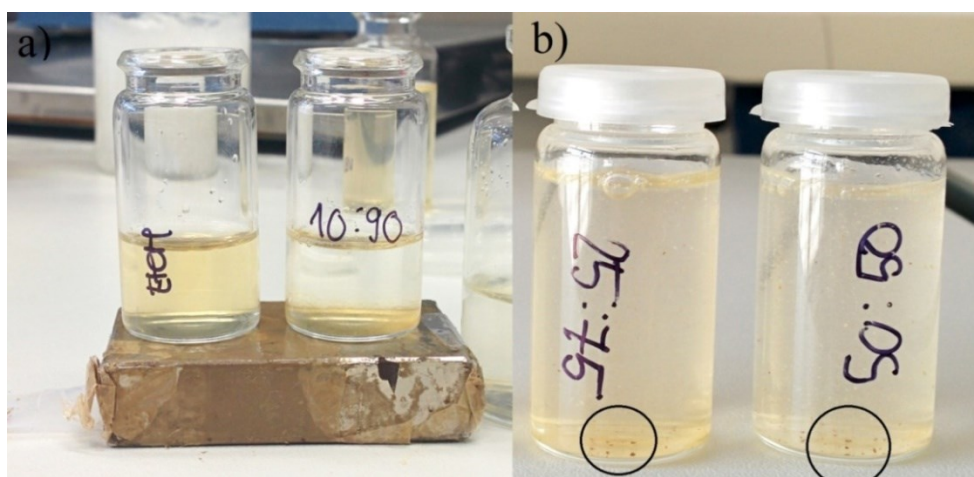
Ko smo opazovali vpliv ozadja, smo predvidevali, da tetradekanol povzroči združevanje delcev v agregate. Delce v katere smo vgradili ZU iz etanolne raztopine, se na magnetu



skorajda niso ločili, medtem ko je večanje deleža tetradekanola v raztopini za vgrajevanje povzročilo bolj opazno ločbo delcev. To lahko pripišemo nastanku agregatov delcev, ki so bolj magnetno odzivni v primerjavi s posameznimi delci. To vidimo tudi na sliki 16a, ki je bila posneta 5 min po začetku ločevanja v magnetnem polju. Delci, ki smo jih inkubirali v 10 % (m/m) raztopini tetradekanola v etanolu, so se opazno ločili iz medija v primerjavi s tistimi, ki smo jih inkubirali samo v etanolni raztopini ZU. Kljub uporabi ultrazvoka so se redispergirali le delci, v katere smo vgrajevali raztopino ZU z največ 10 % tetradekanola, pri ostalih vzorcih so ostali veliki skupki delcev (slika 16b). Potek optimizacije metode za vgrajevanje ZU v nanodelce in glavne ugotovitve so zbrane v preglednici XII.

Preglednica X: Potek optimizacije metode za vgrajevanje zdravilne učinkovine v delno votle superparamagnetne nanodelce in glavne ugotovitve. Natehtane mase in dodani volumni topila so zbrani v prilogi I.

ZU	V(vzorec) V(medij)	tetradekanol : etanol (m : m)	Ugotovitev
<b>VZOREC 2</b>			
2,5 % KAR	500 µl 1,5 ml	50 : 50	2,5 % KAR se čez noč obori delci motijo meritve, vendar je 5 min ločevanja v mag. polju dovolj za izvedbo meritev volumen medija je premajhen
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	50 : 50	večina ZU se sprosti v 120 min
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	50 : 50	površino napolnjenih delcev poskusimo sprati z etanolom – 15 min stika - neuspešno (neustrezna oblika spektrov)
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	50 : 50	površino napolnjenih delcev poskusimo sprati s 50 % etanolom – 10 min stika - neuspešno (neustrezna oblika spektrov)
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	50 : 50	površino napolnjenih delcev poskusimo sprati s 50 % etanolom – 5 min stika - neuspešno (neustrezna oblika spektrov)
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	0 : 100	koncentracija KAR se ne povečuje s časom
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	0 : 100	ponovitev poskusa, koncentracija KAR se ne povečuje s časom prvič opaženo, da ob prenosu v vodni medij ne nastanejo agregati ločba delcev v magnetnem polju je zelo počasna disperzija je močno obarvana in moti meritve
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	25 : 75	25 % delež tetradekanola v raztopini za vgrajevanje ZU še vedno omogoča vgradnjo KAR
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	10 : 90	10 % delež tetradekanola v raztopini za vgrajevanje ZU še vedno omogoča vgradnjo KAR ob pripravi vzorca nastane manj agregatov delcev
<b>VZOREC 3</b>			
1% KAR	500 µl 3,0 ml	10 : 90	priprava vzorca z inkubiranjem 2,5 min v HCl je primerna, ZU se še vedno sprošča še vedno nastajajo agregati
<b>VZOREC 4</b>			
1% IBU	500 µl 4,0 ml	10 : 90	sprememba priprave vzorca: po dodatku ZU nastale agregate redispergiramo s pomočjo ultrazvoka



Slika 16: a) Vpliv tetradekanola na ločevanje delcev v magnetnem polju, b) agregati delcev, ki nastanejo med postopkom polnjenja delcev z ZU.

#### 4.7. VGRAJEVANJE ZU V DELCE

Ena izmed poglobitnih informacij, ki smo jo želeli pridobiti tekom raziskav je, koliko ZU lahko vgradimo v delce. Poskuse vgrajevanja smo izvedli z različnimi koncentracijami IBU v raztopini za vgrajevanje in zaradi slabe topnosti KAR le z eno koncentracijo raztopine KAR. ZU smo najprej raztopili v 10 % raztopini tetradekanola v etanolu, saj je po predhodnih izkušnjah to topilo omogočilo najbolj optimalno vgrajevanje ZU in omejilo nastanek agregatov delcev. Ena izmed ključnih lastnosti delcev, ki vpliva na njihovo varnost je, da se ti ne združujejo v skupke. V preglednici XIII smo zbrali podatke o tem, ali so se delci v poskusu sproščanja v vodnem mediju dispergirali ali so bili prisotni agregati.

Preglednica XI: Nastanek s prostim očesom vidnih aglomeratov pri poskusih sproščanja ZU iz nanodelcev.

KAR		IBU	
1,0 % (m/V) raztopina KAR		5,0 % (m/V) raztopina IBU	
tetradekanol : etanol	delci se redispergirajo	tetradekanol : etanol	delci se redispergirajo
100 : 0	DA	100 : 0	DA
10 : 90	sprva NE, nato DA	10 : 90	DA
25 : 75	NE	25 : 75	DA
50 : 50	NE	50 : 50	DA*
		2,5 % (m/V) raztopina IBU	
		100 : 0	DA
		10 : 90	DA
		25 : 75	DA*
		50 : 50	DA
		10 % (m/V) raztopina IBU	
		10 : 90	DA
		7,5 % (m/V) raztopina IBU	
		10 : 90	DA
		1,0 % (m/V) raztopina IBU	
		10 : 90	DA
		0,5% (m/V) raztopina IBU	
		10 : 90	DA

Vzorca, ki sta v preglednici XIII označeni z \*, sta kazala posebne lastnosti. Agregatov v teh dveh primerih nismo opazili, vzorca pa sta kazala v primerjavi z drugimi vzorci drugačne lastnosti tekom ločevanja v magnetnem polju, kar lahko kaže na interakcije med delci, saj so se delci v obeh primerih v magnetnem polju ločevali opazno hitreje.

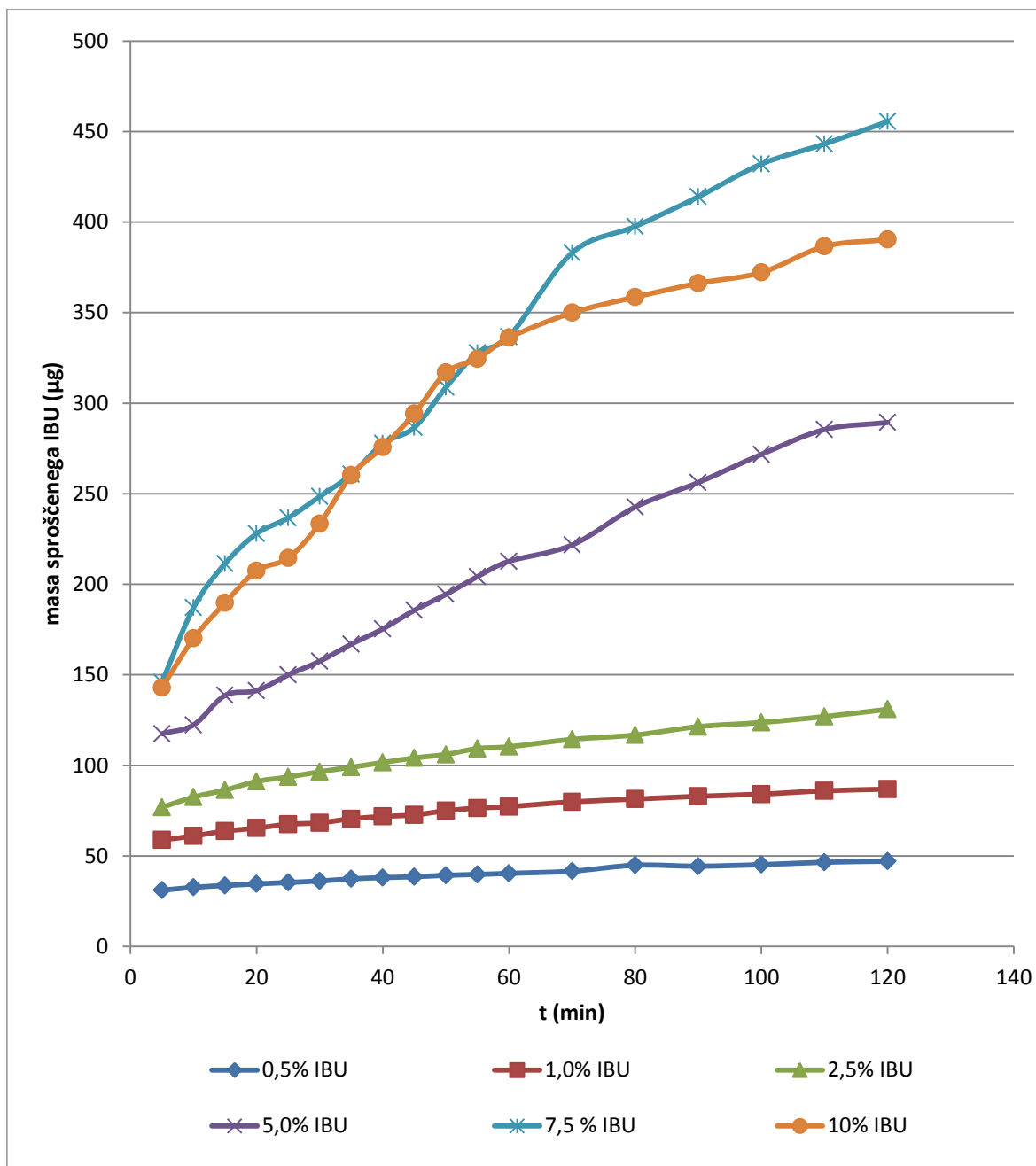
V naslednjih podpoglavjih so predstavljeni rezultati posameznih sklopov preskusov sproščanja, ki kažejo vpliv koncentracije ZU in raztopine za vgradnjo ZU na sproščanje in vgradnjo ZU v delno votle superparamagnetne nanodelce vzorca 5. Vse natehtane mase in dodani volumni topila za ZU, ki smo jih uporabili v naslednjih podpoglavjih, so zbrani v prilogi I.

#### *4.7.1. VPLIV KONCENTRACIJE IBUPROFENA NA NJEGOVO VGRAJEVANJE V MAGNETNE NANODELCE*

Glede na preliminarne poskuse s težko topnim KAR smo se odločili, da bomo proučili še vgrajevanje in sproščanje z drugo težko topno ZU. Izbrali smo IBU, ki je težko topen v vodi, a ima v prečiščeni vodi še vedno približno dvakrat večjo topnost kot KAR [29]. To je omogočilo, da smo z IBU lahko preverili vpliv spremembe koncentracije ZU na njeno sproščanje. Izvedli smo poskuse sproščanja z delci, ki smo jih polnili z inkubiranjem v raztopinah, ki so imele raztopljen IBU v koncentracijah od 0,5 do 10 % (m/V). Rezultati so predstavljeni na sliki 17.

Na sliki 17 lahko opazimo, da masa sproščene ZU sprva narašča linearno s časom. V začetni fazi sproščanja je opazen »burst« učinek, ki je lahko posledica raztapljanja ZU s površine delcev in/ali nepopolne odstranitve raztopine ZU, ki je bila ujeta med delci. To smo želeli odpraviti s spiranjem površine delcev z etanolom, vendar, kot smo opisali v poglavju 4.6., metoda spiranja, ki smo jo uporabili glede na rezultate, ni bila ustrezna.

Iz grafa je razvidno, da se profila sproščanja 7,5 % IBU in 10 % IBU delno prekrivata. Predvidevamo, da je pri koncentracijah 7,5 % IBU in 10 % IBU količina ZU že previsoka glede na delež tetradekanola, zato tetradekanol ne zadrži sproščanja. Lahko pa je to tudi posledica nasičenosti vezavnih mest na ogrodju delcev zaradi interakcij (vodikovih vezi) karboksilnih skupin IBU s silanolnimi skupinami na ogrodju delcev. Enako je pokazal tudi Irajji [5], saj je povečevanje koncentracije raztopine za vgrajevanje ZU povečalo količino vgrajene ZU le do neke meje, nato pa je le-ta nehala naraščati [5].



Slika 17: Sproščena masa IBU iz superparamagnetnih nanodelcev v katere smo ZU vgradili iz 0,5 % - 10% raztopin IBU v raztopini tetradekanola v etanolu (n=1).

Ugotovili smo, da je za vgradnjo IBU primerna 10 % (m/m) etanolna raztopina tetradekanola, saj pri nobenem izmed poskusov nismo opazili nastanka agregatov. Po zadnjem merjenju po 120 min smo dodali še svež medij, tako da smo zagotovili primerne (sink) pogoje za sproščanje celotne količine potencialno vgrajene ZU.

V preglednici XIV smo zbrali podatke meritev sproščene ZU po 120 min, naslednji dan (po 24 h) in z dodatnim 5 min segrevanjem ter na podlagi teh rezultatov izračunali, kakšna masa IBU se je vgradila v delce. S segrevanjem smo stalili tetradekanol in tako preverili,

ali se sprosti še kaj ZU, ki je zaostala v tetradekanolu. Ta rezultat smo nato uporabili za izračun masnega deleža ZU, ki se je vgradila v delce. Ugotovili smo, da se je sproščena masa ZU v vseh primerih po 24 urah še nekoliko povečala, kar potrjuje, da tetradekanol upočasnjuje sproščanje ZU iz nanodelcev. Ugotovili smo, da se je pri segrevanju masa sproščene ZU v povprečju povečala za 10,2 % (m/m). Porast je bil najmanjši pri nanodelcih, ki smo jih polnili s 7,5 % (m/V) raztopino IBU, kjer se je masa povečala za 3,6 % (m/m), največji pa je bil pri poskusu sproščanja, kjer smo vgradili IBU iz 0,5 % (m/V) raztopine. Prirast mase je bil v tem primeru 20,4 % (m/m).

Za izračun mase ZU, ki se je vgradila v delce, smo uporabili podatke o sproščeni masi po segrevanju in koncentraciji delcev, ki smo jo določili z liofilizacijo, t.j. 2,87 mg/ml.

Rezultati so pokazali, da je sproščanje daljše od 120 min, kar se ne sklada z ugotovitvami prvih poskusov. V preglednici XIV so zbrani podatki o masi sproščene IBU, vplivu segrevanja na količino sproščene ZU in preračun masnega deleža sproščene IBU glede na maso delno votlih nanodelcev.

**Preglednica XII: Vpliv segrevanja na količino sproščene ZU in delež vgrajene ZU v odvisnosti od koncentracije ZU v raztopini za vgrajevanje v različnih časovnih točkah (n=1).**

IBU	sproščena masa IBU v različnih časovnih točkah (µg)			mg IBU/mg delcev
	120 min	naslednji dan	naslednji dan + segrevanje	
0,5 %	47,1	42,1	50,7	0,071
1 %	86,9	99,3	105,3	0,147
2,5 %	131,0	162,5	175,5	0,245
5 %	289,3	419,2	474,9	0,662
7,5 %	455,5	532,6	551,6	0,769
10 %	390,3	610,3	671,3	0,936

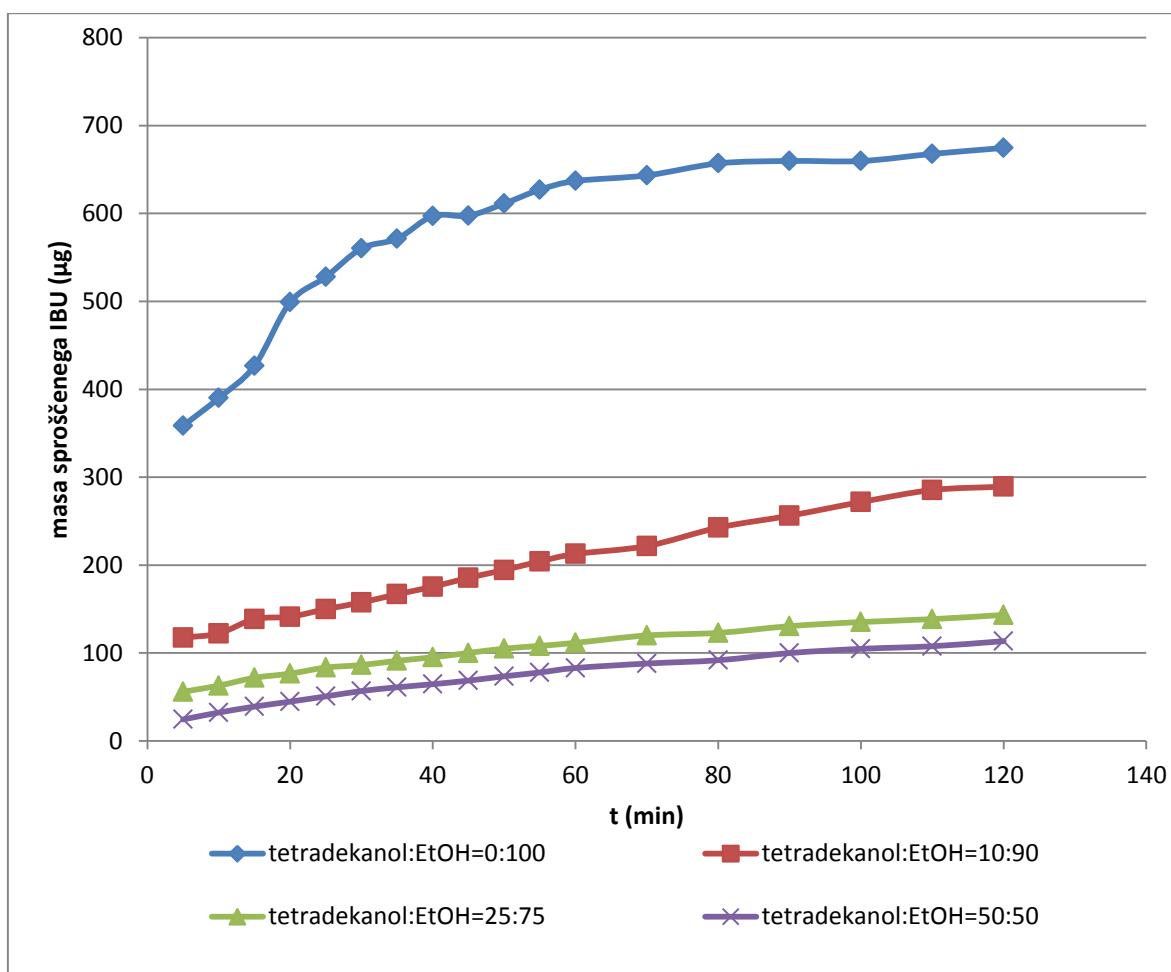
#### 4.7.2. VPLIV DELEŽA TETRADEKANOLA NA VGRAJEVANJE ZU V DELNO VOTLE SUPERPARAMAGNETNE NANODELCE

##### 4.7.2.1. VGRAJEVANJE IBUPROFENA iz 5 % RAZTOPINE

Najprej smo preverili, kakšen je vpliv deleža tetradekanola v topilu na vgrajevanje ZU v nanodelce. Glede na predhodne rezultate, smo si za vgrajevanje najprej izbrali 5 % raztopino IBU. Ta je bil raztopljen v topilu, ki je vsebovalo tetradekanol in etanol v masnem razmerju 10 : 90, nato pa smo delež tetradekanola povečali na 25 % (m/m) in 50 % (m/m). Vpliv tetradekanola na sproščanje ZU iz delcev, ki smo jih polnili s 5 % IBU (m/V), predstavlja slika 18. Zelo zanimivo je bilo, da smo glede na izkušnje z delci pri

merjenju ozadij in glede na predhodne poskuse pri razvoju metode predvidevali, da se bodo delci združili v velike skupke, ko bo delež tetradekanola v raztopini za vgrajevanje 25 % ali več, a s prostim očesom vidnih agregatov presenetljivo ni bilo. Še eno zanimivo odkritje je bilo tudi, da smo v nasprotju s KAR, IBU uspeli vgraditi v delce tudi iz etanolne raztopine (brez tetradekanola).

Ko smo opazovali vpliv sproščanja IBU iz delcev v katere smo vgrajevali ZU iz 5 % (m/V) raztopine IBU v 50 % raztopini tetradekanola v etanolu, se je po inkubiranju čez noč pojavil sediment delcev, ki pa se je zlahka redispergirala, tako da nismo opazili s prostim očesom vidnih agregatov. Vendar je bila zadnja ločba v magnetnem polju preden smo odstranili raztopino ZU hitrejša kot običajno, supernatant pa brezbarven, kar kaže na povezovanje delcev. V vodnem mediju so se ti redispergirali, vendar so bile koncentracije sproščene ZU v primerjavi z rezultati, kjer je bil delež tetradekanola v raztopini za vgradnjo 25 % (m/m), precej visoke, kar je lahko posledica tetradekanola, ki je povezal delce in se ni vgradil v njihovo notranjost, ampak je tvoril povezave med delci.



Slika 18: Vpliv deleža tetradekanola v topilu za vgrajevanje na sproščanje IBU iz delcev, v katere smo vgrajevali iz 5 % raztopine IBU (n=1).

S profilov sproščanja, ki so prikazani na sliki 18 je razvidno, da se s povečanjem deleža tetradekanola v raztopini med vgrajevanjem ZU sproščanje ZU upočasnijo. Po 24 h sproščanja tj. naslednji dan smo vzorce segreli, da bi se iz delcev sprostil vsa učinkovina, in določili končno koncentracijo sproščene ZU. Ugotovili smo, da se s povečanjem deleža tetradekanola v etanolni raztopini vgradi manjša masa ZU. Sproščena masa ZU narašča linearno, razen v primeru, ko smo ZU vgrajevali iz etanolne raztopine. V tem primeru smo opazili izrazito začetno sproščanje (*angl. burst release*) v prvi uri in bolj počasno sproščanje preostanka ZU. Vsa učinkovina pa se je iz delcev sprostila v prvih dveh urah. V preglednici XV smo zbrali podatke o sproščeni količini ZU v različnih časovnih točkah in preračunali deleža vgrajenega IBU glede na maso delcev.

Rezultati kažejo, da s povečevanjem količine tetradekanola v raztopini med vgrajevanjem lahko vplivamo na vgrajevanje ZU v delce, hkrati pa z njim zadržimo sproščanje. Ali ta zaključek drži, bi morali preveriti v nadaljnjih raziskavah tj. dodatno bi morali proučiti, ali segrevanje vzorca res omogoči sproščanje celotne količine vgrajene učinkovine, ali bi bilo potrebno delce raztopiti v drugem topilu.

Preglednica XIII: Sproščena količina IBU iz delcev in celokupna količina vgrajene ZU, ki smo jo vgrajevali iz 5 % raztopine IBU, ki smo ga v delce vgradili s pomočjo različnih topil, in masa ZU, ki se je vgradila v delce (n=1).

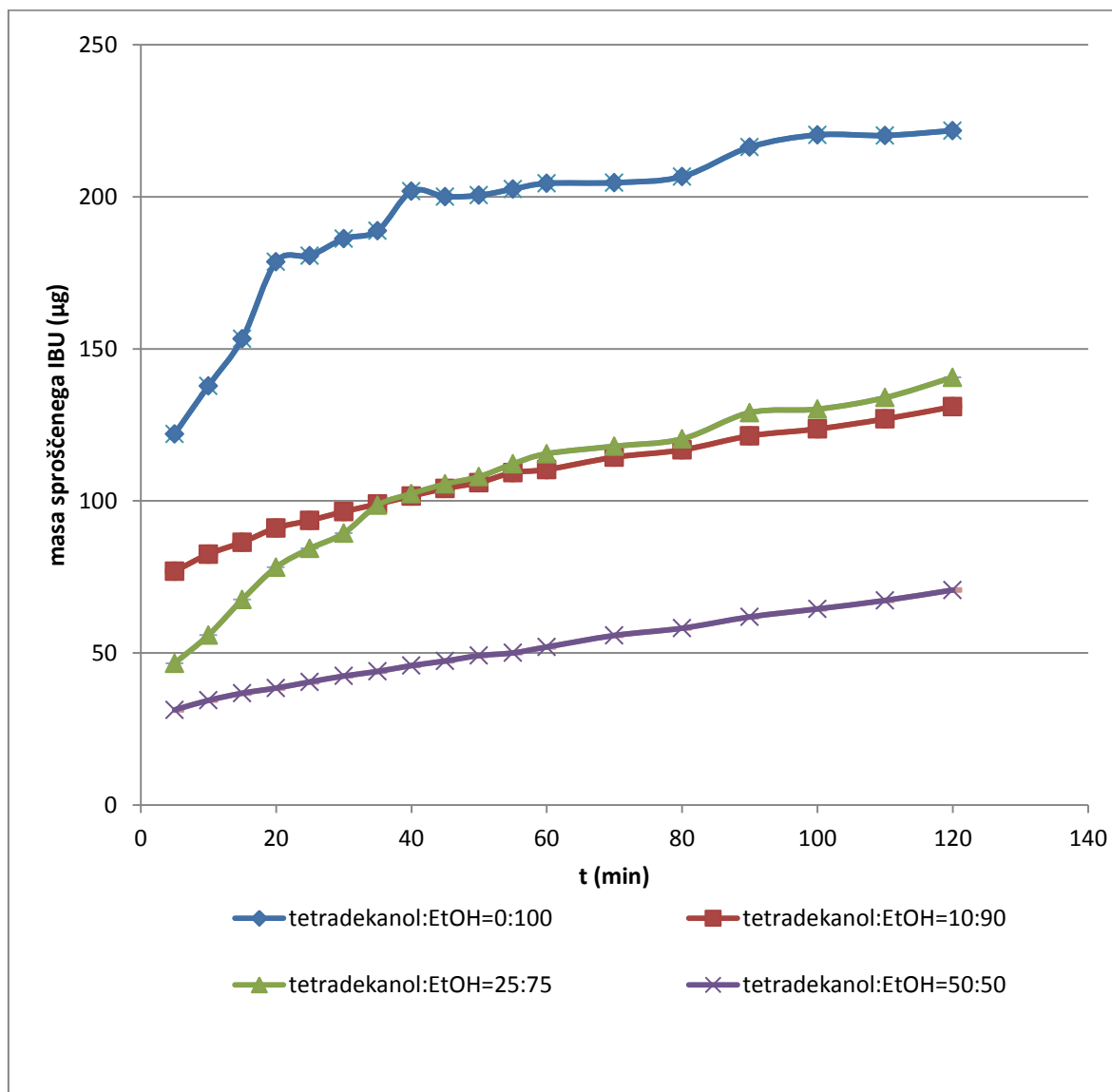
tetradekanol : etanol (m : m)	sproščena masa IBU v različnih časovnih točkah (µg)			mg IBU/ mg delcev
	120 min	naslednji dan	naslednji dan + segrevanje	
0 : 100	674,6	610,3	671,3	0,936
10 : 90	289,3	419,2	474,9	0,662
25 : 75	143,3	209,3	218,6	0,305
50 : 50	113,5	154,7	205,6	0,287

#### 4.7.2.2. VGRAJEVANJE IBUPROFENA IZ 2,5 % RAZTOPINE

Ugotovitve, ki smo jih pridobili v poskusih, kjer smo IBU vgrajevali iz 5 % raztopine, smo želeli preveriti še na vzorcih, kjer smo za vgrajevanje uporabili 2,5 % raztopino IBU. Zanimalo nas je tudi, ali med postopkom vgrajevanja delci agregirajo. S prostim očesom vidnih agregatov nismo zaznali v nobenem izmed primerov, zato smo sklenili, da na sposobnost redispersiranja vpliva tudi ZU. Edini vzorec, ki je nakazoval pojav agregatov, je bil vzorec, kjer smo IBU vgrajevali iz 25 % raztopine tetradekanola v etanolu. V tem primeru so se med ločevanjem v magnetnem polju delci ločevali opazno hitreje v primerjavi z drugimi vzorci. Po pol ure sproščanja smo opazili, da se delci ne ločujejo več tako hitro in vzorec se je obnašal kot vsi drugi. Prvih 35 min je bilo sproščanje hitro, nato pa se je upočasnilo. Hitrejše začetno sproščanje bi bilo lahko posledica tetradekanola, ki se je vezal na površino delcev, v sebi pa je imel vgrajeno ZU. Tudi v tem primeru smo

potrdili, da na stabilnost delcev vplivata tako ZU kot tudi topilo za ZU, s pomočjo katerega le-to vgradimo v delce.

Tudi v primeru vgrajevanja ZU iz 2,5 % (m/V) etanolne raztopine IBU, smo ugotovili zelo hitro sproščanje IBU v prvi uri, tako kot v primeru vgrajevanja ZU iz 5 % (m/V) raztopine IBU. Rezultat dokazuje, da dodatek tetradekanola v raztopino za vgrajevanje uspešno zadrži sproščanje ZU iz nanodelcev in omogoči enakomerno sproščanje IBU iz delcev (brez izrazitega začetnega »burst release«).



Slika 19: Vpliv deleža tetradekanola v raztopini za vgrajevanje na sproščanje IBU iz delcev, v katere smo vgrajevali ZU iz 2,5 % raztopine IBU (n=1).

Zanimivo je, da so bili masni deleži vgrajenega IBU zelo podobni, ne glede na količino tetradekanola v raztopini za vgrajevanje, kot smo to prikazali v preglednici XVI. V vseh primerih se je v delce vgradilo od 0,234 mg do 0,289 mg IBU na mg delcev. Končna



sproščena masa ZU je bila pri vseh vzorcih zelo podobna, medtem ko je bila koncentracija po prvih 120 min še zelo različna (preglednica XVI). Analize vzorcev po rahlem segrevanju kažejo zelo majhne spremembe glede na analizo pred segrevanjem, kar kaže, da se je iz vseh vzorcev v 24 urah sprostita skoraj vsa ZU.

Preglednica XIV: Zbrani rezultati sproščanja iz superparamagnetnih nanodelcev v katere smo ZU vgradili iz 2,5 % raztopine IBU, ki smo ga v delce vgradili s pomočjo različnih topil, in masa ZU, ki se je vgradila v delce (n=1).

Tetradekanol : etanol (m : m)	sproščena masa IBU v različnih časovnih točkah ( $\mu\text{g}$ )			mg IBU/mg delcev
	120 min	naslednji dan	naslednji dan + segrevanje	
0 : 100	221,8	203,6	203,6	0,284
10 : 90	131,0	162,5	175,5	0,245
25 : 75	140,6	166,8	167,9	0,234
50 : 50	71,0	203,6	206,4	0,289

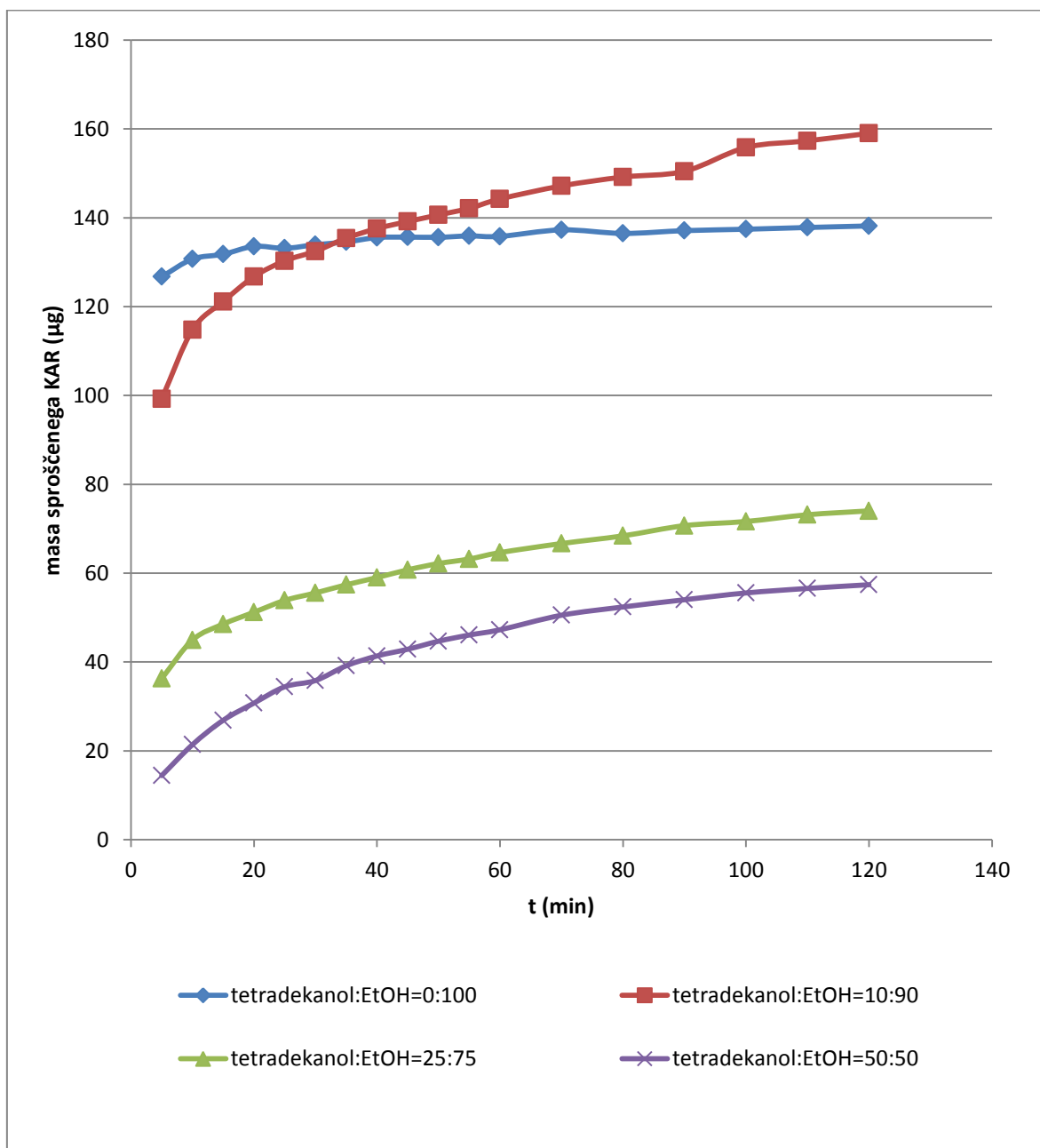
#### 4.7.2.3. VGRAJEVANJE KARVEDILOLA IZ 1 % RAZTOPINE KARVEDILOLA

V sklopu raziskav smo proučevali tudi vpliv tetradekanola na vgrajevanje in sproščanje KAR iz superparamagnetnih nanodelcev. Za vgrajevanje smo želeli uporabiti čim višjo koncentracijo KAR, a se je le-ta že v primeru 2 % (m/V) raztopine iz nje po 24 h oboril, zato smo za vgrajevanje uporabili 1 % (m/V) raztopino. Za poskuse sproščanja smo najprej uporabili 250  $\mu\text{l}$  disperzije delcev, ki smo jih inkubirali v 1 % raztopini KAR, a je bila količina sproščene ZU pod mejo detekcije, zato smo se odločili, da povečamo volumen vhodnega vzorca na 500  $\mu\text{l}$  in ohranimo začetni volumen medija za sproščanje 6 ml. S tem smo želeli zmanjšati možnost napak in povečati razlike med vzorci. Pri vzorcih z vgrajenim IBU smo tudi pri večjih deležih tetradekanola v mediju za vgrajevanje opazili, da so se delci učinkovito dispergirali, medtem ko se v primeru vzorcev s KAR to ni zgodilo. Ugotovili smo, da se delci učinkovito dispergirajo le v primeru, ko je delež tetradekanola 10 % (m/m) ali manj, medtem ko smo pri 25 % (m/m) in 50 % (m/m) tetradekanola opazili nastanek agregatov.

Tudi v primeru vgrajevanja KAR smo potrdili, da vgrajevanje iz etanolnih raztopin ni učinkovito, saj smo zaznali sproščanje ZU le v prvih 15 min. Poskus smo tudi ponovili in dobili enak rezultat. Takšne rezultate smo dobili že v preliminarnih poskusih, ki so bili predstavljeni v prejšnjem poglavju, vendar smo jih takrat še pripisali temu, da še nismo uporabili pristopa za korekcijo ozadja in da je bilo v kivetu preveč delcev, kar je motilo meritev. V nasprotju s KAR smo IBU uspeli vgraditi v delce tako iz 5 % kot tudi iz 2,5 % etanolne raztopine.

Opazimo lahko, da je oblika profilov sproščanja KAR v primerjavi z IBU drugačna, saj je sproščanje v prvih 15 min hitrejše (»burst release«), nato pa narašča linearno (slika 20). To

verjetno kaže prisotnost KAR v tetradekanolu na površini delcev, zato bi morali razviti primeren način za spiranje površine delcev, da bi nevgrajeno ZU lahko odstranili. Kljub nastanku agregatov delcev pa so profili sproščanja vseh vzorcev s tetradekanolom podobni. Potrdili smo, da je tetradekanol primerna pomožna snov za pripravo delcev s prirejenim sproščanjem. Rezultati pa kažejo tudi, da se brez tetradekanola KAR v delce sploh ne vgradi.



Slika 20: Vpliv deleža tetradekanola v raztopini za vgrajevanje na sproščanje KAR iz delcev, v katere smo vgrajevali ZU iz 1 % raztopine KAR (n=1).

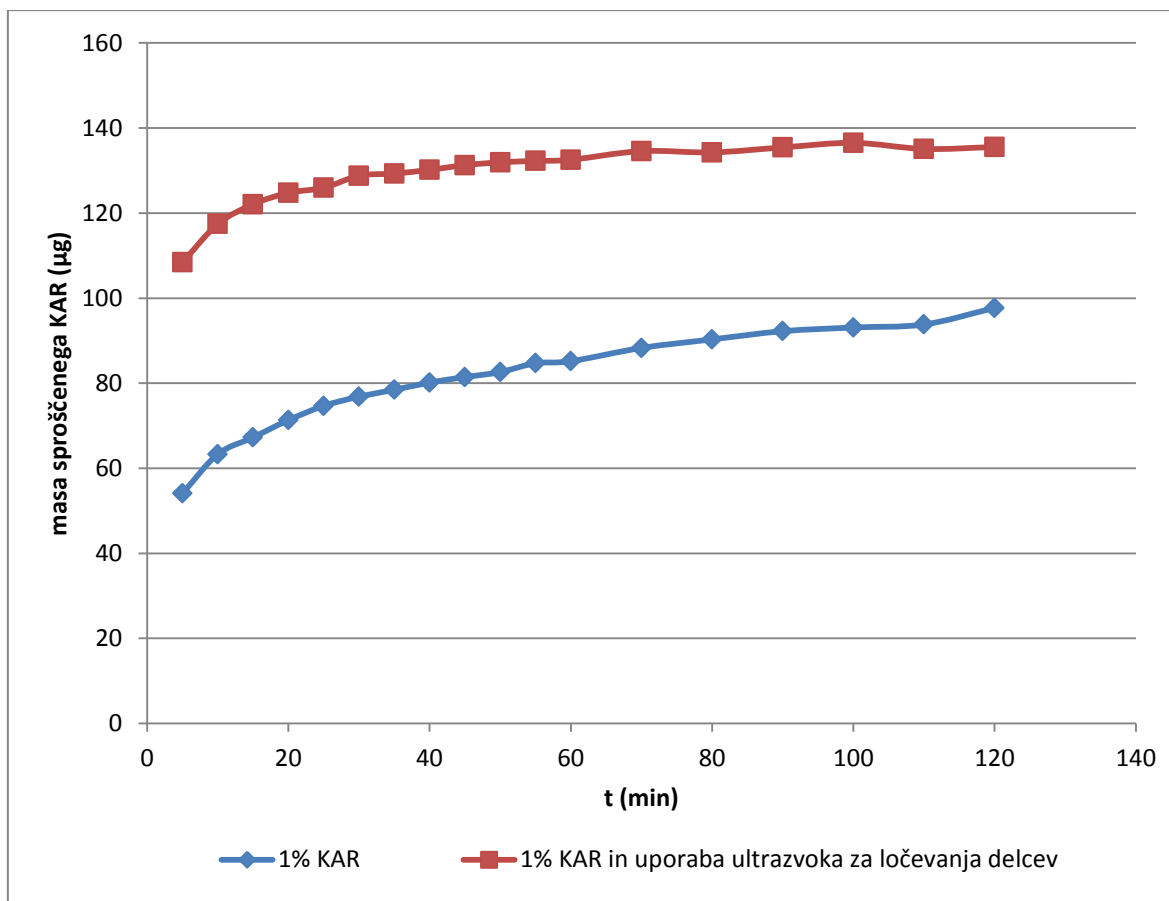
Opazili smo tudi, da se pri segrevanju na 50 °C agregati redispergirajo na posamezne delce, saj se tetradekanol pri tej temperaturi že utekočini. To potrjuje hipotezo, da tetradekanol povzroči nastanek agregatov. Ob uporabi delcev pri zdravljenju z magnetno hipertermijo morda nastanek agregatov ne bi bil problem, a pri telesni temperaturi je tetradekanol še vedno v trdnem agregatnem stanju, zato lahko potencialni agregati povzročijo embolijo krvnih žil [36].

S povečevanjem deleža tetradekanola se je v delce vgradilo manj ZU, kar sovpada z rezultati v primeru delcev z IBU, ki smo ga vgrajevali iz 5 % (m/V) raztopine IBU. Kot pri vseh ostalih vzorcih, se je masa sproščenega KAR nekoliko povečala po segrevanju, vendar se je velika večina ZU sprostil že pred segrevanjem (preglednica XVII).

Preglednica XV: Zbrani rezultati sproščanja KAR iz delcev, v katere smo ZU vgrajevali iz 1 % raztopine KAR s pomočjo različnih topil in masa KAR, ki se je vgradila v delce (n=1).

Tetradekanol : etanol (m : m)	sproščena masa IBU v različnih časovnih točkah (µg)			mg KAR/ mg delcev
	120 min	naslednji dan	naslednji dan + segrevanje	
0 : 100	138,2	125,6	132,8	0,0926
10 : 90	159,0	191,2	205,2	0,143
25 : 75	74,0	89,7	93,6	0,0653
50 : 50	57,4	74,1	75,1	0,0524

Pri prvem poskusu vgrajevanja ZU iz etanolne raztopine z 10 % (m/m) tetradekanola se delci niso dispergirali, zato smo se odločili, da bomo preverili, ali lahko s pomočjo ultrazvoka dispergiramo agregate, po tem, ko smo delce ločili v magnetnem polju in jih dispergirali v vodi. Tako smo mikrocentrifugirko, kjer so bili dispergirani delci v vodi, prenesli v UZ kadičko in ugotavljali najkrajši čas soniciranja, ki je potreben, da se agregati dispergirajo. Ugotovili smo, da tak postopek dispergiranja delcev povzroči pospešeno sproščanje ZU, saj se je že po 30 s soniciranja sprostil skoraj ves KAR. Rezultate smo primerjali s sproščanjem iz delcev, ki jih nismo sonicirali. Rezultati so prikazani na sliki 21. Poskus je pokazal, da uporaba ultrazvoka ni primerna za dispergiranje agregatov delcev, saj povzroči pospešeno sproščanje učinkovine (slika 21). Končna analiza vsebnosti ZU je pokazala, da je bila vgrajena masa KAR v obeh primerih zelo podobna (preglednica XVIII).

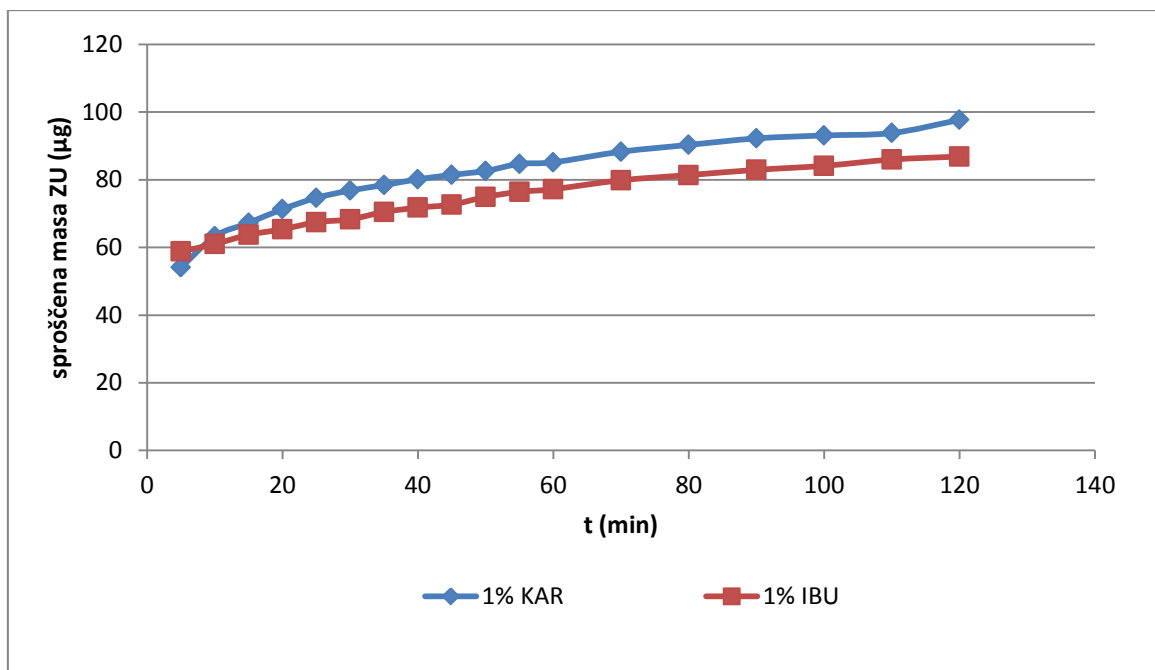


Slika 21: Vpliv uporabe ultrazvoka za redispersiranje agregatov na hitrost sproščanja KAR (n=1).

Preglednica XVI: Zbrani rezultati sproščanja KAR iz delcev, v katere smo ZU vgrajevali iz 1 % raztopine KAR in preverili vpliv ultrazvoka na sproščanje KAR iz delcev (n=1).

	sproščena masa IBU v različnih časovnih točkah (µg)			mg KAR/ mg delcev
	120 min	naslednji dan	naslednji dan + segrevanje	
1 % KAR	97,7	125,5	133,1	0,185
1 % KAR + ultrazvok	135,5	137,8	143,4	0,199

Edina profila sproščanja modelnih učinkovin, ki jih lahko direktno primerjamo, sta profila, ko smo ZU vgrajevali iz 1 % (m/V) raztopine ZU v 10 % (m/m) raztopini tetradekanola v etanolu. Profila sproščanja obeh modelnih učinkovin sta zelo podobna (slika 22, preglednica XIX). Za obe učinkovini je značilno hitro začetno sproščanje (»burst release«).



Slika 22: Primerjava profilov sproščanja KAR in IBU iz delcev v katere smo vgradili ZU iz 1 % raztopine ZU v 10 % raztopini tetradekanola v etanolu (n=1).

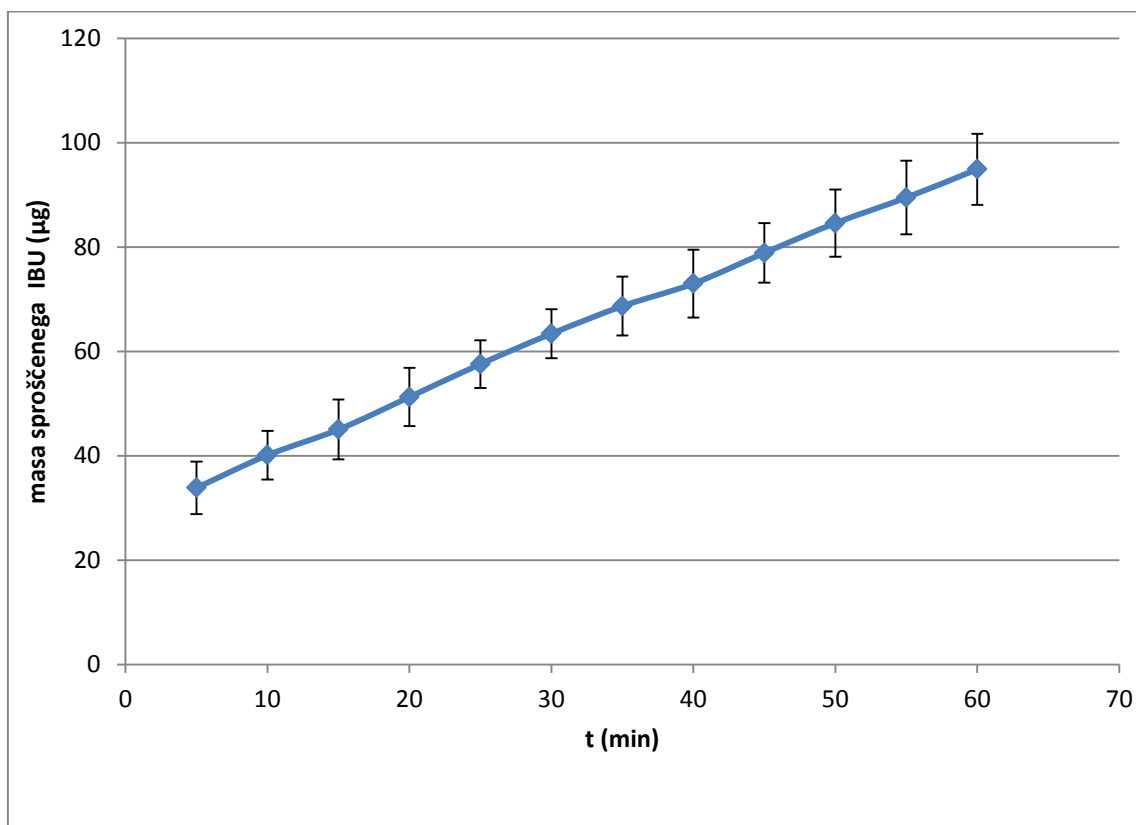
Vidimo lahko, da se glede na maso delcev pri 1 % (m/V) raztopinah ZU in 10 % masnem deležu tetradekanola, v delce vgradi zelo podobna količina ZU. Masa ZU, ki se je vgradila na mg delcev, je bila: 0,147 mg (1 % IBU), 0,185 mg (1 % KAR, 250 µl delcev) in 0,143 mg (1 % KAR, 500 µl delcev).

Preglednica XVII: Zbrani rezultati sproščene mase KAR in IBU iz delcev, v katere smo ZU vgrajevali iz 1 % raztopine ZU s pomočjo 10 % (m/m) raztopine tetradekanola v etanolu in masa ZU, ki se je vgradila v delce (n=1).

	sproščena masa IBU v različnih časovnih točkah (µg)			mg ZU/mg delcev
	120 min	naslednji dan	naslednji dan + segrevanje	
1% KAR	97,7	125,5	133,1	0,185
1% IBU	86,9	99,3	105,3	0,147

V magistrski nalogi smo želeli preliminarno ovrednotiti širok nabor parametrov, ki vplivajo na lastnosti magnetnih delcev, in tako ugotoviti, ali je naš pristop primeren za nadaljnje raziskovanje. Ker je bilo raztapljanje magnetnega jedra eden izmed omejujočih dejavnikov pri ponovljivi pripravi delcev z delno raztopljenimi magnetnimi jedri, smo bili pri poskusih omejeni s količino vzorca. V nalogi smo tako poskuse sproščanja izvedeni le na eni paralelki vzorcev. Prioritetno smo želeli ovrednotiti, ali so delci in način raztapljanja magnetnega jedra primerni za nadaljnje vgrajevanje ZU. Nato smo želeli ovrednotiti tudi primernost uporabe sotopila (tetradekanola) pri vgrajevanju ZU in preliminarno ovrednotiti vgrajevanje in sproščanje vsaj dveh modelnih ZU.

Proti koncu naših raziskav smo med drugim želeli oceniti, kakšna je ponovljivost naših poskusov, zato smo v treh paralelah izvedli tudi vgrajevanje in sproščanje iz delno votlih magnetnih nanodelcev, v katere smo IBU vgradili iz 5 % (m/V) raztopine IBU, ki smo ga raztopili v 25 % (m/m) raztopini tetradekanola v etanolu. Rezultati so prikazani na sliki 23 in kažejo, da je ponovljivost dobra, kar dokazuje, da je metoda vgrajevanja ZU ustrezna in je nadaljevanje poskusov smiselno.



Slika 23: Sproščanje IBU iz delcev, v katere smo vgrajevali ZU iz 5 % raztopine IBU, ki je bila raztopljena v 25 % (m/m) raztopini tetradekanola v etanolu (n=3).

#### 4.8. UPORABA ULTRACENTRIFUGIRANJA V PRESKUSU SPROŠČANJA ZDRAVILNE UČINKOVINE

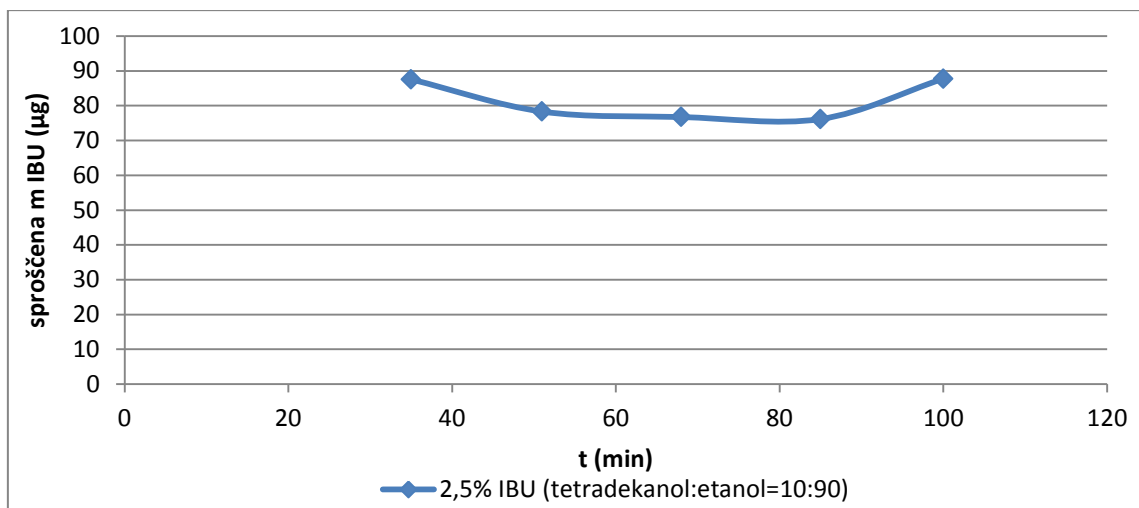
Poleg ločevanja v magnetnem polju smo proučili tudi uporabnost alternativnega pristopa tj. ločevanja delcev od disperznega medija z ultracentrifugiranjem. Ločevanja delcev od medija z ultracentrifugiranjem smo se lotili predvsem zato, ker smo v nekaj začetnih poskusih dobili nemerljive spektre, ki so bili posledica prevelike količine dispergiranih delcev v kivetu. S centrifugiranjem smo tako želeli dobiti bister supernatant, ki ne bi vseboval delcev. Delce nam je uspelo uspešno ločiti, saj je bil supernatant v vseh primerih bister in brezbarven, delci pa so se zbrali ob robu ali na dnu mikrocentrifugirke. Izgled disperzij delcev pred in po ločbi je prikazan na sliki 24. Natehtane mase IBU in volumni topila za ZU, ki smo jih uporabili, so zbrane v prilogi I.



Slika 24: Disperzija delcev pred ultracentrifugiranjem (levo) in po ločbi (desno).

##### Delno porozni superparamagnetni nanodelci z vgrajenim IBU iz 2,5 % (m/V) raztopine IBU (tetradekanol : etanol = 10 : 90)

Količina sproščene ZU je bila v vseh vzorcih podobna, kar pomeni, da razlik v različnih časovnih točkah nismo zaznali (slika 25). Majhne razlike v količini sproščene ZU so lahko tudi posledica napak pri pipetiranju, saj smo operirali z zelo majhnimi volumni. Takšen pristop ločevanja delcev se je izkazal primeren za ločevanje delcev od medija, ne pa tudi za proučevanje sproščanja vgrajene ZU.



Slika 25: Količina sproščene učinkovine, ki smo jo določili po postopku ultracentrifugiranja (n=1).

Delno porozni superparamagnetni nanodelci z vgrajenim IBU iz 10 % raztopine IBU (tetradekanol : etanol = 10 : 90)

S povečanjem koncentracije IBU v raztopini za vgrajevanje smo želeli doseči, da je 50 µl suspenzije nanodelcev v centrifugirki po dodatku vode res nasičenih z raztopino ZU, saj bi bil lahko v prejšnjem primeru vzrok prenizka koncentracija IBU, da se raztapljanje ni zares ustavilo. Ta poskus smo morali zaradi pričakovanih visokih koncentracij ZU izvesti v večjih centrifugirkah, kjer smo volumen, s katerimi smo želeli ponovno omogočiti raztapljanje ZU, dopolnili do 15 ml. Za takšne volumne smo se odločili glede na pričakovane koncentracije IBU, ki smo jih pridobili v predhodnih meritvah. V tem primeru so bili vsi rezultati izven območja umeritvene premice pod prvo točko, tako da je bil najverjetneje volumen vode prevelik. Vzorce bi lahko dodatno segreli, s čimer bi ugotovili, ali je bila težava pri sproščanju povezana tudi s tetradekanolom.

Naš pristop ločevanja superparamagnetnih nanodelcev ni bil uspešen, vendar bi bilo z optimizacijo metode tudi na ta način verjetno mogoče določiti koncentracijo. Določanje sproščanja s pomočjo ultracentrifugiranja bi bilo še posebej primerno, če bi uporabljali bolj koncentrirane magnetne tekočine, kjer bi delci motili meritve. Že pri naših prvih meritvah so delci motili meritve, ko smo 500 µl vzorca delcev sproščali v volumnu 3 ml.

Kljub temu bi morali ovrednotiti vpliv centrifugiranja na sproščanje ZU, saj je bil skupni čas centrifugiranja okrog 25 min, pri tarčni hitrosti pa je centrifuga delovala 5 min. Ostalo je bil čas, ko se je v napravi vzpostavljala nižja tlak in je centrifuga pospeševala do želene hitrosti oz. se je zaustavljala. Poskusili bi lahko tudi zmanjšati hitrost centrifugiranja, saj bi s tem skrajšali čas ultracentrifugiranja in zmanjšali njegov vpliv na sproščanje.



#### 4.9. VREDNOTENJE SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV Z ZDRAVILNO UČINKOVINO ZA UPORABO V NAMENE ZDRAVLJENJA

Magnetno jedro omogoča nanodelcem številne možnosti uporabe, ki pa so večinoma še v fazi razvoja in raziskav. Najbolj verjeten način uporabe takšnih nanodelcev v terapiji, ki je že v fazi kliničnih testiranj, je magnetna hipertermija. Magnetni nanodelci v notranjosti delcev iNANOvative™, ki smo jih uporabili, so dovolj majhni, da imajo izražene superparamagnetne lastnosti, ki so pomembne za segrevanje v AMF. Na SLP delcev pa poleg velikosti delcev vpliva tudi njihova oblika in kristalna struktura. Ugotovili so, da je okrogla oblika delcev železovega oksida, ki sestavljajo jedro iNANOvative™ delcev, najboljša, da se v celičnem okolju njihov SLP čim bolj ohranja [12]. Poleg celičnega okolja pa na segrevanje vpliva tudi dejstvo, da so delci v jedru skupka tesno skupaj, kar povzroči nastanek dipolnih interakcij, to pa SLP nekoliko zmanjša [13].

Superparamagnetni nanodelci na osnovi železovih oksidov se že uporabljajo kot kontrastno sredstvo pri slikanju z magnetno resonanco, npr. za slikanje jeter, saj se tam pasivno nalagajo, ker jih privzamejo celice retikuloendotelijskega sistema. Ker je retikuloendotelijski sistem okrnjen v tumorskih tkivih, lahko z uporabo takšnih delcev opazujemo tudi tumorje [3]. Poleg diagnostike bi disperzijo superparamagnetnih nanodelcev lahko uporabili tudi za terapijo, saj bi tako lahko z enim dostavnim sistemom zdravili in hkrati spremljali ali celo usmerjali potek zdravljenja (teranostika).

Nanodelci, ki smo jih uporabili v raziskavi, imajo magnetno jedro obloženo s slojem silike, ki zagotavlja posebne lastnosti delcev. Ena izmed osnovnih lastnosti je ta, da sloj silike zagotavlja stabilnost in ustrezne reološke lastnosti disperzije, da jo lahko injiciramo [15]. Na proste silanolne skupine, ki so prisotne na površini delcev, lahko vežemo razne molekule, kar ponovno prinese določene prednosti. Z ustreznim načrtovanjem in modifikacijo površine z ligandi lahko pripravimo dostavni sistem za ciljano dostavo. Študija [26], kjer so v delce vgradili PTX, je pokazala, da sočasna uporaba obeh pristopov ciljanja, tako magnetnega kot aktivnega z ligandi, daje sinergistične rezultate in je bolj učinkovit pristop v primerjavi s pasivnim ciljanjem. To so dokazali na osnovi zdravljenja mišjih tumorjev.

*Zhang s sodelavci* [27] je magnetne nanodelce pripravil na način, ki je bil najbolj podoben našemu. Tudi ta skupina raziskovalcev je za vgrajevanje ZU uporabila metodo inkubiranja delcev v raztopini ZU tj. delce so 24 ur inkubirali v raztopini DOX, ki je slabo topen.

Ugotovili so, da kljub temu, da je ogrodje delcev hidrofilno, so lahko v notranjost delcev vgradili težko vodotopen DOX. Vgradili so od 0,2 % do 32 % (m/m) ZU, kar je podobno našim rezultatom, le da je nam uspelo vgraditi tudi nekoliko večje količine ZU. Pokazali so, da je magnetno ciljanje in hkratna vgradnja ZU primeren pristop za zdravljenje tumorjev, saj so delce z DOX lahko usmerjali s pomočjo zunanega magnetnega polja. Zopet se je izkazalo, da je takšen način smiseln za doseg čim boljše učinkovitosti zdravljenja [27]. Pri interpretaciji rezultatov moramo upoštevati dejstvo, da so bili tumorji na živalskih modelih blizu kože, kar je pomenilo večjo jakost magnetnega polja na tarčnem mestu ter omogočilo dobro odzivnost delcev na magnetno polje. Če bi takšne delce namesto z lokalnim vnosom aplicirali z intravenskim ali intraarterijskim injiciranjem, bi na nalaganje delcev na tarčnem mestu vplivale številne spremenljivke, kot so pretok v žilju, oddaljenost od magneta in koncentracija magnetnih delcev. V takšnem primeru imajo boljše lastnosti večji delci, saj zaradi boljše magnetne odzivnosti, lažje kljubujejo pretoku v žilju. Prednost uporabe delcev iNANOvative™ je njihova zgradba, saj nimajo v strukturi enega samega magnetnega delca, temveč skupek magnetnih delcev, ki je obdan z oblogo iz silike. Sklenemo lahko, da je magnetno ciljanje mogoče v primeru tumorjev, ki se nahajajo blizu telesne površine in v primeru tkiv, kjer je pretok krvi počasnejši.

Na koloidno stabilnost delcev sta vplivala tudi tetradekanol in ZU. Vpliv tetradekanola smo lahko opazili, ko smo merili vpliv ozadja na spektrofotometrično analizo ZU v vzorcu. Ozadje smo morali popraviti pri vsaki meritvi posebej, saj se je spreminjalo glede na količino delcev v kivetu, ko pa smo volumen medija povečali, pa se je vpliv ozadja precej zmanjšal. Ko smo delce čez noč inkubirali v 10 % (m/m) raztopini tetradekanola v etanolu, so se naslednji dan po magnetnem ločevanju dobro redispersgirali v vodi; v primeru večjega deleža tetradekanola v raztopini (25 % (m/m) in 50 % (m/m) ) pa je z večanjem deleža tetradekanola naraščal tudi delež skupkov delcev. Tako vidimo, da moramo lastnosti sistema oceniti kot celoto. Ocenjujemo, da je tetradekanol primerno topilo za vgrajevanje ZU, saj so v njem topne tudi zelo težko topne ZU. Temperaturo tališča ima od 38-39 °C, zato je zelo primeren za uporabo v farmacevtskih oblikah s prirejenim sproščanjem, pri katerih lahko dosežemo nadzorovano sproščanje s povišanjem temperature. Poleg tega da izkoriščamo biološko pogojeno povišano telesno temperaturo, ki je prisotna na primer na mestu vnetja, lahko v primeru magnetnih nanodelcev z magnetno hipertermijo povzročimo taljenje tetradekanola in povzročimo hitro sproščanje vgrajene ZU. *Choi s sodelavci* [36] so pokazali, da je tetradekanol za takšen način sproščanja zelo primeren. Manjše polimerne

delce so vgradili v večje tetradekanolne delce in s povišanjem temperature opazovali sproščanje manjših delcev, ki so bili fluorescenčno označeni. Pokazali so tudi, da difuzije ZU iz tetradekanolnih delcev pri fiziološki temperaturi ni bilo. Tako lahko sklepamo, da je tetradekanol vsestranska molekula, ki lahko zavre ali upočasni sproščanje. Nosilni delci iz tetradekanola so se popolnoma stalili v času krajšem od 200 s pri 39 °C, kar potrjuje, da smo v naših poskusih delce segrevali dovolj dolgo, da se je tetradekanol stalil in tako omogočil pospešeno sproščanje ZU, ki je zaostala v tetradekanolu.

Za vgrajevanje ZU smo uporabili etanolno raztopino tetradekanola, s čimer smo pokazali, da lahko s tetradekanolom upočasnimo sproščanje, a hkrati zmanjšamo učinkovitost vgrajevanja ZU. S tetradekanolom kot pomožno snovjo lahko dosežemo »sproščanje po meri«, saj s tetradekanolom podaljšamo čas sproščanja ZU, z lokalno hipertermijo na tarčnem mestu pa lahko pospešimo sproščanje ZU iz delcev in tako zagotovimo, da se vsa sprosti na mestu delovanja. S takšnim pristopom bi lahko izdelali bolj varno zdravilo, saj bi se vsa ZU sprostil lokalno in povzročila manj sistemskih neželenih učinkov. Uporaba hipertermije bi lahko prinesla še dodatne prednosti pri zdravljenju, saj bi povzročila smrt celic, ki so odporne na kemoterapijo, in tako uničila rakave celice.

V preglednici XX so povzeti rezultati poskusov. Ugotovili smo, da masa vgrajene ZU narašča, če povečamo koncentracijo ZU v raztopini za vgrajevanje. Vpliv tetradekanola na vgrajevanje ZU je bil obraten - večja količina tetradekanola v topilu je vodila v manjše vgrajevanje ZU. Zadnji dve trditvi veljata za vse vzorce, razen vzorca, ki smo ga pripravili z 2,5 % raztopino IBU, kjer se s povečevanjem deleža tetradekanola količina vgrajene ZU ni znatno spremenila. Interakcije med topili, delci in ZU so kompleksne, zato bi morali nadalje ovrednotiti, kje v delcih se ZU nahaja – blizu površine ali tudi v notranjosti.

Preglednica XVIII: Povzetek poskusov vgrajevanja ZU v delno votle superparamagnetne nanodelce (n=1).

Tetradekanol : etanol (m:m)							
0 : 100		10 : 90		25 : 75		50 : 50	
ZU	mg ZU/ mg delcev	ZU	mg ZU/ mg delcev	ZU	mg ZU/ mg delcev	ZU	mg ZU/ mg delcev
1 % KAR	0,0926	0,5 % IBU	0,0706	1 % KAR	0,065	1 % KAR	0,0524
2,5 % IBU	0,284	1 % IBU	0,147	2,5 % IBU	0,234	2,5 % IBU	0,288
5 % IBU	0,936	1 % KAR	0,143	2,5 % IBU	0,243	5 % IBU	0,287
		1 % KAR	0,185	2,5 % IBU	0,288		
		2,5 % IBU	0,245	2,5 % IBU	0,279		
		5 % IBU	0,662	5 % IBU	0,305		
		7,5 % IBU	0,769				
		10 % IBU	0,936				

Pri vseh vzorcih smo opazili začetno hitro sproščanje ZU tj. »burst release«, kar je lahko posledica ZU, ki je bila skupaj s tetradekanolom ujeta med delci in ni bila vgrajena v njihovo notranjost ali pa je bila na površini delcev. Težavo smo skušali odpraviti s spiranjem delcev po vgrajevanju ZU z etanolnimi raztopinami, vendar smo bili v vseh primerih neuspešni. Omejujoč dejavnik je bilo tudi ločevanje delcev iz etanolnega medija v magnetnem polju, ki je bilo počasno. Morda bi težavo lahko rešili z uporabo močnejšega magneta, ki bi omogočil hitrejše ločevanje delcev iz medija po spiranju ali pa z drugačnim postopkom spiranja.

Znana je tudi že prva uporaba superparamagnetnih nanodelcev za zdravljenje rakavih obolenj z uporabo hipertermije kot adjuvantne terapije. Delci, ki se že uporabljajo za zdravljenje, so v formulaciji veliko bolj koncentrirani kot naša magnetna tekočina, saj prva vsebuje 112 mg delcev železovega oksida na ml disperzije za injiciranje. V povprečju so na  $\text{cm}^3$  tumorja injicirali 31,36 mg delcev železovega oksida [23]. Če bi injicirali v tumor enako maso naših delcev, bi lahko v tumor vnesli od 2,2 do 29,3 mg IBU in od 1,6 do 4,5 mg KAR na  $\text{cm}^3$  tumorja.

## 5. SKLEP

- Z metodo nadzorovanega delnega raztapljanja nanodelcev železovega oksida s klorovodikovo kislino lahko pripravimo delno votle delce iNANOvative™, ki izkazujejo superparamagnetne lastnosti in so primerni za vgrajevanje težko topnih ZU, kot sta IBU in KAR. V nadaljevanju bi bila smiselna priprava delcev s spremenjeno površino, ki bi zagotavljala fizikalno stabilnost delcev v kislem, saj bi v disperziji takšnih delcev lahko dosegli bolj enakomerno raztapljanje magnetnih jeder. To je pomembno zato, da med postopkom magnetnega ločevanja izgubimo čim manj delcev in da imajo le-ti čim bolj ponovljiv odziv na magnetno polje in da je tudi vgrajevanje ZU ponovljivo.
- Pokazali smo, da na stabilnost delno votlih nanodelcev vplivajo vse vgrajene komponente, saj je bil vpliv tetradekanola na nastanek skupkov delcev povezan tudi z vgrajeno ZU. Pomembno je tudi, da ovrednotimo njihovo stabilnost v bioloških medijih, saj je zaradi kompleksnosti medija možnih več interakcij, ki lahko vodijo v nestabilnost.
- Delno votle superparamagnetne nanodelce lahko od disperznega medija uspešno ločimo tudi z metodo ultracentrifugiranja. Metoda pa ni primerna za spremljanje sproščanja ZU iz delcev.
- Z metodo inkubiranja delno votlih superparamagnetnih nanodelcev v raztopini učinkovine smo vgradili do 0,936 mg IBU in do 0,185 mg KAR na mg delcev. Sproščanje ZU smo s pomočjo tetradekanola upočasnili. Postopek vgrajevanja ZU z inkubiranjem delcev v raztopini ZU se je izkazal učinkovit, a potreben bi bil še nadaljnji razvoj metode, ki bi omogočil učinkovito spiranje nevgrajene ZU s površine delcev. Nadalje bi bilo primerno raziskati še, kje v delcih se ZU nahaja in koliko časa se le-ta sprošča (tj. maksimalni čas sproščanja). Izdelani superparamagnetni nanodelci vsekakor predstavljajo obetaven dostavni sistem, saj so lastnosti delcev iNANOvative™ glede na objavljene raziskave zelo primerne. Ugotovili smo, da so delci primerni za vgrajevanje ZU in za manipulacijo v magnetnem polju, zato je smiselno z raziskavami nadaljevati in njihove lastnosti spremljati in optimirati tudi pri fizioloških pogojih.

## 6. LITERATURA

- [1] Tombácz E, Turcu R, Socoliuc V, and Vékás L: Review: Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magneto-responsive nanosystems. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 468: 442–453.
- [2] Scherer C, Figueiredo Neto AM: Ferrofluids: properties and applications. *Braz J Phys* 2005; 35: 718–727.
- [3] Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J: Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys Appl Phys* 2003; 36: 167–181.
- [4] <https://www.nde-ed.org/EducationResources/CommunityCollege/MagParticle/Physics/MagneticMaterials.htm>. (datum dostopa: 27. 1. 2016)
- [5] Iraj S: Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles as a Novel Antioxidant Delivery System,” *Iran J Chem Eng* 2015; 12: 93–100.
- [6] Vallet-Regi M, Rámila A, del Real RP, Pérez-Pariente J: A New Property of MCM-41: Drug Delivery System *Chem Mater* 2001; 13, 308–311.
- [7] Zhang Y, Zhi Z, Jiang T, Zhang J, Wang Z, Wang S: Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. *J Controlled Release* 2010; 145: 257–263.
- [8] Bouchoucha M, Gaudreault RC, Fortin MA, Kleitz F: Mesoporous Silica Nanoparticles: Selective Surface Functionalization for Optimal Relaxometric and Drug Loading Performances. *Adv Funct Mater* 2014; 37: 5911–5923.
- [9] Niemelä E, Desai D, Nkizinkiko Y, Eriksson JE, Rosenholm JM: Sugar-decorated mesoporous silica nanoparticles as delivery vehicles for the poorly soluble drug celastrol enables targeted induction of apoptosis in cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 96: 11–21.
- [10] Bettaieb A, Wrzal PK, Averill-Bates DA: Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. in *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. L Rangel Ed InTech 2013; 12: 257-283.
- [11] Gonzales-Weimuller M, Zeisberger M, Krishnan KM: Size-dependant heating rates of iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia. *J Magn Magn Mater* 2009; 321: 1947–1950.

- [12] Di Corato R, Espinosa A, Lartigue L: Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials* 2014; 35: 6400–6411.
- [13] Sadat ME, Patel R, Sookoor J: Effect of spatial confinement on magnetic hyperthermia via dipolar interactions in Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for biomedical applications. *Mater Sci Eng C* 2014; 42: 52–63.
- [14] Kunzmann A, Andresson B, Vogt C: Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 253: 81–93.
- [15] Le Renard PE, Lortz R, Senatore C: Magnetic and in vitro heating properties of implants formed in situ from injectable formulations and containing superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) embedded in silica microparticles for magnetically induced local hyperthermia. *J Magn Magn Mater* 2011; 323: 1054–1063.
- [16] Muñoz de Escalona M, Sáez-Fernández E, Prados JC, Melguizo C, Arias JL: Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer. *Int J Pharm* 2016; 504: 11–19.
- [17] Dennis CL, Jackson AJ, Borchers JA: Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia. *Nanotechnology* 2009; 20:395103.
- [18] Du L, Zhou J, Wang X: Effect of local hyperthermia induced by nanometer magnetic fluid on the rabbit VX2 liver tumor model. *Prog Nat Sci* 2009; 19: 1705–1712.
- [19] Suzuki M, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T: Anticancer effect and immune induction by hyperthermia of malignant melanoma using magnetite cationic liposomes. *Melanoma Res* 2003; 13: 129–135.
- [20] Linthorst M, Baaijens M, Wiggenraad RM: Local control rate after the combination of re-irradiation and hyperthermia for irresectable recurrent breast cancer: Results in 248 patients. *Radiother Oncol* 2015. 117: 217–222.
- [21] Johannsen M, Gneveckow U, Thiesen B: Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution. *Eur Urol* 2007; 52: 1653–1662.

- [22] van Landeghem FK, Maier-Hauff K, Jordan A: Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles. *Biomaterials*; 30: 52–57.
- [23] Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D: Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2011; 103: 317–324.
- [24] “<http://www.magforce.de/en/home.html>.” .
- [25] Kralj S, Potrč T, Kocbek P, Marchesan S, Makovec D: Design and Fabrication of Magnetically Responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Curr Med Chem* 2016.
- [26] Schleich N, Po C, Jacobs D: Comparison of active, passive and magnetic targeting to tumors of multifunctional paclitaxel/SPIO-loaded nanoparticles for tumor imaging and therapy. *J Controlled Release* 2014; 194:82–91.
- [27] Zhang F, Braun GB, Pallaoro A: Mesoporous Multifunctional Upconversion Luminescent and Magnetic ‘Nanorattle’ Materials for Targeted Chemotherapy. *Nano Lett* 2012; 12: 61–67.
- [28] “<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/185388?lang=en&region=SI>.”
- [29] Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J: Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 2006; 312: 179–186.
- [30] Brook CS: Carvedilol phosphate salts and/or solvates thereof, corresponding compositions and/or methods of treatment. United States Patent, Patent number US7268156 B2, date of patent: 09-2007.
- [31] Tadic M, Kralj S, Jagodic M, Hanzel D, Makovec D: Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment. *Appl Surf Sci* 2014; 322:255–264.
- [32] Kralj S, D. Makovec D: Magnetic Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Clusters into Nanochains and Nanobundles. *ACS Nano* 2015; 9: 9700–9707.
- [33] “<http://www.nanos-sci.com/products.html>.” .



[34]

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n3013?lang=en&region=SI>.

[35] Yu T, Greish K, McGill LD: Influence of Geometry, Porosity, and Surface Characteristics of Silica Nanoparticles on Acute Toxicity: Their Vasculature Effect and Tolerance Threshold. *ACS Nano* 2012; 6: 2289–2301.

[36] Choi SW, Zhang Y, Xia Y: A Temperature-Sensitive Drug Release System Based on Phase-Change Materials. *Angew Chem Int Ed* 2010; 49:7904–7908.

## PRILOGA I – natehtane mase in odmerjeni volumni po poglavjih

TOPILA ZA ZU

10 : 90 = tetradekanol : etanol

m (etanol) = 19,35 g

m (tetradekanol) = 2,15 g

25 : 75 = tetradekanol : etanol

m (etanol) = 10,28 g

m (tetradekanol) = 3,44 g

50 : 50 = tetradekanol : etanol

m (etanol) = 4,09 g

m (tetradekanol) = 4,12 g

Poglavje 4.6. OPTIMIZACIJA METODE ZA VGRAJEVANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE V DELNO VOTLE SUPERPARAMAGNETNE NANODELCE

ZU	V(vzorec) V(medij)	tetradekanol : etanol (m : m)	natehtane mase ZU in volumen topila za ZU
<b>VZOREC 2</b>			
2,5 % KAR	500 µl 1,5 ml	50 : 50	m (KAR) = 25,10 mg V (topilo) = 1004 µl
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	50 : 50	m (KAR) = 5,60 mg V (topilo) = 560 µl
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	50 : 50	m (KAR) = 5,61 mg V (topilo) = 510 µl
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	50 : 50	m (KAR) = 5,23 mg V (topilo) = 523 µl
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	50 : 50	m (KAR) = 5,28 mg V (topilo) = 528 µl
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	0 : 100	m (KAR) = 5,23 mg V (topilo) = 523 µl
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	0 : 100	m (KAR) = 5,45 mg V (topilo) = 545 µl
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	25 : 75	m (KAR) = 5,18 mg V (topilo) = 518 µl
1 % KAR	500 µl 3,0 ml	10 : 90	m (KAR) = 5,23 mg V (topilo) = 523 µl
<b>VZOREC 3</b>			
1% KAR	500 µl 3,0 ml	10 : 90	m (KAR) = 5,07 mg V (topilo) = 507 µl
<b>VZOREC 4</b>			
1% IBU	500 µl 4,0 ml	10 : 90	m (IBU) = 5,12 mg V (topilo) = 512 µl

POGLAVJE 4.7. VGRAJEVANJE ZU V DELCE

POGLAVJE		NATEHTANE MASE ZU IN VOLUMEN TOPILA ZA ZU	
4.7.1. VPLIV KONCENTRACIJE IBUPROFENA NA NJEGOVO VGRAJEVANJE V MAGNETNE NANODELCE		0,5% IBU	m (IBU) = 4,02 mg V (topilo) = 804 µl
		1% IBU	m (IBU) = 7,56 mg V (topilo) = 756 µl
		2,5% IBU	m (IBU) = 14,25 mg V (topilo) = 570 µl
		5% IBU	m (IBU) = 26,06 mg V (topilo) = 520 µl
		7,5% IBU	m (IBU) = 37,50 mg V (topilo) = 500 µl
		10% IBU	m (IBU) = 51,30 mg V (topilo) = 513 µl
4.7.2. VPLIV DELEŽA TETRADEKANOLA NA VGRAJEVANJE ZU V DELNO VOTLE SUPERPARAMAGNETNE NANODELCE	4.7.2.1. VGRAJEVANJE IBUPROFENA iz 5 % RAZTOPINE	tetradekanol : etanol = 0 : 100	m (IBU) = 29,28 mg V (topilo) = 586 µl
		tetradekanol : etanol = 10 : 90	m (IBU) = 26,06 mg V (topilo) = 520 µl
		tetradekanol : etanol = 25 : 75	m (IBU) = 28,63 mg V (topilo) = 570 µl
		tetradekanol : etanol = 50 : 50	m (IBU) = 26,78 mg V (topilo) = 540 µl
	4.7.2.2. VGRAJEVANJE IBUPROFENA IZ 2,5 % RAZTOPINE	tetradekanol : etanol = 0 : 100	m (IBU) = 12,74 mg V (topilo) = 510 µl
		tetradekanol : etanol = 10 : 90	m (IBU) = 13,02 mg V (topilo) = 521 µl
		tetradekanol : etanol = 25 : 75	m (IBU) = 12,79 mg V (topilo) = 512 µl
		tetradekanol : etanol = 50 : 50	m (IBU) = 12,66 mg V (topilo) = 506 µl
	4.7.2.3. VGRAJEVANJE KARVEDILOLA IZ 1 % RAZTOPINE KARVEDILOLA	tetradekanol : etanol = 0 : 100	m (KAR) = 5,97 mg V (topilo) = 597 µl
		tetradekanol : etanol = 10 : 90	m (KAR) = 5,03 mg V (topilo) = 503µl
		tetradekanol : etanol = 25 : 75	m (KAR) = 5,49 mg V (topilo) = 549 µl
		tetradekanol : etanol = 50 : 50	m (KAR) = 5,14 mg V (topilo) = 514 µl
	4.7.2.3. VPLIV ULTRAZVOKA NA SPROŠČANJE KARVEDILOLA IZ DELCEV	tetradekanol : etanol = 10 : 90	m (KAR) = 10,40 mg V (topilo) = 1040 µl
		tetradekanol : etanol = 10 : 90	

- vgrajevanje 5% IBU iz 25% (m/m) raztopine tetradekanela v etanolu (tri paralelke):

m (IBU) = 77,46 mg

V (topilo) = 1548 µl

#### 4.8. UPORABA ULTRACENTRIFUGIRANJA V PRESKUSU SPROŠČANJA ZDRAVILNE UČINKOVINE

koncentracija IBU (m/V)	Tehtane mase ZU in volumen topila za ZU
2,5 %	m (IBU) = 8,78 mg V (topilo) = 350 $\mu$ l
10 %	m (IBU) = 25,60 mg V (topilo) = 256 $\mu$ l