UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJETKA PLEMENTAŠ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITENI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJETKA PLEMENTAŠ

IZDELAVA IN VREDNOTENJE POLIMERNIH NANODELCEV S SUPERPARAMAGNETNIM ŽELEZOVIM OKSIDOM

PRODUCTION AND EVALUATION OF POLYMERIC NANOPARTICLES WITH SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in somentorstvom asist. dr. Petre Kocbek.

Izdelavo vzorcev SPION-ov in TEM analizo so opravili na Odseku za sintezo materialov Instituta Jozef Stefan. Analizo SEM in TEM vzorcev so opravili na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete.

Za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem somentorici asist. dr. Petri Kocbek. Za vzpodbudo pri delu se zahvaljujem tudi mentorici prof. dr. Julijani Kristl.

Zahvala gre tudi Slavku Kralju (Odsek za sintezo materialov, IJS, Ljubljana) za izdelavo vzorcev SPION-ov in njihovo TEM analizo ter doc. dr. Mateji Erdani Kreft (Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Ljubljana) za pomoč pri SEM in TEM mikroskopiji celic ter pri interpretaciji dobljenih rezultatov.

Iskrena hvala staršem, ki so mi omogočili študij in vedno nesebično stali ob strani ter sestri za vzpodbudo in pomoč. Hvala tudi Petru za drugačne poglede, potrpežljivost, oporo in ker je vedno verjel vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in somentorstvom asist. dr. Petre Kocbek.

Diplomantov lastnoročni podpis

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Danijel Kikelj Član diplomske komisije: doc. dr. Damjan Janeš mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	3
POVZETEK	5
ABSTRACT	7
SEZNAM OKRAJŠAV	10
1 UVOD	12
1.1 NANOTEHNOLOGIJA IN NANODELCI	12
1.2 Uporaba nanodelcev v medicini	14
1.3 MAGNETNI NANODELCI	14
1.3.1 Magnetne lastnosti	14
1.3.2 Jedro MND	15
1.3.3 Magnetna tekočina	17
1.3.4 Modifikacija površine MND	18
1.4 CILJANJE Z MND	22
1.5 Stabilnost MND v biološkem okolju in magnetno ciljanje	24
1.6 VSTOP V CELICE IN SPROŠČANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE	24
1.7 Vrednotenje MND	26
1.8 Metabolizem	26
1.9 VARNOST MND	27
1.10 Uporaba MND pri zdravljenju in diagnostiki	28
2 NAMEN DELA	33
3 MATERIALI IN METODE	34
2 1 ΜΑΤΕΡΙΑΙΙ	24
3.1.1 Materiali za izdolovo PLCA nanodolovy z vorgionimi SPION i	34
3.1.1 Materiali za izaelavo FLGA nanodelcev z vgrajenimi SFION-i	34
2 2 LADODATODIISKA ODDEMA	35
3.2.1 Aparatura za izdelavo BLCA nanodelavy z vorajenimi SBION i	30 36
3.2.1 Aparature za gojanja celic in izvajanja testov na celičnih kulturah	37
3.3 METODE	38
3.3 1 Izdelava in vrednotenie PIGA nanodelcev z varajenimi SPION-i	38
3 3 2 Čiščenje PI G4 nanodelcev z vorajenimi SPION-i v magnetnem poliu	
3 3 3 Liofilizacija izdelanih magnetnih nanodelcev	41
3.3.4 Vrednotenie izdelanih PIGA nanodelcev z vorajenimi SPION-i	41
3.4 IN VITRO VREDNOTENIE MND NA CELICAH	43
3 4 1 Prinrava rastnih medijev za gojenje celičnih kultur	43
3.4.2 Goienie celic	44
3.4.3 Redispergiranie liofiliziranih vzorcev	46
3.4.4 Priprava gojitvenih plošč s 96 vdolbinicami za testiraje učinka SPION-ov	na
celice	46

3.4.5 Izpostavitev celic vzorcem MND	49
3.4.6 Vrednotenje učinkov PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i na celicah	50
3.4.7 Vstop MND v celice (vzorci za fluorescentno mikroskopijo)	51
3.4.8 SEM in TEM elektronska mikroskopija	52
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	57
4.1 Izdelava in vrednotenje PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i	57
4.1.1 Izdelava PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i	57
4.1.2 Priprava fluorescentno označenih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i	59
4.1.3 Pregled izdelanih magnetnih PLGA ND s presevno elektronsko mikroskopijo	
(TEM)	61
4.1.4 Rezultati vrednotenja PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i	62
4.1.5 Čiščenje v magnetnem polju	64
4.1.6 Liofilizacija izdelanih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i	68
4.2 Poskusi na celičnih kulturah	70
4.2.1 Vpliv PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i na morfologijo celic T-47D	71
4.2.2 Rezultati preskusa metabolne aktivnosti celic	73
4.2.3 Rezultati vstopa PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v celice T-47D	77
4.2.3.1 Rezultati fluorescentne mikroskopije	77
4.2.3.2 Rezultati presevne elektronske mikroskopije (TEM)	79
5 SKLEP	83
6 LITERATURA	85

POVZETEK

Magnetni nanodelci se danes že uporabljajo kot dostavni sistem predvsem za kontrastna sredstva, ki se uporabljajo kot pomoč pri odkrivanju in diagnostiki rakavih obolenj. Njihova prednost pred drugimi dostavnimi sistemi je predvsem ta, da jih lahko usmerjamo s pomočjo zunanjega magnetnega polja, kar omogoča izredno natančno ciljanje in dostavo kontrastnega sredstva ali zdravilnih učinkovin (ZU). Tako se lahko izognemo vrsti stranskih učinkov, ki spremljajo klasičen vnos zdravilnih učinkovin; s tem pa izboljšamo tudi komplianco bolnikov in ne nazadnje tudi kakovost njihovega življenja. Vendar pa so podatki o uporabi magnetnih nanodelcev kot dostavnih sistemov za ZU še vedno zelo skopi. Večina metod se danes uporablja zgolj v raziskovalne namene ali pa so v klinični uporabi le kratek čas; kljub temu pa že kažejo zelo obetajoče rezultate. Veliko delajo predvsem na varnosti magnetnih nanodelcev in optimizaciji metod za izdelavo samega dostavnega sistem, da bi ga lahko uporabili na čim širši paleti zdravil, zlasti ZU za zdravljenje težjih obolenj (rakava obolenja, degenerativne bolezni).

V prvem delu diplomske naloge smo optimizirali emulzijsko-difuzijsko metodo za izdelavo nanodelcev iz kopolimera mlečne in glikolne kisline (PLGA) z vgrajenimi SPION-i, ki smo jih nato v drugem delu uporabili za poskuse na celičnih kulturah. Izdelane PLGA nanodelce z vgrajenimi SPION-i (in tudi z dodatno vgrajenim fluorescentnim barvilom) smo ovrednotili (organoleptično, merjenje povprečne velikosti in porazdelitve velikosti). Ugotovili smo, da na velikost magnetnih nanodelcev (MND) vpliva tako čas soniciranja kot hitrost homogeniziranja. Z uporabo optimizirane metode izdelave PLGA nanodelcev smo pripravili PLGA nanodelce z vgrajenimi SPION-i z najmanjšo povprečno velikostjo delcev ~ 220 nm. Morebitne agregate, ki so se pojavili v disperziji, smo razbili s pomočjo soniciranja v UZ-kadički (~1-2 min).

In vitro smo preverili varnost izdelanim polimernih MND na dveh celičnih kulturah rakavih celic, in sicer na celicah Caco-2 in T-47D. Ugotavljali smo vpliv različnih koncentracij PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i (25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL in 300 µg/mL) na viabilnost celic, prehod magnetnih PLGA nanodelcev v celice in opazovali sposobnost obnavljanja celic po izpostavitvi vzorcem MND in magnetnemu polju. Rezultati so pokazali, da je vpliv MND na viabilnost celic koncentracijsko odvisen, tj. višje koncentracije MND bolj vplivajo na viabilnost celic kot nižje; kar velja za obe proučevani celični liniji. Izkazalo se je, da so celice T-47D bolj

občutljive na izpostavitev MND kot celice Caco-2, saj so izkazovale nižjo metabolno aktivnost po izpostavitvi magnetnim PLGA nanodelcem in magnetnemu polju kot celice Caco-2. V raziskavi smo primerjali tudi sposobnost regeneracije celic po izpostavitvi vzorcem magnetnih PLGA nanodelcev v magnetnem polju v različnih časovnih intervalih (24 h, 48 h). Ugotovili smo, da celice, ki so bile izpostavljene samo MND, ne pa tudi magnetnemu polju, izkazujejo večjo metabolno aktivnost po inkubiranju. Daljši je bil čas inkubacije po izpostavitvi celic MND in magnetnemu polju, večja je bila metabolna aktivnost celic. Sklepamo, da je višja metabolna aktivnost celic, ki niso bile izpostavljene tudi magnetnemu polju, posledica manjše obremenitve celice, saj je bil vstop magnetnih PLGA nanodelcev tam zgolj posledica spontane endocitoze, zato je tak vstop počasnejši in manj obremenjujoč za celico kot vstop pod vplivom zunanjega magnetnega polja. Pri z magnetnim poljem pospešenem vstopu magnetnih PLGA nanodelcev v celice, pa je bila obremenitev celic večja, učinek je bil dosežen hitreje, a so se celice regenerirale počasneje in daljši čas. Proučevali smo tudi internalizacijo izdelanih nanodelcev na kulturah keratinocitov in celic T-47D. V obeh tipih celic smo opazili, da so magnetni PLGA ND vstopili v celice in se razporedili po celični citoplazmi, v večji koncentraciji pa so se razporedili okoli jedra celice.

S pomočjo vrstične in presevne elektronske mikroskopije pa smo ugotavljali vpliv magnetnih PLGA nanodelcev na morfologijo T-47D celic, privzem v celice in vpliv MND na znotrajcelične strukture. Slike vrstične mikroskopije so pokazale, da se pri celicah, ki so izpostavljene samo MND ali MND in magnetnemu polju, pojavijo luknjice v apikalni plazmalemi (verjetno posledica vstopa MND v celico). S pomočjo presevne elektronske mikroskopije smo potrdili vstop magnetnih PLGA ND v celice in ugotovili, da se MND kopičijo v manjših skupkih ob apikalni plazmalemi, znotraj celic ob mitohondrijih, v veziklih in v celičnem jedru. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno preveriti pri katerih koncentracijah MND in po kašnem času inkubacije začnejo nastajati luknjice v apikalni plazmalemi.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklenemo, da je emulzijsko-difuzijska metoda primerna metoda za izdelavo magnetnih PLGA nanodelcev kot ogrodnega dostavnega sistema. V nalogi smo dokazali, da lahko z uporabo magnetnih PLGA nanodelcev in zunanjega magnetnega polja dosežemo učinkovit znotrajcelični vnos, kar kaže velik potencial za dostavo zdravilnih učinkovin v tarčna tkiva; sam magnetni dostavni sistem pa ne izkazuje znatne toksičnosti za celice.

ABSTRACT

Magnetic nanoparticles are nowadays used as a delivery system especially for contrast media that are used as an aid in establishing and diagnosing cancer diseases. Their advantage over other delivery systems is especially the fact that they can be directed by means of external magnetic field, which allows for extremely accurate aiming and the delivery of the contrast media, or the active substances (AS). That way numerous adverse effects that usually accompany traditional administration of active substances can be prevented; thus improving the compliance of patients and, after all, the quality of their lives. But the amount of data about the usage of magnetic nanoparticles as AS delivery systems is still very insignificant. To date, most methods are only used for research purposes or are only used for clinical purposes for a short time; nevertheless, the are already exhibiting very promising results. A lot of effort is being invested especially into the safety of magnetic nanoparticles, and the optimization of methods for the development of the delivery system itself in order to make it useful for the most extensive possible range of medicine, especially for ASs for the treatment of severe diseases (cancer diseases, degenerative diseases).

In the first part of the graduation thesis, we optimized the emulsion diffusion method for the production of nanoparticles from the copolymer of lactic acid and glycolic acid (PLGA) with internalized SPIONs, which were used for experiments on cell cultures in the second part of the thesis. The produced PLGA nanoparticles with internalized SPIONs (and also with an additionally internalized fluorescent dye) were evaluated (organoleptically, measurements of the average size, and size distribution). We have established that the size of magnetic nanoparticles (MNPs) is affected by the duration of sonic radiation, and the homogenization speed. By applying the optimized method of PLGA nanoparticle production we prepared PLGA nanoparticles with internalized SPIONs with the minimum average size of particles \sim 220nm. Any aggregates that appeared in the dispersion were broken into smaller particles by means of sonic radiation in an ultrasonic tub (\sim 1–2min).

We assessed the safety of the produced polymeric MNPs *in vitro* on two cancer cell cultures, i.e. the Caco-2 and T-47D cells. We were assessing the influence of different concentrations of PLGA nanoparticles with internalized SPIONs (25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL, and 300µg/mL), the viability (survival rate) of cells, the uptake of

magnetic PLGA nanoparticles into cells, and we also observed the reconstruction ability of cells after having been exposed to MNP specimens and the magnetic field. Research has shown that the influence of MNPs on the viability of cells depends on the concentration, e.g. the higher the MNP concentration, the greater the influence on cell viability; the same goes for both cell lines in question. It turns out that the T-47D cells are more easily affected by exposure to MNPs than the Caco-2 cells since they exhibited lower metabolic activity than the Caco-2 cells after having been exposed to magnetic PLGA nanoparticles, and a magnetic field. During the research, we also compared the regeneration abilities of cells after having been exposed to magnetic PLGA nanoparticle specimens in a magnetic field in different time intervals (24h, 48h). We have established that the cells that were exposed to MNPs only (but not also to a magnetic field) exhibit stronger metabolic activity after incubation. The longer the incubation duration after the exposure of cells to MNPs and a magnetic field, the stronger the metabolic activity of the cells. We presume that the greater metabolic activity of cells that have not been exposed to a magnetic field is a consequence of a lesser load on the cell since the uptake of magnetic PLGA nanoparticles there was merely a consequence of spontaneous endocytosis, that is why such an uptake is slower and imposes less load on a cell than an uptake under the influence of an external magnetic field. In case of the uptake of magnetic PLGA nanoparticles into cells accelerated by a magnetic field, the load imposed on cells was higher; but even though the effect was achieved faster, it took longer for the cells to regenerate. We also studied the internalization of the produced nanoparticles on keratinocyte cultures and T-47D cell cultures. In both cell types, we have noticed that the magnetic PLGA NPs entered the cells and distributed themselves across the cell's cytoplasm; higher concentrations of them were found around the nucleus of the cell.

By means of scanning and transmission electron microscopy we studied the influence of magnetic PLGA nanoparticles on the morphology of the T-47D cells, the uptake into the cells, and the influence of MNPs on intracellular structures. Scanning microscopy images have shown that in case of cells that were exposed to MNPs only, or to MNPs and a magnetic field, openings appear in the apical plasmalemma (probably an effect of the MNP uptake into the cell). By means of transmission electron microscopy we have confirmed the uptake of magnetic PLGA NPs into the cells, and we have established that MNPs accumulate in smaller groups along the apical plasmalemma, inside cells along the mitochondria, in vesicles, and in the cell nucleus. Within further studies, it would be

sensible to assess at which MNP concentrations and after which incubation duration the openings in the apical plasmalemma start to appear.

Based on the obtained data we can conclude that the emulsion diffusion method is a suitable method for the production of magnetic PLGA nanoparticles as the framework delivery system. In the thesis, we have demonstrated that by applying magnetic PLGA nanoparticles and an external magnetic field we can achieve an effective intracellular uptake, which shows a great potential for the delivery of active substances into target tissues; the magnetic delivery system itself however does not exhibit considerable toxicity for cells.

SEZNAM OKRAJŠAV

bdH ₂ O	bidestilirana voda			
DMEM	po Dulbeccu spremenjen Eaglov medij (angl. Dulbecco's modified Eangle medium)			
DOX	doksorubicin (citostatična učinkovina)			
DXM	deksametazon acetat (protivnetna učinkovina)			
EtAc	etilacetat			
EPR učinek	učinek povečane prepustnosti in zadrževanja (angl. Enhanced Permeability and Retention)			
FBS	fetalni goveji serum (angl. Fetal Bovine Serum)			
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (angl. Food and Drug Administration)			
IJS	Institut Jozef Stefan, Ljubljana, Slovenija			
LAF komora	komora z laminarnim pretokom filtriranega zraka (angl. Laminar Air Flow)			
MEM	rastni medij z minimalno sestavo (angl. Minimum Essential Medium)			
MND	magnetni nanodelci (angl. Magnetic Nanoparticles)			
MRI	magnetno resonančno slikanje (angl. Magnetic Resonance Imaging)			
MTS test	test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze			
PAS	površinsko aktivna snov			
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)			
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija (angl. Photon Correlation Spectroscopy)			

PDI	polidisperzni indeks			
PEG	polietilenglikol			
PEI	polietilenimin			
PLGA	kopolimer mlečne in glikolne kisline			
PVA	polivinilalkohol			
RES	retikuloendoltelijski sistem (angl. Reticuloendothelial System)			
ROS	reaktivne kisikove spojine (angl. Reactive Oxygen Species)			
SEM	vrstični elektronski mikroskop (angl. Scanning Electron Microscope)			
SLN	trdni lipidni nanodelci (angl. Solid Lipid Nanoparticles)			
SPION	superparamagnetni nanodelec železovega oksida (angl. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle)			
SQUID	kvantni interferometer (angl. Superconducting Quantum Interference Devices)			
TEM	presevni elektronski mikroskop (angl. Transmission Electron Microscope)			
USPIO	ultra majhni superparamagnetni nanodelci železovega oksida (angl. Ultra-small Superparamagnetic Nanoparticles)			
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor)			
ZU	zdravilna učinkovina			

1 UVOD

Zdravila, ki se v današnjem času uporabljajo za zdravljenje, pogosto ne delujejo le na obolela tkiva, ampak se porazdelijo po celotnem organizmu, torej tudi v zdravo tkivo. Posledica tega so neželeni učinki zdravil, kar posledično zmanjša komplianco bolnikov, poslabša kakovost njihovega življenja in s tem tudi zmanjša uspešnost zdravljenja. Razvoj na področju zdravilnih učinkovin (ZU), ki so specifične ali vsaj bolj selektivne za tarčna, to je obolela tkiva, je danes zelo intenziven. V ospredju so predvsem ZU za zdravljenje rakavih obolenj zaradi vedno večje pogostosti teh obolenj. ZU za zdravljenje rakavih obolenj, ki se danes uporabljajo v terapiji, delujejo tudi na zdrave celice in posledično povzročajo neželene učinke, ki so včasih tako močni, da je treba terapijo tekom zdravljenja večkrat prilagajati ali, v najslabših primerih, jo celo spremeniti.

Težnja, da se izognemo porazdeljevanju ZU po celotnem organizmu, postaja vodilo za razvoj novih tehnologij izdelave samih zdravil, predvsem pa ima močan vpliv na razvoj novih dostavnih sistemov. Vgrajevanje protitumornih učinkovin v specifične dostavne sisteme, ki pasivno ali aktivno ciljajo tumorske celice, lahko močno zmanjša ali skoraj popolnoma odpravi neželene učinke zdravil, poveča uspešnost zdravljenja in komplianco bolnikov ter tako izboljša kakovost njihovega življenja (1).

1.1 Nanotehnologija in nanodelci

Nanotehnologija pomeni manipulacijo, sintezo, načrtovanje in nadzor snovi na ravni posameznih molekul oziroma na nanometrskem nivoju in se pojavlja na različnih področjih industrije od kemijske, tekstilne, računalništva in informatike, transporta, energetike, avtomobilske, obrambne in farmacevtske industrije. Omogoča izdelavo materialov ali naprav, ki so lažje, hitrejše in imajo popolnoma nove ali pa dodatne, specifične lastnosti (2).

Kot filozofa in začetnika nanotehnologije označujejo Nobelovega nagrajenca, fizika Richarda Feynmana, njegovo predavaje in takrat dokaj ekstravagantno izjavo *»na dnu oziroma spodaj je še veliko prostora«*, s katero je leta 1957 nakazal možnost manipuliranja na ravni atomov (3). Izraz nanotehnologija je za proizvodno tehnologijo prvič uporabil Norio Taniguchi leta 1975. Eric K. Drexler pa je tisti, ki je postavil temelje molekularne nanotehnologije kot *»princip manipulacije na atomski ravni, z nadzorom strukture snovi*

na molekularnem nivoju«, hkrati je tudi prvi, ki si je svoje zamisli o nanotehnologiji drznil zapisati v knjigi (3). Dejansko pa sta njegovo teorijo v prakso postavila šele Nobelova nagrajenca H. Rohrer in G. Binning leta 1981 z razvojem Rasterskega elektronskega mikroskopa na tunelski efekt, iz katerega se je nato razvil elektronski mikroskop na atomsko silo (2).

Izraz *nanos* izhaja iz grščine in pomeni pritlikav. Nanodelec je delec nanometrskih velikosti. Predpona nano- se uporablja takrat, kadar ima material ali struktura vsaj eno dimenzijo v območju 1-100 nm. V širšem pomenu pa med nanodelce prištevajo tudi delce z velikostjo do 1 μ m (1). To so delci, ki so zaradi svoje velikosti oziroma natančneje zaradi svoje majhnosti, sprožili novo obdobje tudi v kliničnem delu. Magnetni nanodelci (MND) so delci nanometrskih velikosti z magnetnimi lastnostmi in jih lahko usmerjamo s pomočjo zunanjega magnetnega polja (4).

V farmaciji s pojmom nanodelci označujejo trdne delce, ki so zgrajeni iz fiziološko sprejemljivih polimernih molekul ali pa iz trdnih lipidov (trdni lipidni nanodelci - SLN) in se običajno uporabljajo za vnos učinkovin. V nanodelcu so lahko ZU raztopljene ali suspendirane; lahko pa so tudi adsorbirane na površino nanodelca. Glede na zgradbo so nanodelci lahko nanosfere ali nanokapsule (Slika 1). Z njimi lahko dostavljajo različne učinkovine, zaščitijo ZU pred prezgodnjo razgradnjo, povečajo hitrost raztapljanja učinkovin ali prodiranje v določeno tkivo, nadzorujejo sproščanje vgrajenih ZU, biološko uporabnost in hitrost absorpcije ali pa jih uporabijo za inteligentno dostavo učinkovin (5).



Slika 1: Shema zgradbe nanokapsule (levo) in nanosfere (desno).

Dodatna prednost nanodelcev kot dostavnega sistema je tudi ta, da se lahko z vgrajevanjem v tak sistem izognejo odpornosti organizma na ZU, kar se pogosto zgodi pri klasičnem vnosu ZU (npr. kemoterapevtikov) v organizem (1, 5). Sproščanje ZU iz nanodostavnega sistema lahko poteka nadzorovano bodisi s površinsko erozijo ogrodja bodisi z difuzijo ZU iz ogrodja (5).

Z uporabo MND lahko dosežejo bolj učinkovito in specifično dostavo ZU. Dandanes je zelo aktualen pristop v medicini uporaba teragnostikov: dostavnih sistemov, ki združujejo terapevtske in diagnostične lastnosti (6). Prav v teragnostiki so MND zelo aktualni.

1.2 Uporaba nanodelcev v medicini

Zadnja leta se veliko pozornosti namenja nanotehnologiji in nanodelcem predvsem v medicini, saj njihove lastnosti in uporaba predstavljajo revolucijo v klinični diagnostiki in metodah zdravljenja (7). Nanodelci so tako primerni za uporabo bodisi v diagnostične namene (odkrivanje bolezni v zgodnjih stadijih, lahko celo preden se bolezen pokaže) bodisi za terapevtske namene (vnos učinkovin, ciljana dostava), saj povečajo učinkovitost zdravljenja in/ali zmanjšajo neželene, stranske učinke zdravil (4, 6, 8, 9, 10). Zelo zanimivi so magnetni nanodelci, ker jih lahko usmerjajo z zunanjim magnetnim poljem (magnetno resonančno slikanje - MRI, vnos učinkovin). S pomočjo magnetnega polja MND pripeljejo na želeno mesto, nato pa magnetno polje izklopijo in delci ostanejo na mestu delovanja še določen čas (4, 11). MND tako ne predstavljajo le novega način vnosa ZU, pač pa tudi omogočajo zmanjšanje sistemske porazdelitve ZU in s tem tudi zmanjšanje sistemskih stranskih učinkov. Prednost pred ostalimi dostavnimi sistemi je tudi ta, da lahko uporabijo ZU nižje odmerke kot bi jih uporabili klasičnem pri peroralnem/transdermalnem/parenteralnem vnosu, saj dostavijo ZU točno na mesto njenega delovanja (4, 8).

MND, ki se uporabljajo v medicini, so sestavljeni iz anorganskega jedra, ki jim daje magnetne lastnosti in biokompatibilne obloge ali ogrodja (4, 7, 8, 10).

1.3 Magnetni nanodelci

1.3.1 Magnetne lastnosti

Razvrščanje magnetnega materiala poteka glede na njegovo sposobnost magnetizma, ki ga definira obseg sprožene magnetizacije v apliciranem magnetnem polju (12). Materiali, ki imajo magnetni moment nasproten magnetnemu polju, so diamagnetni in ne izkazujejo magnetizma po odstranitvi magnetnega polja. Tisti, z magnetnim momentom, ki je vzporeden magnetnemu polju, so paramagnetni (po odstranitvi zunanjega magnetnega polja ne ostanejo namagneteni, le odzivajo se nanj). Superparamagnetni materiali se ob

prisotnosti magnetnega polja obnašajo kot feromagnetni materiali (interakcije med elektroni povzročijo urejena magnetna stanja in spontano magnetizacijo – postanejo namagneteni), po odstranitvi magnetnega polja pa se obnašajo kot paramagnetni materiali (12). Njihova sposobnost magnetizacije je odvisna od atomske zgradbe, temperature in zunanjega magnetnega polja. Pri dovolj visoki temperaturi (temperatura zaviranja = T_B) se sprosti dovolj termične energije, ki povzroči rotacijo delcev, kar se pokaže kot izguba magnetizma ob odstranitvi zunanjega magnetnega polja, kljub temu pa delci ostanejo v urejenem stanju. To omogoča klinično uporabo MND, saj ostajajo stabilni po odstranitvi magnetnega polja in v organizmu ne agregirajo (7, 12, 13). Poznavanje fizikalno-kemijskih lastnosti MND, njihove morfologije, hidrodinamske velikosti, naboja in drugih površinskih lastnosti je nujno za njihovo *in vivo* uporabo, saj je od teh lastnosti odvisen razpolovni čas in ne nazadnje tudi metabolizem (7, 14).

1.3.2 Jedro MND

Samo jedro MND je tisto, ki v grobem narekuje lastnosti delca: njegovo velikost, obliko in magnetne lastnosti. Na začetku razvoja MND so bila jedra MND različne sestave, oblik, velikosti in z različnimi magnetnimi lastnostmi. Kot izhodni material so uporabljali kobalt, železo ali njune zlitine: CoPt₃, FePt, FeZn, pa tudi železov oksid, vključno z magnetitom (Fe₃O₄) in maghemitom (γ -Fe₂O₃) (6, 15). Nato so železovemu oksidu dodajali različne dvovalentne katione, da bi izboljšali njegove lastnosti (Ni, Co, Mn). Vendar se je izkazalo, da so ti dodani kationi vir toksičnosti; kar pomeni, da takšni MND niso primerni za klinično uporabo (vsaj dokler ne ugotovijo, kako zaščititi telo pred toksičnimi učinki). Z nadaljnjimi raziskavami so ugotovili, da sam železov oksid ni toksičen, ker ga organizem razgradi do popolnoma netoksičnih sestavin: železa in spojin s kisikom; kar ne predstavlja tveganja in škodljivih posledic za zdravje (4, 7, 14).

Tako se danes za izdelavo jedra MND uporablja magnetit (Fe₃O₄) ali njegova bolj stabilna oblika maghemit (γ -Fe₂O₃); kot tretja možnost se pojavlja tudi hematit (α -Fe₂O₃) (4, 7). MND iz železovega oksida so edina oblika MND, ki se danes uporablja v klinične namene; bolj prepoznavno ime zanje je SPION-i (angl. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles). Pogosto zasledimo še kratico USPIO (angl. Ultra-small Iron Oxide Nanoparticles). To so delci z enako sestavo jedra, le da so še manjši kot SPION-i (6, 7, 14, 15). V literaturi lahko zasledimo več načinov razdelitve metod priprave MND. Najpogosteje se pojavljata naslednji delitvi:

- a) <u>delitev glede na to ali izhajamo iz osnovnih gradnikov ali pa pripravimo večje delce,</u> <u>ki jih nato zmanjšujemo:</u>
 - 1. »bottom-up« metode,
 - 2. »top-down« metode (4).

V literaturi sta navedeni obe metodi izdelave MND. V pregledu raziskav s področja SPION-ov pa je zaslediti le študije, kjer so kot metode izdelave uporabili »botton-up« metode. Izkazalo se je, da so rezultat kemijskih metod nanodelci enotne sestave in velikosti (variabilnost med njimi je manjša od 10 %). Kot izhodno spojino pri kemijskih sintezah vedno uporabijo železovo sol (običajno železov klorid), metode sinteze pa so lahko različne:

- koprecipitacija,
- koprecipitacija v kontroliranem okolju,
- termična razgradnja ali redukcija,
- hidrotermična sinteza ali
- poliolna sinteza (14),
- b) delitev glede na to ali so metode fizikalne, kemijske ali biološke:
 - fizikalne metode: depozicija plinaste faze, litografija z elektronskim žarkom, pulzna laserska ablacija, z laserjem povzročena piroliza, mletje praškastih delcev,
 - kemijske metode: koprecipitacija, mikroemulzijska metoda, hidrotermična sinteza, elektrokemijska razgradnja, sonokemijska sinteza, termična razgradnja,
 - 3. biološke metode: sinteza s pomočjo gliv, bakterij ali encimov (4).

Vsaka metoda izdelave MND ima svoje prednosti in slabosti. Izberemo metodo, ki bo dajala delce z želenimi lastnostmi in bo ugodna tudi z vidika izdelave; kar pomeni, da ne bomo imeli z njo pretiranih težav pri izdelavi in nadaljnjim rokovanjem z vzorcem ali dodatnih stroškov, kar bi podaljšalo celoten proces izdelave delcev.

Najpogosteje se uporablja metoda koprecipitacije iz raztopine Fe^{2+}/Fe^{3+} soli z dodatkom baze v inertni atmosferi. Pomembno je, da imajo okolje brez kisika, saj kisik povzroči oksidacijo magnetita do železovega hidroksida. SPION-i nastanejo tako, da najprej pride do nukleacije (tvorbe jedra), ki je hitra in nato sledi počasna rast jedra. Na nastanek in rast jeder vplivajo različni dejavniki: pH, vrsta uporabljene soli, razmerje med Fe^{2+}/Fe^{3+}

ionska moč in temperatura (14). To so pomembni parametri, saj z njihovim natančnim nadzorovanjem in uravnavanjem lahko izdelajo nanodelce želenih lastnosti. S postopki optimizacije metode koprecipitacije lahko natančno nadzorujejo postopek sinteze in izdelajo MND želene velikosti, oblike in kristaliničnosti. Zavedati pa se moramo, da vsak dodatek v reagenčno zmes, pomeni tudi možnost spremembe površinskih lastnosti delcev, kar je pomembno za njihov nadaljnji razvoj in uporabo.

Veliko raziskav poteka tudi na drugi metodi sinteze MND, to je termični razgradnji. Velikost delcev pri tej metodi uravnavajo s temperaturo reakcije ali z vrsto organokovinskih prekurzorjev, kar se je izkazalo za dokaj uspešen pristop, saj so razlike v velikosti delcev v vzorcu res majhne (≤ 2 nm). Pri tem pristopu uporabijo hidrofobno oleinsko kislino in površinsko aktivno snov (PAS) oleilamin, s čimer dosežejo nastanek hidrofobnega plašča na jedru. Takšne delce je treba še dodatno obdelati, da dosežejo hidrofilnost površine, kar pa je dodatna stopnja v sintezi (7).

Ne glede na uporabljeno metodo moramo paziti kako delamo in kaj vse dodajamo v reagenčno zmes, na pogoje sinteze in na doslednost pri merjenju in spremljanju pomembnih parametrov sinteze (npr. pH, T). Med samimi delci ni magnetnih interakcij, zato se delci naj ne bi združevali v nerazdružljive skupke (magnetna aglomeracija). Treba pa je poudariti, da so MND majhni in imajo veliko površino glede na svoj volumen, kar ima za posledico visoko površinsko energijo. Prav zaradi tega je verjetnost aglomeracije vseeno velika. Ker se želimo aglomeraciji izogniti, je običajno treba površino MND še modificirati. Lahko jih obložimo ali pripravimo ogrodne sisteme, odvisno od nadaljnjega namen uporabe (7).

1.3.3 Magnetna tekočina

Da lahko SPION-e sploh uporabijo *in vivo*, jih morajo dispergirati v ustreznem mediju, ki zagotavlja njihovo stabilnost. Tako dobijo homogeno suspenzijo, ki so jo poimenovali magnetna tekočina (angl. Ferrofluid). To je koloidna disperzija (suspenzija) superparamagnetnih nanodelcev s povprečno velikostjo delcev okoli 10 nm, katerih površina je prekrita s slojem PAS. Delci so dispergirani v ustreznem polarnem ali nepolarnem mediju (odvisno od lastnosti MND, le-te pa so odvisne od samega postopka priprave MND) (6, 16).

Magnetna tekočina se odziva na zunanje magnetno polje: ko magnetno polje deluje, lahko nastanejo nenavadne oblike; brez magnetnega polja pa ima izražene lastnosti oljne tekočine (4, 6, 13).

1.3.4 Modifikacija površine MND

Samo jedro MND večinoma ni uporabno v druge namene kot za kontrastno sredstvo ali pri termični terapiji (magnetna hipertermija), zato je za širšo uporabo na njihovo površino potrebno vezati različne snovi ali MND vgraditi v ogrodne sisteme.

Omenili smo že, da so jedra SPION-ov majhna z veliko površino, kar povzroči nastajanje agregatov, ki sedimetirajo. Pričakovali bi, da bodo delci elektrostatsko stabilizirani zaradi odboja med istimi naboji na njihovi površini (kakšen točno je naboj, pa je odvisno od samega sistema oziroma metode sinteze MND). To bi držalo, če bi bili MND vedno v okolju brez elektrolitov in brez drugih nabitih delcev. Ker so namenjeni vnosu v telo, vemo, da bodo takoj ob vnosu izpostavljeni okolju, ki je daleč od tega, da bi bilo brez elektrolitov. Vnesemo jih v okolje, ki je bogato s snovmi z naboji, ki lahko takoj nevtralizirajo naboj na površni SPION-ov in tako sprožijo aglomeracijo in/ali tudi opsonizacijo (7). Da to preprečimo, je potrebno ustvariti posebno sterično oviro na površini SPION-ov, ki prepreči aglomeracijo in opsonizacijo oziroma njun obseg bistveno zmanjša. Opsonizacija (vezava proteinov plazme na površino delca) je prvi korak pri metabolizmu MND, saj v končni fazi vodi do izločanja MND. S tega vidika je ne želimo popolnoma preprečiti. MND lahko uporabljamo za dostavo učinkovin, MR slikanje, a v končni fazi želimo, da se izločijo iz telesa in ne povzročajo toksičnosti in nalaganja v organih (7). Razlogi za oblaganje MND:

- zaščita pred aglomeracijo in takojšnjo opsonizacijo,
- uvajanje funkcionalnih skupin na površino delcev za vezavo učinkovin, ligandov,...
- zmanjšanje obsega nespecifične vezave (vezava na netarčna tkiva),
- uravnavanje farmakokinetike,
- doseganje načrtovanega sproščanja učinkovin (npr. v endosomih) (7).

V te namene uporabljajo različne snovi za oblaganje (Sliki 2, 3):

1. Polimeri:

- <u>Dekstran</u> se že dolgo uporablja kot plazma ekspander, saj je preverjeno varen, izkazuje tudi visoko afiniteto za vezavo na površino železovega oksida. Uporablja se za pripravo izdelkov za MR slikanje (6).
- <u>Polietilenglikol</u> (PEG) je hidrofilen, zmanjša opsonizacijo in posledično privzem v makrofage ter tako podaljšuje razpolovni čas MND (6).
- <u>Hitosan</u> je biokompatibilen, hidrofilen kationski polimer. Primeren je za uporabo v postopkih čiščenja proteinov (magnetna bioseparacija). Študije kažejo potencialno uporabo hitosana tudi kot dostavnega sistema za genski material, vendar raziskave še niso končane (14).
- <u>Polietilenimin (PEI)</u> je kationski polimer in lahko kompleksira DNK.
 Olajša endosomalno sproščanje in vodi transport snovi do celičnega jedra.
 Vezava PEI na SPION-e omogoča *in vitro* transfekcijo celic z DNK ali siRNK nukleotidi (14).

2. Površinsko aktivne snovi:

- <u>Natrijev oleat</u>,
- <u>Dodecilamin</u> (6).

3. Kovine:

 <u>Zlato</u> je biokompatibilno in ima veliko sposobnost funkcionalizacije (omogoča vezavo drugih snovi); slaba lastnost zlata je, da lahko oslabi magnetne lastnosti samih MND. Včasih so ga uporabljali za zaščito MND pred oksidacijo (6).

4. Anorganski oksidi:

<u>Silicijev dioksid</u>: obloga iz silicijevega dioksida ima negativen naboj, stabilna je v vodnem okolju. Na silicijev dioksid lahko kovalentno vežejo ligande. MND s tako oblogo imajo tudi daljši razpolovni čas (6).

5. Peptidi (14),

6. Vključevanje v liposome: liposomi in miceli predstavljajo agregate amfifilnih molekul, ki jih lahko uporabijo kot oblogo na MND. Vključevanje SPION-ov v take strukture izvedejo preko postsintezne vključitve v liposom ali direktne sinteze SPION-ov v liposom (preden se amfifilne molekule popolnoma zaprejo in tvorijo liposom). Tak dostavni sistem ne izkazuje dobrih magnetnih in fizikalno-kemijskih lastnosti (6).

Poznamo tri pristope oblaganja MND (Sliki2, 3):

- *in situ* oblaganje (med samo sintezo jeder MND),
- adsorpcija obloge na predhodno pripravljeno jedro MND (modifikacija površine MND s polisaharidi, kopolimeri),
- kovalentna vezava (angl. grafting) npr. PEG na predhodno pripravljena jedra MND (14).



Slika 2: Shema modifikacije površine MND (14).

Prvi dve metodi dajeta popolnoma kapsulirane MND, grafting pa daje MND z videzom krtače. Kadar oblogo tvorijo fosfolipidi dobijo MND, ki so vgrajeni v školjko (angl. coreshell); take strukture imajo hidrofobna področja, kamor lahko vgradijo ZU (Sliki 2, 3) (7, 14).



Slika 3: Shema MND s spremenjeno površino: (A) »grafting«, (B) popolnoma enkapsulirani, (C) MND v liposomu, (D) vgrajeni v školjko (angl. core-shell) (7).

Kadar se odločamo, katero metodo bomo uporabili, moramo upoštevati dejstvo, da bodo obloženi MND poleg svojih lastnosti (lastnosti jedra), imeli tudi lastnosti obloge. Zato so zelo pomembne naslednje lastnosti obloge: kemijske lastnosti, molekulska masa, način vezave na MND, konformacija na površini in odstotek prekrite površine MND. Vsi ti dejavniki krojijo usodo MND v telesu, ne samo glede učinkovitosti, ampak tudi glede

razpolovnega časa in načina odstranjevanja iz telesa (7, 14). Samo oblogo MND lahko še dodatno funkcionaliziramo.

Funkcionalizacija ne pomeni nič drugega kot vezava ligandov na površino MND (14). Pristopa za vezavo snovi na površino MND sta dva:

- <u>Kovalentna vezava</u>: kovalentne vezi so močne in stabilne. Večinoma jih tvorijo med amino, karboksi in tiolnimi skupinami na MND (te skupine so običajno prisotne na oblogi) ali na ligandu (ki je konjugiran na oblogo MND) (14).
 - a) Neposredna vezava je primerna za vezavo majhnih molekul na površino MND. Najbolj primerne funkcionalne skupine na MND za tako vezavo so: amino, sulfhidrilna in aldehidna skupina. Metoda ni primerna za makromolekule, ker le-te ne izkazujejo afinitete za vezavo na površino MND in jih je pred vezavo zato treba modificirati. Modifikacija makromolekul pa lahko vodi do izgube njihove biološke aktivnosti (14).
 - b) *»Klik«-kemija*: je modifikacija neposredne vezave in je bolj prijazna metoda za vezavo makromolekul (hitra, mili pogoji, vodno okolje). Kot katalizator za lažjo vezavo se uporablja Cu. Povežeta pa se azidna in alkilna skupina. Nastane triazol, ki je stabilen in rigiden, kar omogoča tudi vzdrževanje konformacije makromolekule, lahko pa posledično pride do zaviranja metabolizma MND (14).
 - c) Kovalentna vezava preko distančnikov (linkerjev): vez se običajno tvori med amino skupino na površini MND in sulfhidrilno skupino na ligandu. Takšna vezava omogoča nadzor orientacije liganda na površini MND in je zlasti primerna za vezavo makromolekul (zmanjša se gibljivost makromolekule in zato le-ta težje reagira tudi z drugimi funkcionalnimi skupinami v okolici) (14).
- <u>Nekovalentna vezava</u>: tvorba teh vezi je hitrejša kot pri kovalentni vezavi. Prednosti nekovalentne vezave pred kovalentno je več: hitreje poteče, večja učinkovitost in predvsem to, da niso potrebne vmesne modifikacije intermediatov (14).
 - a) *Elektrostatske interakcije*: te interakcije izkoriščajo pri vezavi npr. plazmidov na SPION-e. SPION-e najprej obložijo s PEI in nato preko

elektrostatskih interakcij nanje vežejo plazmide. Na enak način lahko vežejo tudi kationske proteine na anionsko površino SPION-ov (14).

- b) Hidrofobne interakcije: so zelo ugodne interakcije za vezavo hidrofobnih ZU na površino SPION-ov (le-ti morajo imeti hidrofobno površino, na katero se lahko adsorbira hidrofobna ZU). Slabosti take vezave so občutljivost funkcionaliziranih SPION-ov na vplive okolja (pH, hidrofilnost, prisotnost soli) in slab nadzor orientacije vezanih ligandov. Tak način se zelo malo uporablja (14).
- c) Interakcije biotin-streptavidin: površino MND je potrebno predhodno modificirati s streptavidinom, makromolekule pa z biotinom. Biotin in streptavidin se povežeta preko zelo specifične povezave, ki je tudi zelo stabilna. Te interakcije so najmočnejše med nekovalentnimi vezmi in niso občutljive na vplive okolje (14).

Izbira pristopa vezave ni povsem prosta, saj jo delno narekuje kemizem funkcionalnih skupin obloge MND, delno pa ligand, ki ga želimo vezati. Vedno pa je cilj enak: vezava liganda brez zmanjšanja njegove biološke aktivnosti po vezavi na MND. Zato je pomembno, da dobro poznamo lastnosti liganda in način vezave na MND. Novejši pristop je večplastno oblaganje MND, s čimer lahko izdelamo dostavni sistem z nadzorovanim sproščanjem.

Če želimo pripraviti ogrodni sistem z MND, le-te dispergiramo v raztopini polimera in ZU, paziti pa moramo na kompatibilnost in na lastnosti ZU. Upoštevati moramo tudi dejstvo, da bomo MND izpostavili magnetnemu polju, zato mora tudi ZU prenesti takšno obremenitev.

1.4 Ciljanje z MND

MND s svojo velikostjo, z dodatno funkcionalizacijo površine in z magnetnimi lastnostmi, omogočajo ciljanje tarčnih tkiv v organizmu. S tem dosežejo selektivni vnos le v tarčna tkiva in po nepotrebnem ne obremenjujejo drugih organskih sistemov in s tem ne povzročajo neželenih učinkov. Ciljanje tarčnega tkiva lahko dosežejo na različne načine:

 Pasivno ciljanje: izkorišča fizikalno-kemijske lastnosti MND (določijo jih z ustrezno načrtovano sintezo in modifikacijo površine), ki omogočajo njihov prehod v določena tkiva (npr. tumorsko tkivo) (7):

- EPR (angl. Enhanced Permeability and Retention) učinek je učinek povečanega prehajanja in zadrževanja v tkivu (za tumorsko žilje je značilna večja prepustnost, zato snovi lažje prehajajo iz krvnega obtoka; na drugi strani pa je značilna tudi okrnjena limfna drenaža takega tkiva daljše zadrževanje snovi na območju tumorja). Ta učinek lahko izkoriščajo le pri tkivih s fenestriranim žiljem in okrnjeno limfno drenažo, kar omogoči večje kopičenje nanometrskega dostavnega sistema v tkivu (7).
- Izkoriščanje celic RES sistema (retikuloendotelijski sistem), tj. makrofagov za dostavo kontrastnih sredstev ali ZU v tarčna tkiva (kostno tkivo, jetra). Feridex IV[®] in Endorem[®] sta prva klinično uporabna pripravka z MND (v obliki Ferumxid AM-25 kot dostavnega sistema), ki se uporabljata za MR slikanje jeter (7).
- *Ciljanje s pomočjo zunanjega magnetnega polj*a: z uporabo zunanjega magnetnega polja omogočijo lokalno dostavo MND. Potrebujejo magnetno polje visoke jakosti, ki mora biti natančno usmerjeno na območje tarčnega tkiva. Danes se tak način ciljanja že uporablja za dostavo doksorubicina pri hepatokarcinomu. Omejitev tega pristopa ciljanja je, da dobro deluje le, kadar je tarčno tkivo blizu površine organizma (7, 14).
- Aktivno ciljanje: specifične ligande, ki izkazujejo visoko afiniteto do tarčnega tkiva, vežejo na površino MND. Pomembna je velikosti MND, gostota vezanih ligandov in vrsta vezanega liganda (10). V nekaterih primerih specifična vezava pospeši vstop v celice preko receptorske endocitoze (7). Vrste ligandov za aktivno ciljanje:
 - Ligandi receptorjev (majhne organske molekule, peptidi, proteini): vezava povzroči specifične interakcije, posledično se poveča kopičenje MND v tarčnem tkivu. Ciljajo lahko receptorje dejavnikov, ki sprožijo angiogenezo (npr. VEGF, nukleolin, αvβ3 integrin) ali tumorske označevalce (npr. HER2/neu) in s tem delujejo na tumorsko tkivo. Majhne molekule so bolj stabilne med samo vezavo in zato manj občutljive za izgubo biološke aktivnosti tekom vezave na MND, kot se lahko pogosto zgodi pri vezavi proteinov (7, 14).
 - *Monoklonska protitelesa (mAb)* so bili prvi ligandi, ki so jih uporabili za tarčno ciljanje s pomočjo MND kot dostavnega sistema. Primer uporabe

mAb je HerceptinTM; gre za mAb, ki se veže na HER2/neu receptor (tumorski označevalec). Slabost mAb je predvsem ta, da so velike molekule, ki težko prehajajo biološke bariere in zato pride do zmanjšanja učinka takega ciljanja (7).

Ciljanje tarčnega tkiva običajno dosežejo s sistemskim vnosom MND. MND injicirajo v obliki suspenzije neposredno v krvni obtok in le-ti s pomočjo krvnega obtoka potujejo do tarčnega tkiva. Zato je pomembno, da se MND v krvnem obtoku zadržijo dovolj dolgo, da dosežejo tarčno tkivo; torej morajo imeti dovolj dolg razpolovni čas (7).

1.5 Stabilnost MND v biološkem okolju in magnetno ciljanje

Stabilnost SPION-ov v biološkem okolju je ena izmed kritičnih točk celotnega procesa razvoja in uporabe SPION-ov. Izoelektrična točka SPION-ov je približno pri pH 7, tj. v območju pH bioloških tekočin. Naboj na površini MND pa je odvisen od dejanskega pH medija, v katerem se MND nahajajo. Obloga ali polimer v katerega vgradimo MND, lahko izoelektrično točko spremenita, kar posledično vpliva na razpolovni čas MND (pri pH < izoelektrične točke pride do protoniranja, pri pH > izoelektrične točke pride do deprotoniranja površine MND) (13). Vendar pa izoelektrična točka ni edino, kar vpliva na razpolovni čas takega sistema, pomembne so tudi fizikalno-kemijske lastnosti, volumen in koncentracija SPION-ov, jakost vezi med ZU in SPION-i in ne nazadnje je razpolovni čas odvisen tudi od magnetnega polja, ki ga uporabimo. Dodatno je treba upoštevati tudi samega bolnika in njegove parametre (npr. teža, telesna površina, delovanje srca) ter samo obolenje (npr. velikost tumorja, njegova lokalizacija, ožiljenost, pretok krvi), saj vse to vpliva na pH, elektrolitsko ravnotežje in količino proteinov. Za večjo učinkovitost magnetnega ciljanja so ugotovili, da je primerno magnetno polje z večjo jakostjo (višja amplituda, manj fluktuacij) (17).

1.6 Vstop v celice in sproščanje zdravilne učinkovine

Po injiciranju MND v krvni obtok in ko le-ti dosežejo tarčno mesto oziroma tarčno tkivo, morajo MND običajno še vstopiti v tarčne celice, da sprožijo učinek (9, 18). Pomembne so naslednje lastnosti MND:

- MND morajo biti sposobni za prenos vezane/vgrajene ZU vse do tarčnega mesta (vpliv sinteze, oblaganja, funkcionalizacije),
- nanje lahko vežejo molekule s katerimi se izognejo nastanku rezistence na zdravilo in s tem tudi izboljšajo delovanje (npr. uničenje celic) ter
- 3. prilagajanje mehanizma sproščanja ZU za doseganje optimalnega učinka (14).

Pri tem so v veliko pomoč znanja o delovanju organov, poznavanje lastnosti celic, njihovih celičnih ciklov, načina podvajanja celic (14). Če želimo narediti visokokakovostni dostavni sistem, je treba upoštevati tudi lastnosti tarčnega tkiva, ker nam lahko poznavanje lastnosti dostavnega sistema in tarčnega mesta pomaga najti optimalne pogoje za sproščanje ZU iz dostavnega sistema in nato sam vstop v celice.

Načini vstopa MND v celico:

- 1. receptorska endocitoza,
- 2. vstop preko kaveolov,
- MND manjši kot 50 nm ali obloženi z lipofilnimi oblogami prehajajo preko celične membrane kar z difuzijo. Da povečamo obseg vstopa v celice lahko na MND pripnemo pospeševalce prehoda (npr. Tat peptid) (7).

Poleg samega vstopa v celico je pomemben še dostop do tarčnih mest znotraj celice in sproščanje ZU. Za transport po citoplazmi lahko MND izkoriščajo lizosome, če ZU ni občutljiva na lizosomsko okolje (npr. proteinov, oligonukleotidov ne moremo tako dostavljati, saj niso stabilni pri nizkem pH in v prisotnosti lizosomskih encimov). Sproščanje v endosomih lahko sprožijo s pomočjo vezave vmesnikov (linkerjev), ki se cepijo pod določenimi pogoji (pH, osmolarnost, encimi). Endosomom se lahko izognejo oziroma dosežejo izstop iz lizosomov z vgradnjo kationskega polimera, ki povzroči osmotsko nabrekanje – učinek protonske spužve (7).

Po vnosu v organizem pride do hitrega sproščanja ZU, predvsem tiste, ki je vezana na površini MND; zato običajno tarčno tkivo doseže le majhen delež ZU. Da se temu izognejo, delce obložijo z oblogo iz različnih polimerov ali kopolimerov (npr. premrežen poli(etilenglikol)-ko-furamat, PLGA), ki zmanjšajo začetno sproščanje ZU (4).

1.7 Vrednotenje MND

Če želimo MND uporabiti v diagnostiki ali za zdravljenje, je potrebno predhodno opraviti tudi preizkuse varnosti in učinkovitosti ter ugotoviti, kaj se z MND dogaja v samih tarčnih tkivih oziroma celicah. Pri tem si pomagamo z analizo fizikalno-kemijskih lastnosti in *in vitro* testi na celičnih kulturah. Ne nazadnje se tekom kliničnega preizkušanja izvedejo tudi *in vivo* testi (17, 19).

Tekom izdelave vrednotimo naslednje lastnosti MND:

- Povprečni premer delcev in porazdelitev velikosti delcev (PDI): ovrednotimo jih s fotonsko korelacijsko spektroskopijo. Računalniški program nam izračuna tudi širino distribucije velikosti delcev, ki nam poda podatek o enakomernosti velikosti izdelanih MND.
- 2. Naboj na površini delcev: določimo ga z lasersko Dopplerjevo anemometrijo.
- 3. Morfologija delcev: ocenimo s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije.
- 4. **Notranjo strukturo delcev:** vrednotimo s pomočjo presevne elektronske mikroskopije.
- 5. Obnašanje MND v stiku s celicami: uporabimo komercialno dostopne celične linije različnih vrst rakavih celic ali drugih celičnih kultur (keratinociti, fibroblasti) in v *in vitro* pogojih ugotavljamo: vstop MND v celice in njihov vpliv na morfologijo celic (fluorescentna in elektronska mikroskopija), preživetje celic (testi viabilnosti).

1.8 Metabolizem

Kako dolgo se MND zadržijo v krvnem obtoku, je odvisno od tega, kako uspešno se izognejo opsonizaciji in RES; vse to pa je odvisno od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti (velikost, morfologija, naboj, površinske lastnosti). MND morajo biti dovolj majhni, da se izognejo fagocitozi v vranici (< 200 nm) in hkrati dovolj veliki (> 5,5 nm), da se izognejo filtraciji v ledvicah. Če se uspešno izognejo odstranjevanju v vranici in ledvicah, so tu še drugi sistemi, ki vodijo v odstranitev: opsonizacija, Kupffer-jeve celice in makrofagi, ki se nahajajo v tkivih. Dejstvo je, da nikakor ne moremo preprečiti njihove razgradnje in odstranitve iz telesa, vprašanje je le, če se bodo v telesu zadržali dovolj dolgo, da dosežejo mesto delovanja in se tam zadržijo dovolj dolgo, da sprožijo želeni učinek. Tu nastopimo

mi, naši sintezni pristopi in strategije, vse tisto, kar smo predhodno opisali. Za podaljšanje razpolovnega časa je pomemben tudi naboj MND, le-ta naj bi bil nevtralen, če ne želimo hitrega odstranjevanja MND v vranici (6, 7, 14).

Ovire na poti MND do njihovega tarčnega tkiva, so tudi poti, po katerih se MND iz telesa izločijo. Lahko ustvarimo sistem, ki se bo znal za nekaj časa izogniti vsem oviram ali vsaj večini, vendar moramo vseeno upoštevati tudi to, da so MND tujki za naše telo in se po opravljeni nalogi morajo odstraniti iz telesa. V organizmu so z namenom zdravljenja ali diagnostike, vendar so še vedno tujki. V nasprotnem primeru lahko povzročimo organizmu še večje težave, kot mu že povzroča bolezen, ki jo želimo zdraviti s pomočjo MND.

Mehanizmi izločanja MND iz telesa niso univerzalni za vse vrste MND, saj je vsaka vrsta MND svet zase in zato je treba upoštevati vse procese in stopnje sinteze, da lahko predvidimo pot, po kateri bodo zapuščali organizem. Ena lastnost pa je skupna prav vsem vrstam MND – iz telesa se ne izločijo kot delci, ampak se v organizmu obloga oziroma ogrodje razgradita. Zato je treba pri izdelavi misliti tudi na to, da na MND ne vežemo spojin, ki jih naše telo ne bo znalo razgraditi na nekaj, kar bo nato zapustilo organizem. Uporabljati moramo biorazgradljive spojine (14).

1.9 Varnost MND

Tudi magnetni dostavni sistemi morajo ustrezati podobnim zahtevam kot vsi ostali farmacevtski dostavni sistemi. Ne samo, da morajo dostaviti ZU do tarčnega mesta, kjer se le-ta sprosti, temveč morajo biti neimunogeni in netoksični. Zaradi paranteralnega načina vnosa v organizem, pa morajo biti tudi sterilni (19).

Mahmundi in sodelavci so izvedli študijo toksičnosti SPION-ov na fibroblastih miši ter levkocitih bolnikov z levkemijo (20). Ugotovili so, da SPION-i ne sprožajo znotrajceličnega nastanka reaktivnih kisikovih spojin (ROS) in poškodb DNK. Opazili pa so vezikle napolnjene s plinom, ki naj bi predvidoma nastali zaradi avtofagne aktivnosti celic. Toksičnost se je zmanjšala, ko so metodo vrednotenja toksičnosti modificirali. SPION-e so pred nanosom na celice pustili nekaj časa v celičnem mediju, da se je nanje adsorbirala plast proteinov, kar je pokazalo, da imajo proteini ključno vlogo pri nastanku toksičnosti.

Ključni vzrok toksičnosti naj bi predstavljala interakcija SPION-ov s proteini v plazmi, kar privede do sprememb v konformaciji proteinov in poškodb tkiva. Težave pri ugotavljanju

toksičnosti pa predstavljajo predvsem same metode, saj le-te ne zmorejo zaznati vseh možnih interakcij med SPION-i in proteini (4, 14). Zavedati se moramo, da se zdravo tkivo razlikuje od patološko spremenjenega (npr. po celični sestavi, obsegu izraženih specifičnih receptorjev, ki so udeleženi v procesu endocitoze) in da so različni tudi fenotipi posameznikov (14, 19, 21).

1.10 Uporaba MND pri zdravljenju in diagnostiki

Teragnostika pomeni združevanje diagnostičnih in terapevtskih pristopov, kar omogoča naprednejše zdravljenje in individualno (za posameznega bolnika prilagojeno) zdravljenje (6). MND predstavljajo orodje, ki omogoča kombinacijo diagnostičnih (MR slikanje) in terapevtskih pristopov (dostava ZU) (6).

Dandanes se MND uporabljajo za naslednje namene:

- a) Magnetna hipertermija: temelji na lokaliziranem segrevanju tumorskega tkiva nad 43 °C približno 30 min in se uporablja pri zdravljenju rakavih obolenj. MND, ki so izpostavljeni zunanjemu magnetnemu polju, sproščajo toploto zaradi izgube energije tekom obračanja magnetne histerezne zanke. Količina sproščene toplote je odvisna od vrste MND in parametrov magnetnega polja. Večjo specifičnost za tumorska tkiva dosežejo s postopki funkcionalizacije MND (6, 22).
- b) Magnetno resonančno slikanje (MRI): temelji na superparamagnetnih lastnostih delcev železovega oksida. Klinično se že uporabljajo formulacije MND z dekstranom za neinvazivno detekcijo metastaz v limfnih žlezah. MND se uporabljajo tudi v raziskavah primarnih tumorjev, slikanje mreže žilja tumorjev oziroma tumorske angiogeneze. MND, ki jih specifično prepoznajo in privzamejo makrofagi, lahko uporabijo za MRI vnetnih patoloških sprememb, tudi ateroskleroze, multiple skleroze in revmatoidnega artritisa. MND lahko označijo s tarčno specifičnimi snovmi, kar daje nove možnosti za kombinacijo MRI in dostave učinkovin (6, 7).
- c) Bioseparacija in biosenzorji: namen je izboljšati tehnike biosenzorjev z uporabo ultraobčutljivih »bio-barkod« (6, 14). »Bio-barkode« so MND, ki so označeni s protitelesi, ki prepoznajo specifične proteine (tumorske označevalce) (23). To omogoča zaznavo proteinov, ki jih želijo analizirati in njihovo ločitev od drugih

prisotnih proteinov. Taka uporaba MND poveča selektivnost diagnostike ali zdravljenja, saj se lahko izognejo nespecifični vezavi (6, 7, 23).

- d) Ciljana dostava ZU: je najbolj ambiciozen cilj uporabe MND. S tem želijo doseči ciljano dostavo ZU samo v tarčna tkiva, brez porazdeljevanja v druge organe. Za ciljano dostavo je zaželeno, da imajo MND hidrofilno površino in ustrezno velikost (do 100 nm), kar zagotavljadovolj dolg razpolovni čas (6).
- e) Magnetna transfekcija (magnetofekcija MF): pomeni reverzibilno vezavo DNK na MND in dostavo le-teh v tarčno tkivo s pomočjo magnetnega polja (24). Postopek dela je sledeč: najprej izdelajo MND, temu sledi vezava DNK na oblogo MND, tj. priprava magnetnega lipopleksa ali polipleksa ter magnetofekcija (6, 24).
- f) Uporaba v tkivnem inženirstvu: MND so uporabili pri terapiji nadomeščanja matičnih celic (pri označevanju celic, razvrščanju, spremljanju, dostavo *in vivo*). MND lahko uporabijo tudi pri združevanju tkiv pri povišani temperaturi; procesu, ki ga spremlja denaturacija proteinov, sledi pa ji repolimerizacija verig proteina, ki je tik ob MND. MND, ki imajo oblogo iz zlata ali silicijevega dioksida, so bolj robustni in bolj občutljivi za absorpcijo svetlobe, kar omogoča večjo izbiro vira svetlobe in valovne dolžine svetlobe, da se čim manj poškoduje zdravo tkivo (6).
- g) Detekcija železa in keliranje: nalaganje železa je povezano z večino nevrodegenerativnih bolezni. SQUID (angl. Superconducting Quantum Interference Device) je naprava, ki omogoča merjenje zelo majhnih magnetnih polj in s tem omogoča nove diagnostične prijeme, s katerimi ugotavljajo nalaganje železa v možganih pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo in nevroferitinopatijo. Uporabnost MND pa se kaže tudi na področju keliranja železa in odpira nove možnosti teragnostike (6).

Raziskave SPION-ov potekajo intenzivno tako na področju njihove uporabe v terapiji kot tudi v diagnostiki (Slika 4). Kadar se SPION-i uporabljajo kot dostavni sistem za ZU, je potreben poseben režim oziroma protokol zdravljenja. Običajno to pomeni intravenski vnos SPION-ov (običajno infuzija), ki mu sledi postavitev permanentnega magneta čim bližje tarčnemu mestu delovanja. Terapija je učinkovita zlasti takrat, kadar je tarčno mesto čim bližje magnetu (površini telesa, če je magnet postavljen zunaj telesa) (4).

Prednost SPION-ov je tudi ta, da jim v organizmu lahko sledimo s pomočjo specifičnih aparatur (uporabno zlasti pri MRI), kar omogoča vpogled v učinkovitost dostavnega

sistema, saj lahko sledimo gibanju MND v telesu in vidimo, ali dejansko dosežejo tarčno mesto.



Slika 4: Področja uporabe MND v diagnostiki in zdravljenju (4).

Danes se v klinični praksi SPION-i že uporabljajo, tako v diagnostiki kot tudi za zdravljenje nekaterih bolezni (4). Predvsem se uporabljajo za slikanje in dostavo ZU pri rakavih obolenjih, pri slikanju kardiovaskularnih zapletov in za molekularno slikanje (tj. neinvazivna *in vivo* vizualizacija, karakterizacija in kvantifikacija bioloških procesov na celičnem in molekularnem nivoju).

Prvo uporabo SPION-ov, kot dostavnega sistema za ZU, je razvil Widder s sodelavci. Doksorubicin (DOX) so vgradili v MND z albuminom (4). Znana je tudi kombinacija DOX s SPION-i in PLGA (25). Na ZU so nato vezali še protitelo, kar jim je omogočilo tako diagnostiko kot samo terapijo rakavega obolenja (4). Študijo so izvedli ne le na poskusnih laboratorijskih živalih (miši, podgane), ampak je bil sistem dejansko preizkušen tudi na 14 rakavih bolnikih. DOX so vezali na MND in ga intravensko vnesli čim bližje tumorju. Izkazalo se je, da se DOX iz takšnega sistema sprošča zelo enakomerno. Nato so primerjali rezultate pri vnosu DOX na klasičen način (intravenska injekcija) in z uporabo MND. Ugotovili so, da je dostava na tarčno mesto s pomočjo MND 200-krat učinkovitejša kot s klasičnim vnosom ZU (4).

Kubo in sodelavci so izvedli drugačen poskus, in sicer niso uporabili le MND, ki bi jih vodili z zunanjim magnetnim poljem, ampak so magnet vgradili v osteosarkom pri hrčku. Rezultati so bili osupljivi, saj se je izkazalo, da se ni povečala le učinkovitost terapije (v primerjavi z metodo, kjer so ZU injicirali intravensko brez MND), ampak se je signifikantno povečalo tudi samo protitumorno delovanje in bistveno zmanjšala izguba teže (pogost stranski učinek običajnega načina zdravljenja). Enak pristop so nato uporabili pri tumorju na možganih, kar je sodoben pristop, saj je v tem primeru glavna težava prehod ZU preko hematoencefalne bariere (4).

SPION-i pa niso uporabni le pri zdravljenju rakavih obolenj. Butoescu in sodelavci so pripravili dostavni sistem z MND, v katerega so vgradili deksametazon acetat (DXM). Podobne rezultate sproščanja DXM so dobili tako v *in vitro* kot v *in vivo* študijah (miši), povečalo pa se je tudi samo protivnetno delovanje DXM (4).

Intenzivno potekajo tudi raziskave vgrajevanja ali vezave drugih ZU na SPION-e kot dostavnega sistema za učinkovine, vendar raziskave še niso končane in vsi podatki še niso na voljo (Tabela I). Pri primerih SPION-ov, ki so kot dostavni sistemi za ZU prikazani v tabeli I, so navedeni: tip obloge na MND (jedro predstavlja železov oksid), tip dostavnega sistema, učinkovina in način preizkusa za dostavni sistem (*in vitro* ali *in vivo*). Ni pa posebej navedeno ali gre za ZU, ki so bile vezane na površino MND ali je bil uporabljen ogrodni dostavni sistem.

Obloga	Dostavni sistem	Zdravilna	Testni sistem
		učinkovina	
ogljik	vodna disperzija	karminomicin in	<i>in vivo</i> (podgane)
		rubomicin	injicirano v repno
			veno
brezvodna glukoza	vodna disperzija	epirubicin	<i>in vivo</i> (človek)
			intravenska
			injekcija
fosforiliran škrob	vodna disperzija	mitoksantron	<i>in vivo</i> (miši)
			MND so injicirali

Tabela I: Primeri SPION-ov kot dostavnih sistemov za ZU (4).

			bodisi v femoralno
			arterijo blizu
			tumorja bodisi
			intravensko
PLGA	mikrosfere in	Deksametazon	in vitro in in vivo
	mikrokapsule	acetat	(intra-arterijsko)
amfifilni blok kopolimer	multifunkcionalni	doksorubicin	in vitro
polietilenglikol-blok-	polimerni miceli		
poli(D,L-laktid) s			
terminalno vezanim			
maleimidom in			
polietilenglikol-blok-			
poli(D,L-laktid) s			
terminalno vezano metoksi			
skupino			
albumin	mikrosfere	doksorubicin	in vitro
polietilenglikol furamat	vodna disperzija	tamoksifen	in vitro
oleinska kislina	vodna disperzija	dokorubicin in	in vitro
		paklitaksel	
oleinska kislina – Pluronic	vodna disperzija	doksorubicin	in vitro
poliakrilna kislina	vodna disperzija	taksol	in vitro
brez obloge	porozni, prazni	cisplatin	in vitro
	ND		
hitosan, O-	vodna disperzija	kamptotecin	in vitro
karboksimetilhitosan in N-			
sukcinil-O-			
karboksimetilhitosan			
polimlečna kislina in PLGA	mikrosfere	interferon alfa-2	-
silika	prazne	ibuprofen	in vitro
	mezoporozne		
	sfere		
prečno premrežen hitosan	mikrosfere	aspirin	In vitro

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je izdelati in ovrednotiti polimerne nanodelce z vgrajenimi superparamagnetnimi nanodelci železovega oksida (SPION-i). SPION-i, ki jih bomo vgrajevali, imajo anorgansko jedro iz maghemita, prevlečeno s slojem recinolejske kisline, zato so izredno hidrofobni. Diplomsko delo bomo razdelili na dva sklopa.

V prvem sklopu bomo optimizirali emulzijsko-difuzijsko metodo in izdelali polimerne nanodelce iz kopolimera mlečne in glikolne kisline (PLGA) ter med izdelavo vanje vgradili SPION-e. Izdelane magnetne PLGA nanodelce bomo fizikalno ovrednotili tako, da bomo s fotonsko korelacijsko spektroskopijo izmerili povprečno velikost delcev in porazdelitev velikosti, s pomočjo elektronske mikroskopije pa si ogledali njihovo morfologijo. Ocenili bomo tudi vpliv hitrosti homogeniziranja na povprečno velikost in porazdelitev velikosti delcev, kakšna je optimalna koncentracija SPION-ov glede na maso polimera, da dobimo delce čim manjše velikosti in da je učinkovitost vgrajevanja SPIONov čim večja. Nato bomo optimiziranim vzorcem skušali, s pomočjo čiščenja v magnetnem polju, odstraniti presežni stabilizator. Metodo čiščenja bomo optimizirali glede na čas izpostavitve vzorcev magnetnemu polju, tako da v času čiščenja ne bo prišlo do aglomeracije delcev. Pri redispergiranju očiščenih nanodelcev si bomo pomagali z intenzivnim mešanjem oziroma vorteksiranjem in soniciranjem z UZ-kadičko in UZsondo. Nato bomo očiščene in redispergirane MND liofilizirali, da bomo dobili suh produkt za nadaljnje biološke raziskave. Izdelali bomo tudi vzorce MND, v katere bomo vgradili fluorofor, kar bo omogočilo njihovo spremljanje s pomočjo fluorescentne mikroskopije.

Drugi sklop diplomskega dela bo namenjen poskusom na celičnih kulturah. Ugotavljali bomo varnost oziroma toksičnost PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v magnetnem polju ali brez magnetnega polja. Učinke na celicah bomo opazovali pri različnih koncentracijah dodanih MND (25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL, 300 mg/mL), ugotavljali vpliv časa izpostavitve magnetnemu polju in vpliv časa inkubacije celic po izpostavitvi magnetnemu polju. Med seboj bomo primerjali tudi odzive celic na MND glede na *in vitro* testni sistem (vrsto uporabljene celične kulture). S pomočjo vrstične elektronske mikroskopije bomo preverili ali MND povzročajo kakšne spremembe v morfologiji celic; s pomočjo presevne elektronske mikroskopije pa poskušali ugotoviti ali MND prehajajo v celice in kaj se z njimi dogaja znotraj celic.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Materiali za izdelavo PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

 disperzija SPION-ov v etilacetatu (125 mg/mL) (Slika 5): nanodelci maghemita prekriti s slojem ricinolejske kisline, s povprečno velikostjo 5 nm (Institut Jozef Stefan, Odsek za sintezo materialov, Slovenija),



Slika 5: Disperzija SPION-ov v etilacetatu.

- bidestilirana voda (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija),
- etilacetat (Merck, Nemčija),
- kopolimer mlečne in glikolne kisline (PLGA, Resomer RG 503 H, Boehringer, Ingelheim, Nemčija),

PLGA (Slika 6) je kopolimer mlečne in glikolne kisline. PLGA, polimlečna (PLA) in poliglikolna (PGA) kislina so poliestri, ki se najpogosteje uporabljajo za izdelavo sinteznih polimernih nanodelcev. Odobreni so tudi s strani FDA. PLGA je biorazgradljiv in biokompatibilen polimer, ki se v organizmu razgradi do telesu lastnih razgradnih produktov (26). S spreminjanjem razmerja med glikolno (bolj hidrofilna) in mlečno (bolj hidrofobna) kislino, pa tudi s spreminjanjem molekulske mase PLGA, lahko vplivamo na hitrost razgradnje PLGA in hitrost sproščanja ZU, ki so vgrajene v ogrodje iz PLGA. Razgradnja PLGA v organizmu poteka v dveh stopnjah:

- hidrolizna cepitev esterskih vezi, nastanejo mono- in oligomerne enote, molekulska masa polimera se zmanjša,
- 2. erozija ogrodja, zmanjša se masa nanodelcev (26).

Mlečna in glikolna kislina se nato metabolizirata v Krebsovem ciklu do vode in ogljikovega dioksida (27).



Slika 6: Kemijska struktura PLGA; X =število monomernih enot mlečne kisline, Y = število monomernih enot glikolne kisline (27).

- polivinilalkohol (PVA) (MOWIOL 4-98, Kuraray specialities Europe GmbH, Nemčija),
- fluorescentno barvilo 6-kumarin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija).

3.1.2 Materiali za gojenje celic in izvajanje testov na celičnih kulturah

- A. ANTISEPTIK oz. DEZINFICIENS:
 - 70 % (V/V) etanol (pripravljen z razredčevanjem 96 % (V/V) etanola (Kefo, Slovenija)),
- B. CELIČNE KULTURE IN REAGENTI:
 - celična kultura Caco-2 celic (celice raka kolona) (American Type Culture Collection, ZDA),
 - celična kultura T-47D celic (celice hormonsko odvisnega raka dojke)
 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Velika Britanija),
 - celična kultura keratinocitov (NCTC2544) (ICLC, Univerza v Genovi, Italija)
 - DMEM medij (po Dulbeccu spremenjen Eaglov medij) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
 - FBS (fetalni goveji serum) (Gibco [®] Invitrogen, ZDA),
 - MEM medij (Minimum essential medium) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
 - HEPES, 1 M (Gibco [®] Invitrogen, ZDA),
 - 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
 - 1% (V/V) ne-esencialne aminokisline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
- 100 U/mL raztopina antibiotika (penicilin, stereptomicin) in antimikotika (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
- PBS (fosfatni pufer s pH 7,4; pripravljen z raztapljanjem 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O in 0,24 g KH₂PO₄ v 800 mL destilirane vode, uravnavanjem pH na 7,4 s HCl in dopolnitvijo do 1 L z destilirano vodo, pred uporabo razdeljen na alikvote in steriliziran),
- pripravljen gojitveni medij Caco2,
- pripravljen gojitveni medij T-47D,
- 0,25 % tripsin x EDTA (Promega Corporation, Medison, WI, ZDA),
- MTS reagent (CellTiter 96[®] Aqueus One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, Medison, WI, ZDA),
- 4 % formalin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
- Triton[®] X-100 (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- C. BARVILA ZA BARVANJE CELIČNIH KULTUR:
 - aktin: Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
 - jedro: Hoechst (bisbenzimid H33342; Honeywell Riedel de Haen[®], Nemčija)
- D. REAGENTI ZA PRIPRAVO VZORCEV ZA ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO:
 - fiksativ za pripravo SEM preparatov (pripravili so ga na Inštitutu za biologijo celice, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Slovenija),
 - fiksativ za pripravo TEM preparatov (pripravili so ga na Inštitutu za biologijo celice, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Slovenija).

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

3.2.1 Aparature za izdelavo PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

- analitska tehtnica Mettler Toledo AG245 (Mettler Toledo, Nemčija),
- avtomatske pipete (2-20, 10-100, 100-1000 in 1000-5000 μL, Biohit, Helsinki, Finska),
- nastavki za pipete (Biohit, Helsinki, Finska),

- plastične epruvete (centrifugirke z navojem in pokrovčkom) (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica),
- vortex EV-202 (Tehtnica Železniki, Slovenija),
- homogenizator Ultra-Turrax (IKA, Nemčija),
- magnetno mešalo IKA RCT basic (IKA[®] Werke GmbH & Co. KG, Nemčija),
- Zetasizer NanoZS (Malvern instruments, Malvern, Velika Britanija),
- liofilizator Christ Beta 1-8K (Martin Christ, Nemčija),
- ultrazvočna kadička Iskra Sonis 4 (Iskra, Slovenija),
- ultrazvočna sonda (Ultrasonic processor, COLE PARMER Instuments, model CPX 500, Illinois, ZDA).

3.2.2 Aparature za gojenje celic in izvajanje testov na celičnih kulturah

- zaščitna mikrobiološka komora (Iskra PIO, tip M 12, Slovenija; pretok zraka 0,4 m/s, dimenzija filtra 1220 x 610 mm, zagotavlja čiste pogoje dela razreda 4 po ISO 14644-1),
- avtomatske pipete (2-20, 10-100, 100-1000 in 1000-5000 μL, Biohit, Helsinki, Finska),
- avtoklav (Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija),
- plastične centrifugirke (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica),
- mikrotitrski čitalec (Safire^{2TM} Tecan, Švica),
- mikrotitrske plošče s 96-imi vdolbinicami (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica),
- polistirenske ploščice za gojenje celičnih kultur s 6, 12, 24 vdolbinicami (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica),
- plošče z inserti s porozno membrano (Cell Culture Inserts, BD Falcon, Heidelberg, Nemčija),
- invertni svetlobni mikroskop (Olympus CKX41, Japonska),
- CO₂ inkubator (SORVALL[®] Heraeus, KendroLaboratory products),
- centrifuga CENTRIC 322A (Slovenija),
- stekelce hemocitometra (BRAND, Nemčija),
- krovna stekelca Assistent (Glaswarenfabrick Karel Hecht KG, Sondheim, Nemčija),

- objektna stekla Assistent 50 Elka (Glaswarenfabrick Karel Hecht KG, Sondheim, Nemčija),
- mikroepruvete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- hladilnik in zamrzovalnik (Gorenje, Velenje, Slovenija)

3.3 METODE

3.3.1 Izdelava in vrednotenje PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

Izdelava PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

Polimerne nanodelce z vgrajenimi SPION-i smo izdelali z emulzijsko-difuzijsko metodo. Med delom s SPION-i smo morali zaradi visoke lipofilnosti le-teh ves čas nositi zaščitno opremo, med delom z UZ-sondo pa še zaščito za ušesa (glušnike).

Priprava 5 % (m/V) raztopine PVA

Raztopino PVA smo pripravili tako, da smo na magnetnem mešalu v stekleni čaši segreli 95 mL bidestilirane vode (bdH₂O) na \sim 90 °C. Nato smo ugasnili segrevanje in med mešanjem dodali 5 g PVA in nadaljevali z intenzivnim mešanjem, do raztopitve PVA. Nato smo raztopino ohladili, nadomestili izparelo vodo ter premešali. Raztopino smo shranili pri sobi temperaturi.

Priprava osnovne disperzije SPION-ov v raztopini PLGA

V epico smo na analitski tehtnici natehtali 50 mg PLGA, dodali 600 μ L etilacetata (EtAc) in 400 μ L disperzije SPION-ov. Dobljeno disperzijo smo vorteksirali, da se je polimer popolnoma raztopil in da je bila disperzija homogena (epico smo vizualno pregledali). To je bila naša osnovna disperzija SPION-ov v raztopini PLGA (masno razmerje SPION-i: PLGA = 1:1). Epico smo ustrezno označili (datum izdelave, količina PLGA), jo shranili na temnem mestu, pri sobni temperaturi in zatesnjeno s para-filmom (Slika 7).



Slika 7: Disperzija SPION-ov v raztopini PLGA.

Izdelava PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

V epico smo odpipetirali 500 µL 5 % (m/V) raztopine PVA in dodali:

- 1. 100 µL osnovne disperzije SPION-ov v raztopini PLGA ali
- 2. 75 µL osnovne disperzije SPION-ov v raztopini PLGA.

V postopku izdelave MND smo uporabili soniciranje z UZ-sondo in homogeniziranje z rotor-stator homogenizatorjem (Ultra-Turrax).

- Soniciranje poteka s pomočjo UZ-sonde, ki deluje na principu visokofrekvenčnega zvoka (frekvenca nad 20 kHz). Zvok skozi različne snovi potuje različno hitro, torej je hitrost odvisna od gostote in stisljivosti snovi. Vrat sonde mora biti potopljen v tekočino, drugače na zraku pride do odboja valovanja (28).
- Homogeniziranje poteka s pomočjo rotor-stator homogenizatorja. Le-ta potisne tekočino skozi špranjo pod visokim pritiskom (100-2000 bar), kar poveča hitrost toka disperzije in zviša dinamični tlak. Zaradi padca statičnega tlaka v reži pod vrelišče vode, voda zavre, nastajajo mehurčki vodne pare. Le-ti popokajo, ko disperzija zapusti špranjo in pride na območje normalnega zračnega tlaka (kavitacija). Sila je zadosti velika, da zdrobi delce; pomaga pa ji tudi strižna napetost in trki med samimi delci. Premer delcev se zmanjša (29).

Vsebino epice smo sonicirali z UZ-sondo 60 s (Slika 8a). Sonda mora biti vedno potopljena v tekočino, epico pa med soniciranjem dvigujemo in spuščamo, da se ves volumen vzorca enakomerno sonicira. Paziti moramo, da tekočina ne brizga iz epice, ker s tem izgubljamo vzorec. Po končanem soniciranju smo vsebino epice čim hitreje odpipetirali tik ob nastavku homogenizatorja (med homogeniziranjem) v 10 mL bdH₂O

(Slika 8b). Nato smo nadaljevali s homogeniziranjem 5 min. Povprečno velikost in PDI izdelanih nanodelcev smo izmerili s PCS.



Slika 8: (a) UZ-sonda; (b) rotor-stator homogenizator v pravilnem položaju.

Izdelava fluorescentno označenih PLGA nanodelcev

Fluorescentno označene PLGA nanodelce smo pripravili po enakem postopku kot neoznačene PLGA nanodelce le, da smo k disperziji SPION-ov v raztopini PLGA dodali še 10 μ L predhodno pripravljene raztopine barvila 6-kumarina. Raztopino barvila smo pripravili po naslednjem postopku: na analitski tehtnici smo v epico natehtali 2 mg 6-kumarina in dodali 1 mL EtAc. Vsebino epice smo intenzivno mešali do raztopitve barvila in jo nato shranjevali zaščiteno pred svetlobo. Disperzijo MND z vgrajenim 6-kumarinom smo takoj po izdelavi pogledali pod fluorescentnim mikroskopom z uporabo ustreznega filtra (FITC), da smo ugotovili ali MND fluorescirajo.

3.3.2 Čiščenje PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v magnetnem polju

S čiščenjem v magnetnem polju smo odstranili presežni stabilizator (tj. stabilizator, ki ni adsorbiran na površino nanodelcev) in vzorce skoncentrirali. Postopek smo izvedli tako, da smo ob steno čaše postavili magnet (Slika 9). Njegovo magnetno polje je povzročilo zbiranje magnetnih PLGA nanodelcev ob steni čaše, kar smo opazili kot rjavo liso. Postopek čiščenja smo spremljali z vmesnim merjenjem velikosti delcev v posameznih frakcijah, ki so se zbrale na magnetu. Čašo smo pustili na magnetu določen čas, nato pa smo supernatant previdno odpipetirali v drugo čašo; zbrane magnetne nanodelce pa z minimalno količino bdH₂O (~ 150 μ L) sprali s stene in jih prenesli v centrifugirko, kjer smo jih zbirali. Nato smo magnet postavili ob rob čaše, v katero smo prenesli supernatant in postopek ponovili. Pri redispergiranju zbranih delcev smo si pomagali s soniciranjem z UZ-sondo (10-20 s) ali UZ-kadičko (~ 1-2 min).



Slika 9: Čiščenje disperzije PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v magnetnem polju.

3.3.3 Liofilizacija izdelanih magnetnih nanodelcev

Zbrane frakcije na magnetu (Slika 10 a) smo razdelili na alikvote v predhodno stehtane epice, zamrznili v zamrzovalniku pri -20 °C in liofilizirali pri 0,090 mbar 24 h. Po končani liofilizaciji smo epice z vzorcem (Slika 10 b) ponovno stehtali, da smo dobili maso po liofilizaciji. S podatka mase epic pred in po liofilizaciji, smo izračunali količino SPION-ov v naših vzorcih (Enačba 1).

m (nanodelcev) = m (po liofilizaciji) – m (pred liofilizacijo) Enačba 1

Liofilizirane vzorce smo shranjevali na temnem mestu, pri sobni temperaturi (Slika 10c).



Slika 10: (a) zbrane frakcije magnetnih nanodelcev po čiščenju v magnetnem polju, (b) liofilizat PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i, (c) shranjevanje vzorcev po liofilizaciji.

3.3.4 Vrednotenje izdelanih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

Izdelane PLGA nanodelce smo ovrednotili po naslednjih postopkih:

• organoleptično vrednotenje

Vzorce smo ovrednotili v ustreznih pogojih vidljivosti, saj smo le tako lahko natančno opredelili barvo in opazili potencialne (s prostim očesom vidne) delčke, ki so flotirali ali se posedli na dno. Takšno vrednotenje je zelo subjektivno, saj ni odvisno le od svetlobe, pač pa tudi od vida in zaznave opazovalca; omogoča pa hitro grobo oceno dobljenega vzorca. Ovrednotili smo vzorce na različnih stopnjah izdelave MND:

- vzorce disperzije SPION-ov z IJS,
- osnovno disperzijo SPION-ov v raztopini PLGA,
- disperzijo po soniciranju,
- vzorce po čiščenju v magnetnem polju,
- zbrane frakcije na magnetu,
- vzorce po liofilizaciji,
- vzorce po redispergiranju.

• fizikalno vrednotenje s PCS

S pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS, ki deluje na principu fotonske korelacijske spektroskopije (PCS), smo izmerili povprečni premer delcev in PDI (polidisperzni indeks). Metoda temelji na meritvah fluktuacije intenzitete sipane laserske svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev (naključno gibanje delcev, trki delcev z molekulami disperznega medija). Zgornja meja velikosti delcev, ki jo še lahko določimo, je omejena s sedimentacijo (odvisna od gostote in velikosti delcev). PDI pokaže porazdelitev velikosti delcev. Želimo si PDI vrednosti čim bližje 0; kar pomeni, da je vzorec monodisperzen (pomeni, da so vsi delci približno enake velikosti). Kadar pa imamo PDI vrednosti večje (to je bližje 1) to pomeni, da so v vzorcu delci različnih velikosti; torej je vzorec polidisperzen (30). PCS aparat mora biti pred meritvijo prižgan vsaj 30-60 min, da se laser ogreje. V računalniškem programu za snemanje vzorcev določimo tudi pogoje merjenja:

- temperatura: 25 °C,
- viskoznost disperznega medija: 0,8872 mPas (voda)
- lomni količnik disperznega medija (RI): 1,330 (voda)
- λ laserske svetlobe (He-Ne laser, »rdeči laser«): 633 nm,
- kot merjenja: 173 °,
- celica: polistirenska kiveta DTS0012,
- število meritev: 3

Vzorce smo prenesli (po homogeniziranju ali frakcije po čiščenju v magnetnem polju) s pomočjo plastične kapalke v polistirensko kiveto in izvedli meritev. Aparat izračuna povprečni premer delcev in PDI iz treh serij meritev, vsaka serija pa ima še približno 15 vmesnih meritev.

• Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

Obliko, velikost in notranjo strukturo izdelanih MND smo ocenili s pomočjo vizualizacije s TEM. Disperzijo vzorca PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i so s TEM ovrednotili na IJS.

3.4 In vitro vrednotenje MND na celicah

Po izdelavi vzorcev PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i smo le-tem izpostavili še celične kulture. Vse postopke smo izvajali v LAF komori (zaščitna mikrobiološka komora z laminarnim pretokom filtriranega zraka). Vse reagente, materiale in pripomočke (Slika 11 a-d), ki smo jih potrebovali za delo s celicami (nekateri so bili tudi sterilizirani), smo pred vnosom v LAF komoro od zunaj dobro prebrisali s 70 % (V/V) etanolom.



Slika 11: (a,b) gojitvene plastenke; (c) pipetiranje tekočin iz gojitvene plastenke (da ne poškodujemo celic na plošči), (d) epice (Eppendorf-ove epruvete).

Plošče za gojenje celic, gojitvene plastenke in plastične pipete so sterilizirane, zato smo jih iz ovojnine vzeli tik ob komori. Poskusi so vključevali naslednje navedene metode in postopke, kot sledijo.

3.4.1 Priprava rastnih medijev za gojenje celičnih kultur

Vse sestavine za pripravo gojitvenega medija so zamrznjene ali shranjene v hladilniku, zato jih je treba predhodno odtaliti in/ali segreti na sobno temperaturo. Sestavine gojitvenega medija izberemo glede na tip celičnih kultur, ki jih bomo uporabili za poskuse.

- a) Priprava rastnega medija za Caco-2 celice: v sterilno centrifugirko smo prenesli 38,5 mL MEM medija in mu dodali 10 mL FBS, 0,5 mL 1% (V/V) ne-esencialnih aminokislin, 0,5 mL L-glutamina in 0,5 mL 100 U/mL raztopine antibiotika in antimikotika.
- b) Priprava rastnega medija z dodanim HEPES-om za Caco-2 celice: v sterilno centrifugirko smo prenesli 24,5 mL zgoraj pripravljenega medija za Caco-2 celice in dodali 0,5 mL HEPES-a.
- c) Priprava rastnega medija za celice T-47D: v sterilno centrifugirko smo prenesli 44 mL DMEM medija in mu dodali 5 mL FBS, 0,5 mL L-glutamina in 0,5 mL 100 U/mL raztopine antibiotika in antimikotika.
- d) Priprava rastnega medija z dodanim HEPES-om za celice T-47D: v sterilno centrifugirko smo odpipetirali 24,5 mL zgoraj pripravljenega medija za celice T-47D in dodali 0,5 mL HEPES-a.
- *e)* Keratinociti: gojitvenega medija za keratinocite nismo pripravljali sami, ker smo za poskus vstopa magnetnih PLGA nanodelcev uporabili plošče z že nasajenimi keratinociti (pripravili so jih raziskovalci Katedre za farmacevtsko tehnologijo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija).

Po izdelavi smo medij v centrifugirkah dobro premešali, označili z datumom izdelave in vsebino (Slika 12) ter shranili v hladilniku pri 4 °C.



Slika 12: Pravilno označevanje centrifugirke.

3.4.2 Gojenje celic

Postopek presajanja celic smo izvajali na enak način pri obeh vrstah celic, uporabili smo le različne vrste gojitvenih medijev (specifični medij za posamezno vrsto celic). Delali smo v LAF komori in pazili na aseptične pogoje dela. Iz inkubatorja smo vzeli gojitveno plastenko s celicami in najprej odlili rastni medij ter celice sprali s 5 mL PBS. Nato smo

odlili PBS in dodali 1 mL tripsina ter gojitveno plastenko postavili za nekaj minut (1-5 min) v inkubator (37 °C in 5 % CO_2). Tripsin omogoči ločevanje celic od podlage in cepi povezave med celicami. Tako smo dobili med seboj ločene celice (uspešnost postopka smo preverili pod invertnim svetlobnim mikroskopom). Ločenim celim smo dodali 4 mL medija za gojenje in s pipetiranjem spirali celice s podlage, suspenzijo celic smo nato prenesli v sterilno centrifugirko.

V epico smo si pripravili 450 μ L PBS in dodali 50 μ L suspenzije celic (vzorec smo uporabili za določanje števila celic v vzorcu), centrifugirko s suspenzijo celic pa centrifugirali 5 min pri 1300 obratov/min, da so se celice ločile od medija.

Epico, s pripravljeno suspenzijo celic, za določanje števila celic v vzorcu, smo dobro premešali in kanili kapljico suspenzije na stekelce hemocitometra (Slika 13) ter prešteli celice v 4 kvadrantih s pomočjo svetlobnega mikroskopa (31).



Slika 13: Primer stekelca hemocitometra s kvadranti, kjer štejemo celice (31).

Izračun števila celic v vzorcu (Enačba 2):

$$N = 10^4 \times F \times \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4)}{4} \times V$$
Enačba 2

N = število celic/gojitveno plastenko

F = faktor redčenja (v našem primeru 10)

 n_1 - n_4 = število celic v posameznem kvadrantu hemocitometra

V = volumen suspenzije celic, ki smo jo centrifugirali (v našem primeru 5 mL)

Centrifugiranim celicam smo odlili supernatant, dodali 1,5 mL gojitvenega medija in dobro premešali. Pripravili smo si novo gojitveno plastenko in vanjo odpipetirali 13 mL svežega gojitvenega medija ter jo označili (datum, vrsta in pasaža celic).

Celice smo sadili z gostoto:

a) za celice Caco-2: 1×10^4 celic/cm²,

b) za celice T-47D: 2×10^4 celic/cm².

Površina velike gojitvene plastenke je 75 cm². Preračunali smo potreben volumen suspenzije celic za novo gojitveno plastenko (Enačba 3):

Izračun celic:

$$X = \frac{Vs.p.\times S \times D}{N}$$
Enačba 3

D= gostota sajenja celic [št.x 10^4 celic/cm²]

N = št. celic v naši suspenziji celic (iz gojitvene plastenke od koder celice presajamo)

S = površina gojitvene plastenke [cm²]

 $V_{s.p.}$ = volumen suspenzije celic po centrifugiranju [1,5 mL]

X = potreben volumen suspenzije celic za novo gojitveno plastenko [mL]

Ustrezen volumen suspenzije celic prenesemo v pripravljeno gojitveno plastenko s 13 mL gojitvenega medija ter le-to prenesemo v inkubator (37 °C, 5 % CO₂). Ko so celice prerasle približno 80 % rastne površine, smo jih presadili v novo gojitveno plastenko po enakem postopku.

3.4.3 Redispergiranje liofiliziranih vzorcev

Vse osnovne raztopine vzorcev smo pripravili na enak način. Izbrani vzorec (liofilizat) smo redispergirali v gojitvenem mediju z intenzivnim mešanjem na vortex-u ali UZ-kadički, da smo dobili osnovno disperzijo s koncentracijo 800 mg/mL. Vzorec je bil ustrezno redispergiran, ko je bila disperzija po organoleptičnem pregledu popolnoma homogena. Nato smo pripravili še želene redčitve.

3.4.4 Priprava gojitvenih plošč s 96 vdolbinicami za testiraje učinka SPION-ov na celice Celice smo nasadili na polistirenske plošče s 96 vdolbinicami (Slika 14).



Slika 14: Polistirenska plošča s 96 vdolbinicami in pravilno označevanje plošče.

Najprej smo na plošče nasadili celice. Po štetju celic iz gojitvene plastenke, smo preračunali kolikšen volumen suspenzije celic moramo nanesti na plošče s 96 vdolbinicami, če želimo saditi z gostoto 1×10^4 celic/cm². Sadili smo samo v 36 vdolbinic na plošči.

Poskus smo izvajali tako, da smo celice z dodanim vzorcem PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i izpostaviti magnetnemu polju. Zato smo najprej preverili homogenost magnetnega polja nad magnetom, Tako smo pred poskusi izključili vpliv gradienta magnetnega polja, tj. zagotovili smo, da so bile vse celice izpostavljene enaki oz. primerljivi jakosti magnetnega polja. 36 vdolbinic smo določili tam, kjer je bilo magnetno polje najbolj homogeno in jih označili na polistirenski plošči (Slika 15). Tako smo zagotovili enake pogoje magnetnega polja na polistirenski plošči.



Slika 15: Označen je del plošče, kjer je magnetno polje najbolj homogeno; svetlejša barva predstavlja polje z za odtenek šibkejšim magnetnim poljem.

Izračunali smo potreben volumen suspenzije celic za 36 vdolbinic; uporabljena enačba velja samo za naš primer, ni splošna enačba (Enačba 4):

površina 1 vdolbinice: 0,36 cm²

sadili smo z gostoto: 1x10⁴ celic/cm²

potrebovali smo: 0,36 cm² x 1 x 10^4 celic/cm² x 36 vdolbinic = 12,96 x 10^4 celic $\approx 13 \times 10^4$ celic

Izračun:
$$X = \frac{M \times D \times Vs.p.}{N}$$
 Enačba 4

D= gostota sajenja celic [št. x 10^4 celic/cm²]

M = potrebno število celic

N = št. celic v naši suspenziji celic

V_{s.p.} = volumen suspenzije celic po centrifugiranju [1,5 mL] X = potrebni volumen suspenzije celic [mL]

Suspenzijo celic odpipetiramo v ustrezen volumen gojitvenega medija z dodanim HEPESom (Enačbi 5 in 6, enačbi veljata za naš primer izračunave, ni splošna enačba). HEPES vzdržuje pH medija v času izvajanja poskusa, tj. v času, ko so celice izpostavljene magnetnemu polju, kar smo izvajali izven inkubatorja. V posamezno vdolbinico smo z mikropipeto nanašali 50 µL suspenzije celic.

Potrebovali smo: 36 x 50 μ L = 1800 μ L

Izračun:
$$Y = \frac{X \times 2500 \mu L}{1800 \mu L}$$
 Enačba 5

X = potrebni volumen suspenzije celic [mL]

Y = potreben volumen suspenzije celic iz gojitvene plastenke [μ L]

V (gojitveni medij + HEPES) $[\mu L] = (2500-Y) \mu L$ Enačba 6

36 vdolbinic s primerljivo jakostjo magnetnega polja smo razdelili še na polovico (Slika 16). V vdolbinice vrstic B-D in stolpcev 4-9 smo odpipetirali 50 μ L pripravljene suspenzije celic v gojitvenem mediju. V vdolbinice vrstic E-G in stolpcev 4-9 pa smo odpipetirali 50 μ L gojitvenega medija.



Slika 16: Gojitvena plošča s 96 vdolbinicami, označenih je 36 vdolbinic, ki jih uporabimo v poskusih, saj je tam magnetno polje nad magnetom homogeno. V 18 vdolbinic smo nasadili celice, v 18 pa odpipetirali le medij in so služile kot ozadje.

3.4.5 Izpostavitev celic vzorcem MND

Na magnet smo položili pripravljene plošče s celičnimi kulturami, na katere smo z mikropipeto nanesli tudi redispergirane vzorcev MND. Kontrolne plošče nismo izpostavili magnetnemu polju, vendar je bila izpostavljena enakim pogoje v okolju (temperatura, vlaga). Na celičnih kulturah smo vrednotili učinek naslednjih koncentracij PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i: 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL in 300 μ g/mL. Ker so celice že rasle v 50 μ L gojitvenega medija, smo pripravili vzorce dvojne koncentracije (50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL in 600 µg/mL) in k celicam dodali 50 µL disperzije nanodelcev, tako da smo na celicah dobili želeno koncentracijo nanodelcev. Redispergiranje liofilizata in redčenje smo izvajali v LAF komori.

Po nanosu vzorca PLGA nanodelcev na celice, smo eno ploščo izpostavili magnetnemu polju za 1h; drugo ploščo (kontrolo) pa stran od magneta (da se ni čutil njegov vpliv) (Slika 17). Plošči smo pokrili, da so bile celice na temnem, poskus pa smo izvajali pri sobni temperaturi.



PLOŠČA NA MAGNETU

dosega magnetnega polja

Slika 17: Shema eksperimenta izpostavitve celic magnetnemu polju: postavitev plošče s celicami in vzorcem PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i nad magnetom in kontrolnega vzorca izven dosega magnetnega polja.

Po 1 h v magnetnem polju smo plošče s celicami prenesli v inkubator in jih inkubirali (37 °C, 5 % CO₂) :

- a) 24 h,
- b) 48 h.

c) 24h, nato smo jih ponovno izpostavili magnetnemu polju za 1 h in inkubirali 24 h. Temu je sledil pregled celic pod svetlobnim mikroskopom in izvedba MTS testa, ki je opisana spodaj.

3.4.6 Vrednotenje učinkov PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i na celicah

- a) <u>Neposredno opazovanje celičnih kultur pod svetlobnim mikroskopom:</u> celice smo opazovali s pomočjo invertnega mikroskopa direktno na gojišču in na polistirenskih ploščah. Pozorni smo bili na spremembe oblike celic, poškodbe, prisotnost tujkov na gojišču in potencialne kontaminacije.
- b) <u>Ugotavljanje viabilnost celic:</u> uporabili smo MTS reagent, ki je sestavljen iz: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol in elektrone vezočega reagenta fenazin etosulfata (izboljša stabilnost reagenta v raztopini).

MTS test je kalorimetrična metoda ugotavljanja števila živih celic (preživetja celic) v študijah toksičnosti in proliferacije. Metoda temelji na določanju aktivnosti encima mitohondrijske dehidrogenaze, ki ga uporabimo kot kazalec preživetja. MTS se v mitohondrijih tako reducira iz rumene v rdeče obarvan produkt formazan, ki je topen v celičnem mediju (Slika 18). Pretvorbo omogoča NADPH ali NADH, ki nastane pod vplivom encima mitohondrijske dehidrogenaze. Nastaja pa samo v celicah, ki so metabolno aktivne, torej v živih celicah. Količino nastalega produkta nato izmerimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 490 nm (po 1-4 urni inkubaciji po dodatku MTS reagenta) in je sorazmerna številu živih celic v celični kulturi in njihovi metabolni aktivnosti.



Slika 18: Pretvorba MTS reagenta v metabolno aktivnih celicah v rdeče obarvan formazan.

Test je sledil izpostavitvi celic vzorcem MND. Po 1 h izpostavitvi magnetnemu polju, smo plošče prenesli v inkubator (37 °C, 5 % CO₂) za:

- a) 24 h,
- b) 48 h.

Po inkubaciji smo v LAF komori dodali 10 µL MTS reagenta v vsako vdolbinico in celice inkubirali 1-4 ure, nato pa izmerili absorbanco pri 490 nm. Absorbanca je sorazmerna metabolni aktivnosti celic in posredno številu živih celic v vzorcu.

3.4.7 Vstop MND v celice (vzorci za fluorescentno mikroskopijo)

Pripravili smo si polistirenske plošče s 6 vdolbinami (Slika 19). V vsako vdolbino smo položili predhodno sterilizirano krovno stekelce in nanj nasadili celice T-47D z gostoto 2 x 10^4 celic/cm² v 2250 µL medija.



Slika 19: Polistirenska gojitvena plošča s 6 vdolbinami.

Nasajene celice smo nato inkubirali (37 °C, 5 % CO₂) 48 h. Po 48 h smo zamenjali gojitveni medij za celice T-47D z enako količino gojitvenega medija za celice T-47D z dodanim HEPES-om ter k celicam dodali vzorec PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i in 6-kumarinom tako, da je bila končna koncentracija nanodelcev na celicah 300 μ g/mL. Za kontrolo smo nasadili celice, ki jim nismo dodali vzorca MND.

Eno ploščo s celicami smo izpostavili magnetnemu polju (za 1 h), drugo pa paralelno inkubirali izven dosega magnetnega polja. Nato je sledilo barvanje celičnih struktur (jeder, aktinskih filamentov) in priprava preparatov po naslednjem postopku:

- 1. odstranitev rastnega medija s celic,
- 2. spiranje s PBS (dodamo 750 µL),
- 3. 4 % formalin (dodamo 500 µL) za 10 min (fiksiranje),
- 4. spiranje s PBS (dodamo 750 µL),
- 5. Triton-X100 (dodamo 500 μ L) za 10 min,
- 6. spiranje s PBS (dodamo 750 μL),
- 7. barvilo za jedra (dodamo 500 μ L) za 30 min,
- 8. spiranje s PBS (dodamo 750 µL),
- 9. barvilo za aktin (dodamo 500 μ L) za 30 min,
- 10. spiranje s PBS 2-krat (dodamo 750 µL),

- 11. priprava objektnih stekelc: ProLong ® Antifaide Kit,
- 12. odstranitev krovnih stekelc in prenos na objektna stekelca,
- 13. sušenje vsaj 48 h, lakiranje roba,
- 14. mikroskopiranje.

Tako pripravljene preparate smo nato pogledali s fluorescentnim mikroskopom pri ustrezni nastavitvi svetlobe in času izpostavitve ter filtru, optimalnem za uporabljeno barvilo (za jedra, aktin):

- modro barvilo za jedra (Hoechst 33342) filter DAPI,
- rdeče barvilo za aktin (Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate)
 filter TxRed.

3.4.8 SEM in TEM elektronska mikroskopija

a) <u>TEM</u>: presevni elektronski mikroskop (Slika 20) je namenjen vizualizaciji notranje strukture bioloških vzorcev. Vir elektronov, s katerimi ustvarijo sliko, je filament (elektroda) na vrhu mikroskopa, elektrone pa nato usmerjajo s pomočjo sistema elektromagnetnih leč do vzorca in zaslona. Vzorci za TEM morajo biti zelo tanki (30-100 nm) in kontrastni. Pripravljene rezine vzorcev impregnirajo s solmi težkih kovin. Glavni tehniki za pripravo vzorcev sta vklapljanje suspenzije ali tkiva v smolo in izdelava ultra-tankih rezin ter negativno kontrastrianje vzorcev v suspenziji. Tvorba slike je posledica različnega sipanja elektronov na atomih različnih atomskih števil v vzorcu (interakcija elektronov, ki potujejo skozi vzorce). Na zaslonu dobijo monokromatsko sliko vzorca, ki ustreza elektronski gostoti vzorca (32).



Slika 20: Shema sestave TEM elektronskega mikroskopa (32).

b) <u>SEM</u>: vrstični elektronski mikroskop (Slika 21) je namenjen opazovanju površine preparata. Pri elektronski mikroskopiji uporabijo kot vir valovanja elektrone, ki omogočajo boljšo ločljivost od vidne svetlobe. Znotraj mikroskopa je treba zagotoviti vakuum; kot vir elektronov služi elektronska puška (pospeševalna napetost se giblje med 2 in 40 keV, ločljivost enega nanometra, uporabne povečave 5-500000-krat). Elektro-magnetne leče zberejo izsevane elektrone v kondenzorju v ozek snop, ki ga nato deflektor vodi v vrsticah po površini preparata. Ob dotiku elektronov s površino preparata pride do zbijanja sekundarnih elektronov iz površine preparata in te zazna detektor. Signal se ojača. Preparate je potrebno posebej pripraviti, da lahko kljubujejo pogojem v mikroskopu (vakuum, snop elektronov). Po kemični ali fizikalni fiksaciji je preparatom potrebno odstraniti vodo (sušenje pri kritični točki, liofilizacija, evaporacija) (33).



Slika 21: Shema SEM elektronskega mikroskopa (33).

Posušene vzorce pritrdijo na valjaste kovinske nosilce in jih z aparaturo za napraševanje kovin prekrijejo s tanko plastjo ogljika, platine ali zlata (zaščita vzorca, povečana količina zbitih elektronov – boljša slika) (Slika 22) (33).



Slika 22: (a) naprava za sušenje pri kritični točki; (b) naprava za napraševanje kovin; (c) vzorci pripravljeni za opazovanje s SEM(27).

c) priprava, fiksacija celic za SEM in TEM mikroskopijo:

Celice T-47D smo nasadili na porozno membrano na plošči s 24-imi inserti (na polja kjer je bilo magnetno polje homogeno) tako, da smo v vdolbino plošče najprej odpipetirali 800 μ L medija za gojenje T-47D celic, nato vanjo postavili insert in pustili 30 min, da se je membrana prepojila z medijem. Medtem smo pripravili suspenzijo celic iz gojitvene plastenke s T-47D celicami. Celice smo na insert (Slika 23a) nasadili z gostoto 5 x 10⁴ celic/cm² v 200 μ L medija za celice T47D. Celice smo inkubirali 4 dni (37 °C, 5 % CO₂), da so dosegle ustrezno stopnjo konfluence.

Liofiliziran vzorec PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i in 6-kumarinom smo redispergirali v ustreznem volumnu medija za celice T-47D z dodanim HEPES-om tako, da smo dobili vzorec s koncentracijo 600 μ g/mL, ki smo ga nanašali na celice (ker se je vzorec po nanosu na celice razredči z medijem, je bila končna koncentracija MND na celicah 300 μ g/mL).

Ko so celice dosegle ustrezno stopnjo konfluence, smo odstranili medij s celic in ga zamenjali z medijem z dodanim HEPES-om: v vdolbinice smo odpipetirali 800 μ L, na inserte pa 100 μ L gojitvenega medija za celice T-47D z dodanim HEPES-om. 100 μ L vzorca magnetnih PLGA nanodelcev s 6-kumarinom (koncentracija 600 μ g/mL) smo dodali k celicam, ki so rasle na membrani inserta (Slika 23b, 24). Pri kontroli pa smo na insert nanesli le 100 μ L medija za celice T-47D z dodanim HEPES-om. Eno ploščo smo nato izpostavili magnetnemu polju za 2 h, drugo ploščo pa izven dosega magnetnega polja pri temperaturi 30°C. Po 2 h smo celice fiksirali.



Slika 23: (a) insert z membrano na katero nasadimo celice, (b) polistirenska plošča s 24 vdolbinami, označena so polja kamor smo nanesli vzorce MND in kontrolne celice.



Slika 24: Shema inserta z nasajenimi celicami in nanesenim vzorcem MND.

Fiksative (pred uporabo so bili shranjeni v hladilniku pri 4°C, zaščiteni pred svetlobo) so pripravili na Inštitutu za biologijo celice na Medicinski fakulteti (Ljubljana, Slovenija), kjer so izvedli tudi elektronsko mikroskopijo pripravljenih preparatov. Fiksativ je bil sestavljen iz dveh komponent: PA (2 % (m/V) paraformaldehid) in GA (2 % (V/V) glutarataldehid), oba v kakodilatnem pufru pH 7,4.

A. Fiksiranje vzorcev in SEM:

Vsak vzorec smo fiksirali tako, da smo dodali:

- v vsako izmed 6 vdolbin: 800 μL fiksativa_{SEM},
- na vsakega izmed 6 insertov: 200 μL fiksativa_{SEM},

in pustili stati 1 min pri 4 °C.

Nato smo odpipetirali vso tekočino iz obeh predelkov (vdolbina in insert). Na dve novi plošči s 24 vdolbinami smo v 4 vdolbine odpipetirali 800 μ L fiksativa_{SEM}. Iz plošče, ki je bila izpostavljena magnetnemu polju, smo na novo ploščo prenesli dva inserta, ki sta označena kot kontrola in dva inserta, kamor smo dodali vzorec celic, ki so bile

izpostavljene magnetnim PLGA nanodelcem. Na enak način smo na drugo novo ploščo prenesli inserte še iz plošče, ki ni bila izpostavljena magnetnemu polju.

Na vsak prenesen insert smo nato odpipetirali še toliko fiksativa_{SEM}, da je bil insert popolnoma napolnjen s fiksativom (Slika 25). Plošči smo ustrezno označili, jih zavili v para-film in postavili za 1,5 h v hladilnik (4 °C).



Slika 25: Insert napolnjen s fiksativom.

Plošče smo nato odnesli na Inštitut za biologijo celice na Medicinski fakulteti v Ljubljani. Po 2 h v hladilniku, so celice sprali z 0,1 M kakodilatnim pufrom in fiksirali z 1 % (m/V) OsO₄. Temu je sledila dehidracija vzorcev s serijo raztopin acetona in vode naraščajoče koncentracije. Preparate so posušili pri kritični točki, jih naparili z zlatom in opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

B. Fiksiranje vzorcev in TEM:

Postopek dela je bil delno enak kot pri fiksaciji celic za SEM, razlika je bila le, da smo uporabili fiksativ za TEM.

Postopek priprave vzorcev za TEM mikroskopijo je bil enak kot za SEM s to razliko, da so vzorce dehidrirali s serijo raztopin etanola in vode naraščajoče koncentracije. Preparate so nato zalili z epoksi smolo in jih prenesli v termostat, kjer je smola pri 38 °C polimerizirala. Ultratanke rezine vzorcev so kontrastirali s pomočjo uranil acetata in svinčevega citrata ter jih opazovali s TEM.

TEM smo uporabili za ugotavljanje privzema in lokalizacije MND v celicah in opazovanje morebitnih morfoloških sprememb znotrajceličnih organelov po izpostavitvi celic vzorcem MND.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Izdelava in vrednotenje PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

4.1.1 Izdelava PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

Cilj našega raziskovalnega dela je bil izdelati PLGA nanodelce z vgrajenimi SPION-i. PLGA nanodelci so ogrodni dostavni sistem, torej nanosfere, v katerih so dispergirani SPION-i s povprečno velikostjo okoli 5 nm. Da dosežemo želen biološki učinek in tudi želen razpolovni čas, moramo zagotoviti optimalno velikost izdelanih polimernih MND. Postopek izdelave smo zato optimirali. Naš cilj je bil tudi, da bi se kar se da izognili agregaciji SPION-ov in izdelanih polimernih nanodelcev. Za izdelavo polimernih MND smo uporabili emulzijsko-difuzijsko metodo, pri kateri smo za homogenizacijo emulzije uporabili UZ-sondo. UZ-sonda proizvaja UZ večje jakosti kot UZ-kadička, zato dobimo kot rezultat kapljice oziroma delce manjših velikosti. Pri soniciranju pride zaradi vnosa energije do segrevanja vzorca, kar ima za posledico izhlapevanje topila (v našem primeru je to EtAc). To opazimo med samim soniciranjem, ko postaja epica na dotik vedno toplejša. Pojavi pa se tudi rjav rob, ki je posledica izhlapevanja topila in posledičnega nalaganja SPION-ov na steno epice. Koliko topila izhlapi med poskusom smo skušali ugotoviti tako, da smo sonicirali samo topilo, tj. EtAc. Izbrali smo si različne čase soniciranja (Tabela II) in s pomočjo tehtanja epic izračunali zgubo topila. Ugotovili smo, da se z daljšanjem časa soniciranja vzorec vedno bolj segreva, zato izhlapi vedno več topila; zaradi adsorpcije na steno epice pa je tudi izguba vzorca SPION-ov večja.

t [s]	m _{pred} [mg]	m _{po} [mg]	m _{izguba} [mg]
60	1474,1	1413,3	60,8
70	1509,1	1422,9	86,2
80	1528,5	1418,1	110,4
90	1494,3	1280,5	213,8
100	1507,3	1289,8	217,5
110	1503,6	1283,4	220,2
120	1491,9	1231,4	260,4

Tabela II: Izhlapevanje etilacetata med soniciranjem z UZ sondo.

Na podlagi ugotovitev smo določili, da je optimalen čas soniciranja 60 s, saj je bila izguba topila takrat najmanjša, hkrati pa je bil najmanj opazen tudi rjav rob na epici. Z vidika

izhlapevanja medija bi bilo smiselno čas soniciranja še skrajšati, a v tem primeru homogeniziranje vzorca ne bi bilo dovolj učinkovito, zato smo se odločili za minimalni čas, ki je dajal ustrezno homogeniziran vzorec. Metodo izdelave smo optimizirali tudi tako, da smo spreminjali volumsko razmerje disperzije SPION-ov in PVA ter ugotavljali vpliv na velikost izdelanih polimernih MND. Ugotovili smo, da se v primeru manjšega razmerja med volumnom disperzije SPION-ov in PVA, rjav rob na epici praktično ne pojavi. Paziti smo morali, da je bil vrat sonde vedno potopljen v tekočino, saj je v nasprotnem primeru lahko rjav rob posledica brizganja vzorca in ne dejanskega izhlapevanja topila. Da so bili optimizirani pogoji ustrezni (namesto 100 µL smo dodali 75 µL disperzije SPION-ov), je pokazala tudi meritev velikosti delcev, saj so bili izdelani delci po optimizirani metodi še manjši kot pred njo (Tabela III).

Volumen dodane disperzije	velikost [nm]	PDI
SPION-ov		
100 μL	262,1 ± 3,2	$0,225 \pm 0,015$
75 μL	$209,3 \pm 11,1$	$0,254 \pm 0,004$

Tabela III: Primerjava velikosti delcev in PDI pri različnem dodatku disperzije SPION-ov.

Po soniciranju smo dobljeno emulzijo razredčili ob mešanju z rotor-stator homogenizatorjem. Ugotovili smo, da se z večanjem hitrosti homogeniziranja povprečna velikost izdelanih delcev zmanjšuje. Tako smo dobili najmanjše delce pri homogeniziranju s hitrostjo 24000 obr./min, nadaljnje soniciranje z UZ-sondo ni zmanjšalo velikosti delcev. Iz rezultatov, prikazanih v tabeli IV, je vidno, da se povprečna velikost delcev po dodatnem soniciranju z UZ-kadičko dodatno ne zmanjša. Homogenizator je omogočal nastavitev hitrosti le do 24000 obr./min, zato smo poskus izvajali le do te končne hitrosti.

Tabela IV: Vpliv hitrosti homogeniziranja na velikost in porazdelitev velikosti izdelanih polimernih MND.

Hitrost homogeniziranja [obr./min]	velikost [nm]	PDI
7200	743,5 ± 36,2	$0,148 \pm 0,034$
14400	339,1 ± 10,7	0,413 ± 0,037
24000	252,3 ± 12,8	0,264 ± 0,022
24000 + 5 min na UZ-kadički	256,3 ± 11,5	0,316 ± 0,020

Pri PDI nismo opazili izrazitega trenda; ugotovili smo, da se le-ta najprej s povečevanjem hitrosti povečuje, nato pa pri 24000 obr./min spet pade in se nato spet povečuje, če po končanem homogeniziranju pri 24000 obr./min vzorec še dodatno 5 min soniciramo v UZ-kadički. Na podlagi dobljenih rezultatov smo za nadaljnjo izdelavo polimernih MND izbrali naslednje parametre:

- soniciranje 60 s z uporabo UZ-sonde in nato
- redčenje med homogeniziranjem pri 24000 obr./min 5 min.

S tem postopkom smo pripravili vzorce PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i za nadaljnje poskuse in jim pomerili velikost delcev in PDI (Tabela V).

Tabela V: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti štirih paralelnih vzorcev PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i.

	velikost [nm]	PDI
Vzorec ₁	$222,1 \pm 6,7$	$0,250 \pm 0,013$
Vzorec ₂	$234,8 \pm 8,5$	$0,268 \pm 0,012$
Vzorec ₃	251,9 ± 1,0	$0,294 \pm 0,041$
Vzorec ₄	249,0 ± 6,0	0,278 ± 0,019

Rezultati kažejo, da je bila metoda izdelave dobro ponovljiva, saj je bila povprečna velikost delcev v vseh vzorcih primerljiva; podobno velja tudi za porazdelitev velikosti izdelanih polimernih ND oziroma PDI.

4.1.2 Priprava fluorescentno označenih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

Za spremljanje vstopa izdelanih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v celice T-47D in keratinocite, smo izbrali vzorce, ki so bili označeni s fluorescentnim barvilom. Disperziji SPION-ov smo med izdelavo dodali še raztopino fluorescentnega barvila, kar nam je omogočilo spremljanje delcev v znotrajceličnem prostoru s pomočjo fluorescentnega mikroskopa (Tabela VI).

	velikost [nm]	PDI
Vzorec 1	$220,5 \pm 3,1$	$0,259 \pm 0,025$
Vzorec ₂	$227,2 \pm 2,5$	$0,251 \pm 0,008$
Vzorec ₃	$230,7 \pm 1,2$	$0,263 \pm 0,008$
Vzorec 4	$251,7 \pm 2,7$	$0,275 \pm 0,012$

Tabela VI: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti štirih paralelnih vzorcev fluorescentno označenih MND.

Če primerjamo povprečno velikost izdelanih magnetnih PLGA ND brez (Tabela V) in z fluorescentnim barvilom (Tabela IV), vidimo, da so rezultati primerljivi (Slika 26); torej vgrajeno barvilo ne vpliva bistveno na velikost in porazdelitev velikosti izdelanih polimernih MND. Nekoliko večji so nanodelci brez fluorescentnega barvila, kar je lahko posledica samega staranja disperzije SPION-ov; saj smo vzorce s fluorescentnim barvilom izdelali nekoliko kasneje kot vzorce brez barvila (s staranjem disperzije se začne pojavljati usedlina - posedanje SPION-ov, posledično je bila količina SPION-ov v odvzetem alikvotu disperzije za pripravo vzorcev z barvilom, manjša).



Slika 26: Primerjava povprečnih velikosti izdelanih magnetnih PLGA nanodelcev brez in z vgrajenim fluorescentnim barvilom (n = 3).

Po izdelavi smo s pomočjo fluorescentnega mikroskopa preverili ali izdelani polimerni ND s 6-kumarinom fluorescirajo, torej ali se je barvilo vgradilo v ND. Ugotovili smo, da izdelani magnetni PLGA ND zeleno fluorescirajo in so pod mikroskopom dobro vidni (Slika 27).

Opazimo lahko prisotnost manjših agregatov, ki so posledica podvrženosti MND k agregaciji. Pri posameznih agregatih pa lahko opazimo tudi diskretne delce, ki dokazujejo enostavno redispergiranje agregatov. Vidna je tudi rahla fluorescenca medija v katerem so dispergirani magnetni PLGA ND, kar je posledica prisotnosti prostega 6-kumarina, ki se ni vgradil v magnetne PLGA ND med postopkom izdelave. Fluorescenca okolja je bistveno manjša kot fluorescenca magnetnih PLGA ND, iz česar lahko sklepamo, da se je večina barvila vgradila v nanodelce.



Slika 27: Redispergirani PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i in 6-kumarinom v prečiščeni vodi pod fluorescentnim mikroskopom. Opazna je zelena fluorescenca 6-kumarina.Merilo: 20 μm.

4.1.3 Pregled izdelanih magnetnih PLGA ND s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM)

S presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) smo ugotovili, da imajo izdelani magnetni polimerni ND kroglasto obliko in se med seboj razlikujejo po velikosti (Slika 28A). Izdelani nanodelci agregirajo, vendar ne nastajajo nerazdružljivi skupki. Pri bolj podrobnem pregledu vzorca (večja povečava), smo lahko opazovali notranjo strukturo MND (Slika 28 B).

Polimerni nanodelec je sestavljen iz SPION-ov in PLGA v sredini in obdan s plastjo stabilizatorja (PVA), kar je lepo vidno na sliki 28 B. V plašču stabilizatorja okrog nanodelca so prisotni posamezni SPION-i, ki so se ujeli med samo izdelavo; vendar so SPION-i ločeni med seboj (prisotni niso agregati le-teh).



Slika 28: PLGA nanodelec z vgrajenimi SPION-i pri manjši (A) in pri večji (B) povečavi. Delec je obdan s slojem stabilizatorja v katerem so ujeti posamezni SPION-i. Merilo: (A) je 200 nm in (B) je 20 nm.

Naša opažanja so v skladu s študijami drugih raziskovalcev, ki navajajo, da pri uporabi PLGA nastanejo ND z vgrajenimi SPION-i, ki so obdani s plaščem stabilizatorja (15). V drugih študijah so zasledili tudi pojav različnih oblik izdelanih magnetnih ND, v našem primeru pa je bila oblika magnetnih ND okrogla (11, 12).

4.1.4 Rezultati vrednotenja PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

Vrednotenje izdelanih polimernih ND je potekalo od samega začetka (vzorci SPION-ov z IJS), do končnega izdelka – PLGA nanodelci z vgrajenimi SPION-i.

• organoleptično vrednotenje:

- <u>disperzija SPION-ov v EtAc:</u> je temno-rjava tekočina (najbolj podobna oljni tekočini, ki lepo teče) z oranžnim leskom, če jo izpostavimo magnetnemu polju se premika skupaj z magnetom ob steni stekleničke, ni vidnih plavajočih delcev ali usedline (le-ta se začne pojavljati s staranjem disperzije),
- <u>disperzija SPION-ov v raztopini PLGA:</u> je temno-rjava tekočina (ni več oljnatega videza) z oranžnim leskom, še vedno reagira na magnetno polje, a že manj izrazito gibanje tekočine, tudi tukaj ni bilo vidnih plavajočih delcev ali usedline,
- <u>emulzija disperzije SPION-ov v raztopini PVA:</u> še vedno je temno-rjavo obarvana tekočina (za odtenek svetlejša kot pred soniciranjem); med soniciranjem se lahko pojavi rjav obroč na steni epice zaradi izhlapevanja EtAc,
- <u>disperzija magnetnih PLGA nanodelcev v bdH₂O:</u> po odpipetiranju emulzije v prečiščeno vodo tik ob vratu homogenizatorja nastane suspenzija nanodelcev, ki je oranžno obarvana; včasih so se pojavili majhni plavajoči delčki (kot oblak), redkeje je bila vidna rahla oborina (samo, če so nastali večji delčki);</u>
- <u>čiščenje izdelanih polimernih MND v magnetnem polju:</u> na steni čaše, kjer smo pritrdili magnet, se pričnejo nabirati magnetni PLGA nanodelci (to vidimo kot rjavo-oranžno sled na steni čaše), supernatant pa z vsakim čiščenjem postaja svetlejše oranžne barve, dokler ni barva še komaj zaznavna (ko čiščenje zaključimo),
- <u>zbrane frakcije na magnetu:</u> frakcije, ki se zberejo na steni čaše med čiščenjem z magnetom in jih nato redispergiramo v prečiščeni vodi, so temno-oranžno obarvane,
- <u>po liofilizaciji</u>: PLGA nanodelci z vgrajenimi SPION-i so na videz podobni oranžno obarvani sladkorni peni,
- po redispergiranju: rahlo oranžno obarvana disperzija.
- fizikalno vrednotenje s pomočjo PCS: določili smo povprečni premer (hidrodinamska velikost) in polidisperzni indeks (PDI) nanodelcev s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS. Primerljivost rezultatov smo zagotovili s pogoji meritev, ki so bili vedno enaki. Iz meritev (Tabeli V in VI) opazimo, da so paralelni vzorci primerljivi, s čimer smo dokazali ponovljivost metode izdelave. Vsi vzorci PLGA nanodelcev (brez in s fluorescentnim barvilom) niso bili izdelani

zaporedoma, ampak v daljšem časovnem razmiku (približno 3 mesece); zato je lahko majhna razlika v velikosti polimernih MND v vzorcih tudi posledica staranja disperzije SPION-ov. Izkazalo se je namreč, da disperzija SPION-ov delno spreminja lastnosti tekom shranjevanja. Vzrok je lahko delno izhlapevanje topila (to je EtAc) ali posedanje MND. Pri PDI nismo opazili izrazitega nihanja v vrednostih, rezultati so primerljivi (Tabeli V in VI). Ugotovili smo, da so imeli vzorci z večjo povprečno velikostjo delcev tudi večji PDI; vendar imajo vzorci polimernih ND z vgrajenimi SPION-i, ki so bili izdelani zaporedno, primerljive PDI vrednoti.

4.1.5 Čiščenje v magnetnem polju

Po sami izdelavi disperzije, ki smo jo stabilizirali s PVA, smo izvedli še čiščenje s pomočjo magnetnega polja. Najprej smo vzorce magnetnih PLGA nanodelcev izpostavili magnetnemu polju za 180 min, vmes pa v določenih časovnih intervalih (Tabela VII) odvzemali vzorce supernatanta (frakcij na magnetu med čiščenjem nismo odstranjevali) in jim pomerili velikost delcev in PDI. Iz rezultatov opazimo trend zmanjševanja povprečne velikosti magnetnih PLGA nanodelcev v supernatantu. Iz tega sklepamo, da čiščenje poteka postopoma in da magnet najprej pritegne večje nanodelce.

Tabela VII: Spremljanje velikosti polimernih MND v supernatantu med postopkom čiščenja. Čiščenje v magnetnem polju smo izvajali 180 min, vmes smo odvzeli vzorce supernatanta in jim pomerili velikost delcev in PDI.

t [min]	velikost [nm]	PDI
0	354,0±6,9	$0,335 \pm 0,004$
15	$310,3 \pm 11,9$	0,255 ± 0,018
40	$305,8 \pm 4,4$	$0,375 \pm 0,037$
60	$239,3 \pm 1,0$	$0,335 \pm 0,011$
120	$216,9 \pm 4,3$	$0,457 \pm 0,014$
180	$176,2 \pm 8,1$	$0,547 \pm 0,026$

Vrednosti PDI nihajo, kar je verjetno posledica gibanja delcev zaradi magnetnega polja in začasnega nastanka agregatov med potovanjem na steno čaše (Slika 29).



Slika 29: PDI magnetnih PLGA nanodelcev tekom 180 min čiščenja v magnetnem polju.

Izkazalo se je, da moramo čistiti postopoma in da časovni presledki med posameznim stopnjami čiščenja ne smejo biti predolgi. Če pustimo disperzijo naenkrat predolgo na magnetu, le-ta res potegne več magnetnih PLGA nanodelcev iz disperzije, vendar le-ti agregirajo. To se kaže kot povečanje velikosti izdelanih polimernih MND v primerjavi z velikostjo takoj po sami izdelavi (Tabela VIII). Frakcijam, ki so se zbrale na magnetu in so imele povprečno velikost nanodelcev večjo kot je bila takoj po izdelavi, smo s soniciranjem v UZ-kadički razbili agregate. Da je šlo res samo za šibko agregiranje smo ugotovili s tem, ko smo po soniciranju v UZ-kadički (ali z UZ-sondo) ponovno pomerili povprečno velikost nanodelcev in je le-ta padla na približno vrednost tiste pred čiščenjem v magnetnem polju (npr. pred redispergiranjem: $333,9 \pm 22,9$ nm, po redispergiranju z UZ-kadičko: $269,9 \pm 2,1$ nm).

t [min] na magnetu		velikost [nm]	PDI
0		373,3 ± 6,2	$0,254 \pm 0,022$
30	supernatant 1	$175,5 \pm 1,9$	$0,288 \pm 0,007$
	redispergirana frakcija 1	445,0 ± 0,3	$0,344 \pm 0,079$
60	supernatant 2	$188,3 \pm 14,6$	0,382 ± 0,123
	redispergirana frakcija 2	526,5 ± 47,1	$0,494 \pm 0,047$
90	supernatant 3	$198,9 \pm 30,3$	$0,322 \pm 0,034$
	redispergirana frakcija 3	434,1 ± 17,7	0,391 ± 0,040
120	supernatant 4	$111,8 \pm 1,1$	0,538 ± 0,006
	redispergirana frakcija 4	$735,2 \pm 110,7$	0,713 ± 0,091

Tabela VIII: Povprečna velikost polimernih MND v supernatantu in v redispergiranih frakcijah med postopkom čiščenja v magnetnem polju; interval čiščenja: 30 min.

Nekaj MND nismo mogli popolnoma ločiti od medija, saj bi za uspešnejše čiščenje morali uporabiti posodo z ravno steno h kateri prislonimo magnet. Mi smo v ta namen uporabili čaše, ki so ukrivljene, zato je stična površina z magnetom omejena na stični rob, zaradi česar je izkoristek čiščenja nižji. Metodo čiščenja smo optimizirali tako, da smo izvajali čiščenje v manjših (to je 5 min) intervalih na magnetu. Po 5 min smo supernatant prenesli v novo čašo, ki smo jo nato ponovno izpostavili magnetnemu polju (Tabela IX).

t [min] na	frakcija		velikost [nm]	PDI
magnetu				
0		vzorec takoj po izdelavi	$209,3 \pm 11,1$	$0,254 \pm 0,004$
5	1	supernatant 1	201,9 ± 7,0	0,254 ± 0,011
		redispergirano 1	333,9 ± 22,9	$0,420 \pm 0,085$
		redis. + 10 s UZ-sonde	269,9 ± 2,1	$0,227 \pm 0,023$
5	2	supernatant 2	$187,8 \pm 5,7$	$0,246 \pm 0,022$
(10 min)		redispergirano 2	251,7 ± 12,0	$0,298 \pm 0,023$
5	3	supernatant 3	$177,2 \pm 6,2$	0,231 ± 0,010
(15 mi)		redispergirano 3	233,8 ± 8,4	$0,294 \pm 0,025$
5	4	supernatant 4	170,6 ± 5,0	$0,226 \pm 0,004$
(20 min)		redispergirano 4	205,5 ± 14,4	$0,289 \pm 0,039$
5	5	supernatant 5	$169,1 \pm 7,0$	0,221 ± 0,012
(25 min)		redispergirano 5	205,4 ± 8,8	$0,265 \pm 0,020$
5	6	supernatant 6	$162,4 \pm 5,4$	0,211 ± 0,012
(30 min)		redispergirano 6	189,8 ± 13,8	0,263 ± 0,011
5	7	supernatant 7	152,4 ± 5,2	0,203 ± 0,010
(35 min)		redispergirano 7	218,1 ± 12,8	$0,262 \pm 0,020$
		redis. + 10 s UZ-sonde	191,0 ± 6,7	$0,179 \pm 0,006$
5	8	supernatant 8	151,5 ± 5,2	0,202 ± 0,003
(40 min)		redispergirano 8	168,6 ± 9,8	0,283 ± 0,015

Tabela IX: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti magnetnih PLGA nanodelcev po 5 min časovnih intervalih čiščenja v magnetnem polju.

Magnetne PLGA nanodelce, ki jih je magnet potegnil na steno čaše, smo sprali s stene čaše z minimalno količino prečiščene vode in jih prenesli v centrifugirko ter izmerili povprečno

velikost delcev in PDI pred in po dispergiranju (Sliki 30 in 31). Da je optimizirana metoda čiščenja ustrezna, smo ugotovili iz pregleda velikosti magnetnih PLGA nanodelcev med čiščenjem. Iz rezultatov vidimo, da med takim postopkom čiščenja ne pride do nastanka ireverzibilnih agregatov; saj smo tiste agregate, ki so nastali, razbili (velikost ND se zmanjša po uporabi UZ-kadičke ali UZ-sonde), vendar so nekoliko večji.



Slika 30: Povprečna velikost magnetnih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i po 5 min časovnih intervalih čiščenja v magnetnem polju.



Slika 31: PDI magnetnih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i po 5 min časovnih intervalih čiščenja v magnetnem polju.

Isto metodo čiščenja v magnetnem polju (5 min časovni intervali) smo uporabili tudi pri vzorcih magnetnih PLGA nanodelcev z vgrajenim fluorescentnim barvilom (Tabela X). Frakcijam na magnetu smo izmerili povprečno velikost in porazdelitev velikosti delcev.

Tabela X: Povprečna velikost in porazdelitev velikosti polimernih MND z vgrajenim 6-kumarinom med čiščenjem v magnetnem polju (čiščenje je potekalo v 5 min intervalih, le meritve velikosti delcev in PDI smo izvajali manj pogosto).

frakcija		velikost [nm]	PDI
	vzorec takoj po izdelavi	$227,2 \pm 2,50$	$0,251 \pm 0,008$
3	redispergirano 3	$426,2 \pm 40,0$	$0,771 \pm 0,122$
(15 min)	redis. 3 + 10 s UZ-sonde	259,6 ± 2,10	$0,380 \pm 0,022$
6	redispergirano 6	$321,2 \pm 10,7$	$0,250 \pm 0,017$
(30 min)	redis. 6 + 10 s UZ-sonda	$250,6 \pm 5,30$	$0,323 \pm 0,011$
8	supernatant 8	$146,4 \pm 5,20$	$0,189 \pm 0,012$
(40 min)	redispergirano 8	$328,9 \pm 31,9$	$0,255 \pm 0,127$
	redis. 8 + 10 s UZ-sonda	$230,5 \pm 14,4$	$0,289 \pm 0,039$

Tudi pri čiščenju magnetnih PLGA nanodelcev z vgrajenim fluorescentnim barvilom se je pokazal enak vpliv na velikost izdelanih nanodelcev kot pri vzorcih brez barvila; to je, da med takim postopkom čiščenja ne pride do nastanka večjih agregatov (ireverzibilne agregacije). Z optimizirano metodo so nastajali le manjši agregati in le-te je bilo lažje razbiti.

4.1.6 Liofilizacija izdelanih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i

Vzorce PLGA ND z vgrajenimi SPION-i smo liofilizirali, da smo pripravili dolgotrajno stabilne vzorce v suhi obliki in ohranili njihove lastnosti. Liofilizat smo po liofilizaciji ponovno redispergirali in ugotovili, da se vzorec redispergira že samo s stresanjem. Če so bili vidni agregati, pa so se le-ti dispergirali že ob mešanju na vortex-u ali nekaj minutnem soniciranju v UZ-kadički. Bolj grobi pristopi za redispergiranje niso bili potrebni. Nastala je homogena, rumeno-oranžna disperzija. Redispergiranemu vzorcu smo izmerili tudi povprečno velikost in porazdelitev velikosti MND. Rezultati so bili primerljivi z rezultati istega vzorec takoj po izdelavi, kar je potrdilo našo hipotezo, da liofilizacija ne vpliva na velikost delcev, pač pa jo ohrani na isti ravni kot je bila pred liofilizacijo (npr. pred liofilizacijo: 275,4 \pm 5,77 nm, po liofilizaciji: 266,5 \pm 5,615 nm). Tako smo potrdili tudi predpostavko, da je liofilizacija ustrezen postopek za pripravo vzorcev, ki niso namenjeni takojšnji uporabi (pretvorba v dolgotrajno stabilno stanje).

Maso liofilizata smo določili tako, da smo stehtali epice pred samo liofilizacijo in po njej ter tako dobili podatek o masi PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v posameznem vzorcu (Tabeli XI in XII). Rezultati kažejo zelo dobro ponovljivost med vzorci, saj se masa vzorcev ni bistveno razlikovala. Podatke o masi MND smo uporabili pri poskusih na celičnih kulturah, da smo lahko pripravili vzorce želene koncentracije.

		EPICA 1	EPICA 2	EPICA 3	EPICA 4	EPICA 5	EPICA 6
	m (prazna	925,67	944,33	928,82	941,93	946,62	929,32
	epica) [mg]						
EC	m (po liof.)[mg]	926,82	945,51	930,02	943,12	947,76	930,42
ZOR	Δ m (liof	1,15	1,18	1,20	1,19	1,14	1,10
V	začetna) [mg]						
	Δ m [mg]			1,16 =	± 0,06		
	m (prazna	944,97	945,88	945,36	940,98	941,12	935,72
2	epica) [mg]						
EC	m (po liof.)[mg]	946,23	947,24	946,61	942,35	942,34	936,88
ZOR	Δ m (liof	1,26	1,36	1,26	1,37	1,22	1,16
N	začetna) [mg]						
	Δ m [mg]		L	1,27 =	± 0,08	I	
	m (prazna	935,88	97,66	942,01	929,41	925,57	970,96
3	epica) [mg]						
EC	m (po liof.)[mg]	936,90	928,65	943,06	930,47	926,64	971,94
ZOR	Δ m (liof	1,02	0,99	1,05	1,06	1,07	0,98
V	začetna) [mg]						
	Δ m [mg]	1,03 ± 0,04					
	m (prazna	945,28	937,51	942,32	935,70	942,14	942,17
4	epica) [mg]						
EC ²	m (po liof.)[mg]	946,17	938,42	943,28	936,66	943,07	943,12
ZOR	Δ m (liof	0,89	0,91	0,96	0,96	0,93	0,95
V.	začetna) [mg]						
	Δ m [mg]		1	0,93 =	± 0,03	1	L

Tabela XI: Masa liofilizata PLGA MND z vgrajenimi SPION-i brez barvila.

	Vzorec 2	Vzorec ₃	Vzorec 4
m (prazna epica) [mg]	935,25	946,36	944,38
m (po liofilizaciji)[mg]	936,42	948,13	945,66
Δ m (liofzačetna) [mg]	1,17	1,77	1,28
Δ m [mg]	1,41±0,32		

Tabela XII: Masa liofilizata PLGA MND z vgrajenimi SPION-i in barvilom 6-kumarinom.

Če primerjamo maso liofiliziranih vzorcev izdelanih magnetnih PLGA nanodelcev brez in s fluorescentnim barvilom, vidimo, da pri vzorcih z barvilom masa bolj niha, kakor pri vzorcih brez barvila. Večja razlika v masah je verjetno posledica kasnejše izdelave vzorcev z barvilom, saj je disperzija SPION-ov med staranjem spreminjala svoje lastnosti (s staranjem so se SPION-i v disperziji posedali). Zaradi posedanja SPION-ov, smo lahko pri odmerjanju disperzije SPION-ov naredili napako, saj morda SPION-i niso bili homogeno dispergirani, kar se je pokazalo kot nihanje mase liofilizata MND.

4.2 Poskusi na celičnih kulturah

Izdelane PLGA nanodelce z vgrajenimi SPION-i smo vrednotili *in vitro* še na celičnih kulturah. Uporabili smo dve vrsti celičnih kultur, in sicer celice raka kolona (Caco-2 celice) in celice hormonsko odvisnega raka dojke (T-47D celice).

Nanodelci so dostavni sistem, ki se že uporablja za dostavo nekaterih ZU, vendar ima uporaba SPION-ov velik potencial predvsem pri dostavi ZU za zdravljenje rakavih obolenj. Tako se drastično zmanjšajo stranski učinki citostatikov, saj lahko s pomočjo magnetnega polja pripeljemo ZU na točno določeno mesto in bistveno zmanjšamo neželene učinke. Torej je smiselno izvajati *in vitro* poskuse na rakavih celicah, saj s tem dobimo dober vpogled v obnašanje samega sistema na potencialni tarči.

Izvedli smo tri vrste poskusov, in sicer:

- vpliv izdelanih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i na preživetje celic s pomočjo MTS testa,
- vstop izdelanih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v celice in barvanje posameznih celičnih struktur ter vrednotenje s fluorescentno mikroskopijo,
- vstop izdelanih PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v celice ter njihov vpliv na morfologijo celic in celičnih organelov, vrednotenje z elektronsko mikroskopijo (SEM in TEM).

4.2.1 Vpliv PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i na morfologijo celic T-47D

Celične kulture smo izpostavili vzorcem MND (koncentracija vzorca 300 µg/mL) in magnetnemu polju za 2 h. Poskus smo izvajali pri 30 °C in na tak način omogočili tudi aktivni privzem MND v celice.

Slike celic T-47D posnete z vrstičnim elektronskim mikroskopom kažejo, da je oblika celic ne glede na tretiranje popolnoma primerljiva (Sliki 32 in 33). Površina celic *T-47D* je pokrita s številnimi membranskimi izrastki. V primeru celic, ki so bile izpostavljene MND lahko opazimo večje število lukenj v apikalni plazmalemi celic (Sliki 33 E in F) kot v primeru celic, ki niso bile izpostavljene MND (Sliki 32 E in F). Predvidevamo, da so luknje v plazmalemi posledica učinka MND, saj je bil postopek priprave preparatov v obeh primerih enak. Magnetno polje ne vpliva na gostoto celic v vzorcu, če le te niso izpostavljene MND, tj. primerljiva gostota celic v vzorcu, ki je bil izpostavljen magnetnemu polju (Slika 32 B) in tistemu, ki ni bil v magnetnem polju (Slika 32 A).



Slika 32: Morfologija površine celic T-47D, ki niso bile izpostavljene MND. A, C in E so slike kontrolnih celic, ki niso bile izpostavljene magnetnemu polju; B, D in F so slike celic, ki so bile izpostavljene magnetnemu polju. Merilo: A in B 100 μ m; C in D 10 μ m; E in F 1 μ m.
Manjša gostota celic pri vzorcih, ki so bile izpostavljene tako magnetnim PLGA nanodelcem kot magnetnemu polju (Slika 33 B), je lahko posledica slabše pritrditve celic na podlago kot posledica vpliva prisotnih MND, zato so se celice tekom postopka priprave preparatov za SEM lahko sprale s podlage. Drug razlog je lahko tudi manjša proliferacija celic, kar pa je malo verjetno, saj smo preparate pripravili takoj po izpostavitvi celic magnetnemu polju, tj. celic po odstranitvi magnetnega polja več nismo inkubirali, da bi le-te imele čas za nadaljnjo proliferacijo.

Potrebne bi bile še nadaljnje raziskave s katerimi bi ugotovili, pri kateri koncentraciji magnetnih PLGA nanodelcev in času izpostavitve MND se začnejo pojavljati luknje v apikalni plazmalemi.



Slika 33: Morfologija površine celic T-47D, ki so bile izpostavljene MND. A, C, E in F so slike celic, ki niso bile izpostavljene magnetnemu polju; B in D so slike celic, ki so bile izpostavljene magnetnemu polju. Merilo: A in B 100 μ m; C in D 10 μ m; E in F 1 μ m.

4.2.2 Rezultati preskusa metabolne aktivnosti celic

Za poskuse smo uporabili celične kulture Caco-2 celic in celic T-47D in nanje nanesli vzorce PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v petih različnih koncentracijah ter jih izpostavili magnetnemu polju. Celice, ki so bile metabolno aktivne, so metabolizirale reagent in le-ta je spremenil barvo, kar smo izmerili s pomočjo spektrofotometra. Rezultati (Slika 34) so pokazali, da se z naraščajočo koncentracijo MND zmanjša absorbanca (vse absorbance so izražene relativno na kontrolo brez magneta), kar pomeni, da se zmanjša matabolna aktivnost celic (kar posredno kaže na zmanjšanje preživetja celic). V primerjavi s kontrolo, ki ni bila izpostavljena magnetnemu polju, so celice v magnetnem polju izkazovale nekoliko manjšo relativno metabolno aktivnost. Iz tega lahko sklepamo, da je vpliv PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i na metabolno aktivnost oziroma viabilnost celic večji, kadar jih usmerjamo s pomočjo magnetnega polja kot takrat, ko MND vstopajo v celice preko spontane endocitoze skozi membrano celic.



Slika 34: Primerjava relativnie metabolna aktivnost celičnih kultur po izpostavitvi vzorcem PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v magnetnem polju in brez. MTS test smo izvedli 24 h po izpostavitvi celic magnetnemu polju (n = 2).

Koncentracija vzorca MND vpliva na metabolno aktivnost. Ugotovili smo, da relativna metabolna aktivnost pada z naraščajočo koncentracijo magnetnih PLGA nanodelcev v

vzorcu. Najnižja relativna metabolna aktivnost je (pri obeh celičnih kulturah) pri najvišji koncentraciji vzorcev magnetnih PLGA nanodelcev.

Primerjava relativne metabolne aktivnosti po MTS testu kaže na večje razlike v primeru celic T-47D (med celicami, ki so bile izpostavljene magnetnemu polju in kontroli) kot pri Caco-2 celicah. Pri Caco-2 celicah so razlike med kontrolnimi celicami in celicami, ki so bile izpostavljene magnetnemu polju manjše; iz česar lahko sklepamo, da so Caco-2 celice manj občutljive na magnetne PLGA nanodelce. V obeh primerih izpostavitev celic magnetnemu polju brez prisotnosti MND ne vpliva na viabilnost celic, poleg tega je učinek samega magnetnega dostavnega sistema, v dovolj nizki koncentraciji in brez vpliva zunanjega magnetnega polja, zanemarljiv. Z vidika varnosti je ugodno, da ni znatnega vpliva samega dostavnega sistema na celice, saj to pomeni, da sam dostavni sistem nima stranskih učinkov na netarčna tkiva. Torej če se MND po vnosu v organizem porazdelijo tudi v netarčna tkiva, nanje ne bodo imeli stranskih učinkov, saj je za učinek potrebno zunanje magnetno polje.

Ugotavljali smo tudi vpliv časa inkubacije po izpostavitvi celic vzorcem MND in magnetnemu polju (Sliki 35 in 36) na metabolno aktivnost celic oziroma ali MND, ki so vstopili v celice, morda povzročijo zmanjšano preživetje celic po tem, ko celice več niso izpostavljene magnetnemu polju.



Slika 35: Relativna metabolna aktivnost Caco-2 celic po izpostavitvi vzorcem PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v magnetnem polju in brez. Primerjava metabolne aktivnost po 24 h in 48 h inkubacije po izpostavitvi magnetnemu polju (n = 2).



Slika 36: Relativna metabolna aktivnost celic T-47D po izpostavitvi vzorcem PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v magnetnem polju in brez. Primerjava metabolne aktivnosti po 24 h in 48 h inkubacije po izpostavitvi magnetnemu polju (n = 1).

Opazili smo, da si celice lahko delno opomorejo po izpostavitvi vzorcem z magnetnimi PLGA nanodelci, če jih nato izpostavimo zanje ugodnemu okolju, jih inkubiramo. Celične kulture, ki smo jih po izpostavitvi vzorcem magnetnih PLGA nanodelcev in magnetnemu polju, inkubirali daljši čas (48 h) so izkazovale večjo preživetje kot tiste, ki smo jih inkubirali krajši čas (24 h) (Sliki 35 in 36). Rezultati kažejo, da so T-47D celice dovzetnejše za vpliv magnetnih PLGA nanodelcev na njihovo metabolno aktivnost; iz česar lahko sklepamo tudi na boljše prehajanje dostavnega sistema v T-47D celice.

Sam dostavni sistem izkazuje zelo nizko toksičnost za celice, ki so mu izpostavljene. To je ugodno, saj izdelani MND predstavljajo potencialno učinkovitejši dostavni sistem za zdravljenje hormonsko odvisnega raka dojke. Celice, ki niso bile izpostavljene MND in magnetnemu polju, kažejo višjo stopnjo preživetja, torej je dostavni sistem brez magnetnega polja varen (sama prisotnost dostavnega sistema ob celicah ne izkazuje velikega padca relativne metabolne aktivnosti).

Večja metabolna aktivnost celic je bila opazna tudi pri poskusu, kjer smo celice izpostavili magnetnemu polju, jih nato 24 h inkubirali, jih ponovno izpostavili magnetnemu polju in nato inkubirali še 24 h (Slika 37). Celice si po inkubaciji opomorejo, kar nakazuje na nizko toksičnost takega dostavnega sistema. Vseeno pa je opazna manjša metabolna aktivnost celic, ki so bile izpostavljene vzorcem magnetnih PLGA nanodelcev v primerjavi s kontrolo.



Slika 37: Relativno metabolna aktivnost celic Caco-2 in T-47D po izpostavitvi vzorcem PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v magnetnem polju in brez. MTS test smo izvedli po dvakratni izpostavitvi celic magnetnemu polju (1 h v magnetnem polju, 24 h v inkubatorju, 1 h v magnetnem polju, 24 h v inkubatorju) tj. skupno po 48 h (n=1).

Pri celičnih kulturah, ki niso bile izpostavljene magnetnemu polju, magnetni PLGA nanodelci z vgrajenimi SPION-i vstopijo v celice, vendar je vstop počasnejši. Ker ni pospešenega vnosa dostavnega sistema s pomočjo zunanjega magnetnega polja v celico, si celice tudi lažje in hitreje opomorejo kot po izpostavitvi magnetnemu polju.

V tem poskusu celične kulture, ki smo jih izpostavili magnetnemu polju, izkazujejo nekoliko višjo relativno metabolno aktivnost kot celične kulture, ki niso bile izpostavljene magnetnemu polju. Pri poskusih, kjer smo celice inkubirali samo 24 h, so le-te izkazovale nekoliko nižjo metabolno aktivnost. Pričakovali bi, da se metabolna aktivnost celic, ki so bi le izpostavljene magnetnemu polju tudi v tem poskusu zmanjša. Pri z magnetnim polju pospešenim vnosom magnetnih PLGA ND, je vnos dostavnega sistema pospešen s pomočjo magnetnega polja, kar celico obremeni in zato se metabolna aktivnost zmanjša. To ne pomeni, da pride do popolnega odmrtja celic (nekaj celic verjetno odmre), ampak da celice po izpostaviti magnetnemu polju potrebujejo nekaj časa, da si opomorejo in vzpostavijo spet normalno metabolno aktivnost. To lahko opazimo po 48 h inkubacije celičnih kultur po izpostavitvi magnetnemu polju, saj je metabolna aktivnost takšna ali celo

višja kot pri kontrolnih celicah, ki niso bile izpostavljene magnetnemu polju. Iz tega lahko sklepamo, da pri pospeševanju vstopa dostavnega sistema s pomočjo magnetnega polja obremenimo celice, vendar jih ne poškodujemo v takšni meri, da bi prišlo do celične smrti, saj si celice v času daljne inkubacije opomorejo. Daljši kot bil čas inkubacije po izpostavitvi magnetnemu polju, bolj so si celice opomogle in vzpostavile normalno metabolno aktivnost. Metabolna aktivnost celic in občutljivost le-teh na izpostavitev vzorcem magnetnih PLGA nanodelcev in magnetnemu polju, je odvisna tudi od vrste same celične kulture. Ugotovili smo, da se Caco-2 celice na poskus odzivajo drugače kot T-47D celice.

4.2.3 Rezultati vstopa PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i v celice T-47D

4.2.3.1 Rezultati fluorescentne mikroskopije

Ugotavljali smo ali magnetni PLGA nanodelci prehajajo v celice in ali je kakšna razlika pri internalizaciji v prisotnosti in odsotnosti magnetnega polja. Uporabili smo celično kulturo keratinocitov, ki smo jih inkubirali s PLGA nanodelci z vgrajenimi SPION-i in fluorescentnim barvilom (koncentracija 300 µg/mL) ter jih za 1 h izpostavili magnetnemu polju (Slika 38). Poskus s keratinociti smo uporabili zgolj za hitro kontrolo vstopa izdelanih magnetnih PLGA ND (preverili smo samo, če dostavni sistem vstopi v celice, zato poskusa nismo izvajali na tak način kot s T-47D celicami).



Slika 38: (a) Vstop PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i in 6-kumarinom v keratinocite po 1 h izpostavitni magnetnem polju, (b) keratinociti, ki jih nismo inkubirali z magnetnimi PLGA nanodelci (kontrola).Merilo: 20 µm.

Pri pregledu pod mikroskopom smo ugotovili, da izdelani polimerni MND intenzivno zeleno fluorescirajo in so tudi dobro vidni v keratinocitih (Slika 38). MND opazimo kot zelene pikice, razporejene po celotni celični citoplazmi, kar dokazuje, da so MND res vstopili v celico in se porazdelili po njeni notranjosti.

Internalizacijo magnetnih PLGA nanodelcev smo natančneje preverili tudi na celični kulturi T-47D. Po končanem postopku barvanja smo s pomočjo fluorescentnega mikroskopa opazovali fluorescenco v celicah. Poskus nam je omogočil vpogled v znotrajcelični prostor, saj nam uporaba različnih barvil omogoči razlikovanje celičnih struktur (Slika 39). V primeru preparatov celic, ki smo jih inkubirali s fluorescentno označenimi MND, je prišlo do prekrivanja barv in na slikah nismo videli MND. Videz jeder in aktinskih filamentov pa je bil povsem primerljiv kontrolnim celicam, ki so prikazane na sliki 39.



Slika 39: Celice T-47D z obarvanimi jedri (modro) in aktinom (rdeče). Kontrolne celice, ki niso bile izpostavljene MND in tudi ne magnetnemu polju. Merilo: 20 μm.

Iz zgoraj opisanega razloga smo na celicah spremljali le zeleno fluorescenco MND in nismo barvali drugih celičnih struktur (Slika 40). Celice smo inkubirali z MND s 6kumarinom (koncentracija 300 μ g/mL). Na ta način smo ugotavljali, ali MND prehajajo v celice, kam potujejo znotraj njih in ne nazadnje tudi, če obstaja mesto znotraj celic, kjer se kopičijo v večji količini.



Slika 40: Celice T-47D, ki so bile po nanosu vzorca magnetnih PLGA nanodelcev s 6-kumarinom izpostavljene (A) in niso bile izpostavljene (B) magnetnemu polju za 2 h, brez nadaljnjega inkubiranja. Merilo: 20 μ m.

Iz slike 40 A opazimo, da je intenziteta fluorescence večja pri celicah, ki so bile po nanosu fluorescentno označenih MND izpostavljene magnetnemu polju. Tudi pri celicah, ki niso bile izpostavljene magnetnem polju, so MND prehajali v celice (Slika 40 B), vendar v manjši meri kot pri celicah v magnetnem polju. Razlika v jakosti fluorescence med obema slikama je zelo majhna, kar potrjuje predpostavko, da magnetni PLGA nanodelci vstopajo v celice tudi brez izpostavitve magnetnemu polju, le da vstop ni tako hiter kot pri izpostavitvi magnetnemu polju. Poskus smo izvajali pri sobni temperaturi, zato sklepamo, da je v tem času lahko prišlo le do pasivnega vstopanja MND v celice. Ugotovili smo tudi, da se v T-47D celicah magnetni PLGA nanodelci kopičijo v bližini jedra, kot je nakazal že poskus internalizacije MND na keratinocitih. Naše ugotovitve se skladajo z ugotovitvami drugih raziskovalcev, ki so potrdili privzem takega dostavnega sistema v celice (7).

4.2.3.2 Rezultati presevne elektronske mikroskopije (TEM)

Priprava vzorcev celic za vrednotenje z elektronsko mikroskopijo je potekala drugače kot za ostale poskuse. Celice smo nasadili na posebne inserte, ki smo jih izpostavili vzorcem MND (koncentracija vzorca 300 μ g/mL). Tako koncentracijo vzorca smo izbrali zato, ker je bil pri MTS testu pri tej koncentraciji najbolj opazen padec metabolne aktivnosti.

Celične kulture smo izpostavili magnetnemu polju za 2 h, tj. 1 h dlje kot pri MTS testu. Daljši čas inkubiranja smo izbrali, ker so dimenzije plošče, na katerih smo gojili celice in izvajali poskus, večje kot v primeru plošč za MTS test; zato je razdalja vzorca do magneta večja in jakost magnetnega polja, ki so mu izpostavljene celice, nekoliko manjša. Tako smo zagotovili dovolj časa, da so MND dosegli celice in vanje lahko vstopili. Hkrati smo na tak način zagotovili primerljivost rezultatov z ostalimi poskusi. Poskus smo izvajali tudi pri višji temperaturi, prostor smo ogreli na 30 °C in na tak način omogočili tudi aktivni privzem MND v celice.



Slika 41: Notranja struktura celic T-47D, ki niso bile izpostavljene MND, posneta s TEM. A in B sta sliki celic, ki niso bile izpostavljene magnetnemu polju. Merilo: A 10 μ m; B 2 μ m.

Slike T-47D celic s presevnim mikroskopom, potrjujejo znotrajcelični privzem PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i (Slika 42). Magnetne PLGA nanodelce (temne strukture oziroma črne pike) lahko opazimo na apikalni plazmalemi, prisotni pa so tudi v velikih veziklih, ki niso obdani z membrano, v jedru in ob mitohondrijih. V citoplazmi celice ne opazimo prostih MND. TEM slike celic kontrole (Slika 41), ki niso bile izpostavljene MND in magnetnemu polju, ne kažejo prisotnosti struktur s podobno elektronsko gostoto, zato sklepamo, da so temne strukture na sliki 42 MND.



Slika 42: Celici T-47D, ki so bile izpostavljene MND in magnetnemu polju. Vidni so MND na apikalni membrani in znotraj celic. Merilo: 2 µm.

Pri pregledu preparatov celic T-47D, ki so bile izpostavljene magnetnim PLGA nanodelcem in magnetnemu polju, lahko pri večji povečavi natančno opazujemo področja kopičenja magnetnih PLGA nanodelcev v celicah. Rezultati kažejo, da se MND kopičijo v veziklih, ob mitohondrijih in da prodrejo celo v celično jedro (Slika 43).



Slika 43: Celici T-47D, ki so bile izpostavljene MND in magnetnemu polju. (A) MND v veziklih, ki so obdani z membrano. (B) MND ob mitohondriju. (C) MND v jedru, levo spodaj so tik nad jedrcem. Merilo: (A) 1 μm. (B, C) 500 nm.

TEM slike T-47D celic kažejo, da se MND v celicah ne nahajajo posamezno, ampak so združeni v skupke. Naša opažanja so v skladu s študijami drugih raziskovalcev o privzemu MND v celice, ki navajajo, da MND vstopajo v celice in se znotraj njih kopičijo. Tako kot v našem primeru, so se tudi v drugi študijo MND kopičili v veziklih, jedru in ob mitohondrijih (4, 19). Ugotovili so, da se MND po vstopu v celice, kopičijo v obliki manjših skupkov ob/v organelih. Razlika med našo raziskavo in drugimi izvedenimi študijami je bila v uporabljenih celičnih kulturah; v našem primeru so bile to celice T-47D, drugi raziskovalci pa so večinoma izvajali poskuse na HeLa celicah (celice raka materničnega vratu, ki izhajajo iz vzorca bolnice Henriette Lacks).

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da izpostavitev celic T-47D magnetnemu polju ne vpliva na morfologijo njihove površine in notranjo strukturo. Izpostavitev celic MND pa povzroči spremembe na apikalni plazmalemi, ne glede na prisotnost magnetnega polja. Z uporabo magnetnega polja lahko dosežemo vstop MND v notranjost celic in njihovo znotrajcelično kopičenje.

5 SKLEP

V raziskavi smo z optimizacijo emulzijsko-difuzijske metode uspešno izdelali PLGA nanodelce z vgrajenimi SPION-i z najmanjšo povprečno velikostjo delcev ~ 220 nm. Tudi PLGA nanodelci z vgrajenimi SPION-i in fluorescentnim barvilom, so izkazovali primerljivo velikost kot izdelani polimerni nanodelci brez barvila. Nadalje smo optimizirali postopek čiščenja izdelanih MND v magnetnem polju in z liofilizacijo pripravili dolgotrajno stabilen vzorec MND, ki je po redispergiranju dajal disperzijo MND s primerljivo velikostjo delcev kot pred liofilizacijo.

Rezultati vpliva MND na viabilnost celic, ki smo jih izvajali na celicah Caco-2 in T-47D, so pokazali, da se metabolna aktivnost celic zmanjšuje z naraščanjem koncentracije PLGA nanodelcev z vgrajenimi SPION-i ter da je padec le-te večji, če so bile celice izpostavljene tudi magnetnemu polju. Pri celicah, ki so bile izpostavljene magnetnim PLGA nanodelcem, a ne magnetnemu polju, je tudi opaziti nakazan padec metabolne aktivnosti. Le-to kaže, da magnetni PLGA nanodelci vstopajo v celice tudi s pomočjo spontane endocitoze, kar je za celico manj obremenjujoče kot pri izpostavitvi celic magnetnemu polju. Kadar je bil vstop magnetnih PLGA nanodelcev pospešen z magnetnim poljem, smo hitreje dosegli učinek, a smo tudi bolj obremenili celice (bolj izrazit padec metabolne aktivnosti). Izkazalo se je, da so Caco-2 celice manj občutljive za učinke samega dostavnega sistema kakor T-47D celice, saj je bil padec metabolne aktivnosti pri Caco-2 celicah manjši. Kljub temu pa so si vse celice opomogle, če smo jih po izpostavitvi le magnetnim PLGA nanodelcem ali magnetnim PLGA ND in magnetnemu polju, nadalje inkubirali. Daljši je bil čas inkubiranja, bolj so si celice opomogle. Pri celicah, ki niso bile izpostavljene tudi magnetnemu polju, je bila metabolna aktivnost po inkubaciji večja kot pri celicah, ki so bile izpostavljene magnetnemu polju; saj so magnetni PLGA nanodelci vstopali spontano in ne s »prisilnim« vstopom (manjša obremenitev, hitrejše okrevanje). Sklepamo lahko, da je proučevan magnetni sistem (magnetni PLGA nanodelci) varen, saj ne izkazuje znatne toksičnosti na uporabljenih celičnih kulturah.

Na celičnih linijah smo dokazali vstop MND v celice, tako v prisotnosti kot odsotnosti magnetnega polja. MND niso le vstopili v keratinocite, ampak so se znotraj celic razporedili po celični citoplazmi z izrazitim kopičenjem v okolici celičnega jedra. Tudi pri internalizaciji magnetnih PLGA ND v celice T-47D smo opazili kopičenje ND v okolici jedra in v jedru.

SEM raziskave preparatov celic, ki so bile izpostavljene MND, so pokazale, da ni sprememb v gostoti celic in morfologiji celične površine. Razlika v gostoti se pojavi, ko celice z MND izpostavimo magnetnemu polju. Razlog je verjetno vpliv MND na učinkovitost pritrjanja celic na podlago.

Vstop v celice T-47D smo potrdili tudi s pomočjo elektronske mikroskopije. Dokazali smo vstop MND v celice in da se MND kopičijo v obliki manjših skupkov v veziklih, jedru in ob mitohondriju ter apikalni plazmalemi. Pri celicah, ki smo jih izpostavili magnetnim PLGA nanodelcem in magnetnemu polju ter tistih, ki so bile izpostavljene samo MND, smo opazili luknje v apikalni plazmalemi. Luknje so lahko posledica vstopa magnetnih PLGA nanodelcev v celico, vendar so potrebne še nadaljnje študije, ki bodo pokazale pri kateri koncentraciji in času izpostavitve MND, se luknje začnejo pojavljati.

6 LITERATURA

(1) Bojana Mirković, Tamara Lah Turnšek, Janko Kos: Nanotehnologija pri zdravljenju raka. Zdravstveni vestnik 2010; 79: 146-155

(2) Spletni vir:http://www.nanosvet.com/ (citirano: 3.2.2011)

(3) Christine L. Peterson: Nanotehnology: From Feynmyn to the Grand Challenge of Molecular Manufacturing. IEE Technology and Society Magazine 2004; 23 (4): 9-15

(4) Morteza Mahmoudi, Shilpa Sant, Ben Wang, Sophie Laurent, Tapas Sen: Superparamagnetic iron oxide nanopartcles (SPIOns): development, surface modification and applications in chemotherapy. Adv. Drug Delivery Rev. 2011; doi:10.1016/j.addr.2010-05.006

(5) Kreuter J.Nanoparicles In: Swarbrick J., Boyland JC: Encyclopedia of pharmaceutical tehnology. New York-Basel-Hong-Kong: Marcel Dekker 1994: 165-190

(6) Veronica I. Shubayev, Thomas R. PisanicII, Sungho Jin: Magnetic nanoparticles for theragnostics. Adv. Drug Delivery Rev. 2009; 61: 467-477

(7) Conroy Sun, Jerry S.H. Lee, Miqin Zhang: Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. Adv. Drug Delivery Rev. 2008;60: 1252-1265

(8) Cegnar M., Kos J., Kristl J.: Intracellular delivery of cysteine protease inhibitor cystatin by polymeric nanoparticles. J. Nanosci. Nanotehnol. 2006; 6: 3087-3094

(9) Cegnar M., Kristl J., Kos J.: Nanoscale polymer carriers to deliver chemotherapeutic agents to tumours. Expert Opin. Biol. Ther. 2005; 5: 1557-1569

(10) Kocbek P., Obermajer N., Cegnar M., et al.: Targeting cancer cell using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. J. Controlled Release 2007; 12: 18-26

(11) M. Mahmoudi, A Simchi, A.S. Milani, P.Stroeve: Cell toxicity of superparamagnetic ion oxide nanoparticles. J. Colloid Interface Sci. 2009; 336: 510-518

(12) Spletni vir:

http://www.gimvic.org/projekti/projektno_delo/2010/2a/Magnetne%20tekocine/magnetnet ekocine/ (citirano: 9.3.2011)

(13) Spletni vir:

http://www.gimvic.org/projekti/projektno_delo/2010/2a/Magnetne%20tekocine/paramagne tizem/ (citirano: 9.3.2011)

(14) Omid Veiseh, Jonathan W. Gunn, Miqin Zhang: Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. Adv. Drug Delivery Rev. 2010; 62: 284-304

(15) Ronald A.Wassel, Brian Grady, Richard D. Kopke, Kenneth J. Dormer: Dispersion of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in poly(D,L-lactide.co-glycolide) microparticles. Science Direct, Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects 2007; 292: 125-130

(16) A.M.G.C. Dias, A. Hussain, A.S. Marcos, A.C.A. Roque: A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. Biotechnol. Adv. 2011; 29: 142-155

(17) Stanislav Čampelj, Darko Makovec, Marjan Bele, Miha Drofenik, Janko Jamnik: Sinteza magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih s tanko plastjo silike. Materiali in tehnologije 2007; 41: 103-107

(18) Teskac K., Kristl J.: The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. Int. J. Pharm. 2010; 390: 61-69

(19) Kocbek P., teskac K., Kreft Mateja E. et al.: Toxicological Aspects of Long-Term Treatment of Keratinocytes with ZnO and TiO₂ Nanoparticles. Small 2010; 6: 1908-1917

(20) Daksha Patel, Je Young Moon, Yongmin Chang, Tae Jeong Kim, Gang Ho Lee: Poly (D, L-lactide- co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vivo study as MRI contrast agent. Science Direct, Colloids Surf., A. Physicochem. Eng. Aspects 2008; 313-314: 91-94

(21) Kristl J., Teskac K., Milek M., et al.: Surface active stabilizer Tyloxapol in colloidal dispersions exerts cytostatic effects and apoptotic dismissal of cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2008; 232: 218-225

(22) Asahi Tomitaka, Attsuo Hirukawa, Tsutomu Yamada, Shin Morishita, Yasushi Takemura: Biocampatibility of various ferrit nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxiticy assey using HeLa cells. J. Magn. Magn. Mater. 2009; 321:1482-1484

(23) Spletni vir:

http://www.wellcome.ac.uk/Education-resources/Teaching-and-education/Big-Picture/Allissues/Nanoscience/Articles/WTD015846.htm (citirano: 28.9.2011)

(24) Saša Haberl: Analiza vpliva različnih parametrov na učinkovitost genske elektrotransfekcije v celičnih kulturah in *in vitro* modelu tkiva. Doktorska disertacija, Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2011

(25) A.S Lubbe, C. Bergemann, H. Riesse, F. Schriever, P. Reichardt, K. Possinger, M. Matthias, B. Dorken, F. Herrmann, R. Gurtler, P. Hohenberger, N. Haas, R. Sohr, B. Sander, A.J. Lemke, D. Ohle ndorf, W. Huhnt, D. Huhnt; Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase 1study with 4-epidoxirubicin in 14 patients with advance solid tumors. Cancer Research 1996; 56 (20): 4686-4693

(26) Cegnar M, Kristl j.: Dostavni sistemi nanometrskih velikosti za vnos proteinov in genov. Medicinski razgledi 2005; 44: 447-462

(27) Jain R. A.: The manufacturing techniques of varius drug louded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. Biomaterials 2000; 21: 2475-2490

(28) Cegnar M, Kristl J., Kos J.: Tehnološki pristopi za izdelavo nanodelcev. Nanotehnologija v farmaciji. Zbornik referatov 2004: 47-63

(29) Spletni vir: http://www.mf.uni-mb.si/l1/biofizika/vaja6.pdf (citirano: 14.4.2011)

(30) Rowle A.: PCS in 30 minutes, Information materials of Malvern Instruments Ltd 2003: 1-8

(31)Spletni vir:

http://www.microbiologierapida.ro/s_Memocitometru_de_unica_folosinta-37.html (Citirano: 2.5.2011)

(32) Spletni vir:

http://web.bf.uni-lj.si/bi/mikroskopija/mikroskop-tem.php (citirano:14.4.2011)

(33) Spletni vir:

http://web.bf.uni-lj.si/bi/mikroskopija/mikroskop-sem.php (citirano:14.4.2011)