

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BILJANA TEMOVA

# DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



BILJANA TEMOVA

OPTIMIZACIJA IZDELAVE POLIMERNIH NANODELCEV S  
SUPERPARAMAGNETNIM ŽELEZOVIM OKSIDOM IN *IN VITRO*  
VREDNOTENJE CELIČNEGA ODZIVA

OPTIMISATION OF POLYMERIC SUPERPARAMAGNETIC IRON  
OXIDE NANOPARTICLES PREPARATION AND *IN VITRO*  
EVALUATION OF CELL RESPONSE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm. Izdelavo vzorcev SPION-ov so opravili na Odseku za sintezo materialov Instituta Jožef Stefan. Analiza TEM je bila izvedena na Odseku za sintezo materialov Instituta Jožef Stefan in na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete.

## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Petri Kocbek, za izkazano zaupanje, strokovne nasvete in neprecenljivo vsestransko pomoč pri nastajanju diplomskega dela.

Zahvala gre tudi dr. Slavku Kralju (Odsek za sintezo materialov, Institut Jožef Stefan), za izdelavo vzorcev SPION-ov in njihovo TEM analizo, doc. dr. Mateji Erdani Kreft (Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta) za TEM mikroskopijo celic in asist. dr. Stanetu Pajku (Katedra za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo) za sintezo fluorescenčnega barvila SPP-189. Hvala tudi članoma komisije za pregled diplomske naloge.

Najlepše se zahvaljujem članom moje družine, ki so mi omogočili študij in verjeli vame, posebej mami za vso podporo in vzpobudo. Zahvaljujem se tudi Jaku, ki mi je vedno stal ob strani in pomagal premagovati ovire. Hvala tudi sošolcem in prijateljem za nesebično pomoč in lepe trenutke tekom študija.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm.

Biljana Temova

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Član diplomske komisije: asist. dr. Matevž Prijatelj

## Vsebina

Povzetek .....	iv
Abstract .....	v
Seznam okrajšav.....	vi
1 Uvod.....	1
1.1 Nanotehnologija, nanomedicina in nanodostavni sistemi .....	1
1.2 Nanodelci.....	1
1.3 Prednosti nanodelcev .....	3
1.3.1 Uporaba nanodelcev za ciljno zdravljenje .....	3
1.3.2 Nanoteranostiki.....	5
1.4 Magnetni nanodelci .....	5
1.4.1 Superparamagnetni nanodelci železovega oksida (SPION-i).....	6
1.4.2 Superparamagnetizem.....	7
1.4.3 Oblaganje, funkcionalizacija in vgrajevanje SPION-ov v polimerne ND.....	9
1.4.4 MND v biološkem sistemu .....	11
1.4.4 Uporaba MND .....	15
2 Namen dela.....	16
3 Materiali in metode .....	17
3.1 Materiali .....	17
3.1.1 Materiali za izdelavo pMND .....	17
3.1.2 Materiali za izvajanje <i>in vitro</i> poskusov na celicah.....	19
3.2 Laboratorijska oprema.....	19
3.2.1 Laboratorijska oprema za izdelavo pMND.....	19
3.2.2 Laboratorijska oprema za izvajanje <i>in vitro</i> poskusov na celicah .....	20
3.3 Metode.....	21
3.3.1 Izdelava polimernih MND.....	21
3.3.2 Vrednotenje polimernih MND.....	28
3.3.3 Gojenje celične linije T-47 D .....	29
3.3.4 Vrednotenje polimernih MND na celični liniji.....	32
4 Rezultati in razprava .....	38
4.1 Optimizacija metode izdelave MND .....	38
4.1.1 Izbira fluorescenčnega označevalca in njegove optimalne koncentracije za izdelavo fluorescenčno označenih polimernih ND.....	38
4.1.2 Izdelava MND z emulzijsko-difuzijsko metodo.....	40
4.1.3 Izdelava MND z dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo.....	43
4.1.4 Izdelava MND z emulzijsko metodo z odparevanjem topila.....	45
4.1.5 Čiščenje disperzije pMND v magnetnem polju.....	51
4.1.6 TEM mikroskopija SPION-ov in polimernih MND.....	55
4.1.7 Oblaganje pMND s hitosanom .....	56

4.1.8 Liofilizacija disperzije pMND .....	57
4.2 In vitro vrednotenje celičnega odziva.....	58
4.2.1 Spremljanje vstopa pMND v celice s fluorescenčno mikroskopijo.....	58
4.2.3 Vrednotenje vstopa MND v celice s TEM in vpliv na morfologijo celic.....	63
4.2.4 Vpliv pMND na metabolno aktivnost celic .....	64
5 Sklep.....	66
6 Literatura.....	68

## **Povzetek**

Magnetni nanodelci (MND) so delci nanometerskih velikosti z izraženimi magnetnimi lastnostmi, ki omogočajo usmerjanje in vodenje delcev do tarčnega tkiva s pomočjo zunajnega magnetnega polja. Z uporabo magnetnih nanodelcev lahko dosežemo specifično in bolj učinkovito dostavo zdravilnih učinkovin ter se izognemo neželenim učinkom, ki spremljajo klasičen vnos zdravil, kar je izjemnega pomena pri zdravljenju raka. MND lahko uporabljamo tudi kot nanoteranostike: dostavne sisteme, ki združujejo terapijske in diagnostične lastnosti. V okviru diplomske naloge smo izdelali polimerne MND (pMND), sestavljene iz kopolimera mlečne in glikolne kisline (PLGA) in v njihovo polimerno ogrodje vgradili superparamagnetne ND železovega oksida (SPION-e) ter fluorescenčno barvilo Nile rdeče. Najprej smo izbrali ustrezno metodo za izdelavo pMND in jo optimizirali. Nato smo pMND fizikalno ovrednotili (povprečna velikost, PDI) in ocenili vpliv posameznih parametrov procesa izdelave na povprečno velikost in porazdelitev velikosti delcev. Kot optimalna metoda za izdelavo pMND se je izkazala emulzijska metoda z odparevanjem topila. Pripravili smo pMND z razmerjem PLGA:SPION-i = 1:10, ki so bili pravilnih kroglastih oblik, s povprečno velikostjo  $190,7 \pm 2,0$  in PDI  $0,18 \pm 0,01$ . S takšnim deležem SPION-ov v pMND smo dobili dobro odzivnost pMND na zunanje magnetno polje. pMND so bili fizikalno stabilni in so intenzivno fluorescirali pod fluorescenčnim mikroskopom. V drugem delu diplomske naloge smo pMND *in vitro* vrednotili na celični liniji hormonsko odvisnega raka dojke T-47D. Ugotavljali smo vstop pMND v celice, njihovo znotrajcelično lokalizacijo, morebiten vpliv na morfologijo celic in subceličnih struktur ter vpliv pMND na metabolno aktivnost celic. Potrdili smo, da pMND vstopajo v celice T-47D, ob vstopu pa ne povzročijo opaznih morfoloških sprememb. Sam dostavni sistem je varen, vpliv pMND na metabolno aktivnost celic je majhen in reverzibilen. Z izpostavitvijo celic pMND in magnetnemu polju celice obremenimo, vendar si le-te v določenem časovnem obdobju opomorejo. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da so izdelani pMND obetaven dostavni sistem za nadaljnje raziskave in razvoj nanodostavnega sistema za ciljan vnos učinkovin pod vplivom zunanjega magnetnega polja.

**Ključne besede:** polimerni magnetni nanodelci, PLGA, SPION-i, emulzijska metoda, biološko vrednotenje.

## **Abstract**

Magnetic nanoparticles are nanosized particles with magnetic properties, which allow them to be directed to a target site under the influence of an external magnetic field. With application of magnetic nanoparticles improved specificity of drug delivery and better effectiveness of therapy can be achieved as well as side effects, which are common for classical drug delivery, can be omitted. The mentioned features of magnetic nanoparticles are of special interest for the cancer therapy. Magnetic nanoparticles can be also used as nanotheranostics—the combination of therapeutic and diagnosis agent in a single delivery system. In our research polymeric magnetic nanoparticles (pMNPs) were prepared using poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) and superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and fluorescent dye Nile red, which were entrapped in polymeric matrix. Firstly, suitable method for preparation of magnetic nanoparticles was chosen and optimized. Magnetic nanoparticles were physically characterized (average particle size, polydispersity index) and the influence of various process parameters on mean particle diameter and polydispersity of the sample was evaluated. Emulsion solvent evaporation method was demonstrated to be optimal for preparation of pMNPs. pMNPs with composition PLGA:SPIONs = 1:10 were prepared. The particles exerted regular spherical shape, mean diameter of  $190,7 \pm 2,0$  and PDI  $0,18 \pm 0,01$ . The concentration of SPIONs in such pMNPs was sufficient to give a good responsiveness of pMNPs towards an external magnetic field. Formulated pMNDs were physically stable and exhibited intensive fluorescence under a fluorescence microscope. In the second part of our research MNPs were in vitro evaluation on a hormone dependent breast cancer cell line T-47D. The cellular uptake of pMNPs in T-47D cells, their intracellular localisation, influence of pMNPs on cellular and subcellular morphology and the effect on cell metabolic activity were investigated. We have confirmed that pMNPs enter the T-47D cells and do not cause any observable morphological changes. The delivery system seems to be safe, since its effect on cell metabolic activity is small and reversible. The cells are affected by exposure to pMNPs, but they can recover in a certain period of time. Based on the obtained results it can be concluded, that formulated pMNPs show promising properties for further investigation and development of nanodelivery system for magnetic drug targeting.

**Key words:** polymeric magnetic nanoparticles, PLGA, SPIONs, emulsion method, biological evaluation.

## Seznam okrajšav

CHCl <sub>3</sub>	kloroform
d	povprečni premer delcev
DMSO	dimetilsulfoksid
DMEM	po Dulbeccu spremenjen Eaglov medij (angl. »Dulbecco's modified Eagle medium«)
EtOAc	etilacetat
EPR učinek	učinek povečane prepustnosti in zadrževanja (angl. »Enhanced Permeability and Retention«)
FBS	goveji fetalni serum (angl. »Fetal Bovine Serum«)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
IJS	Institut Jožef Stefan
LAF komora	komora z laminarnim pretokom filtriranega zraka (angl. »Laminar Air Flow«)
MND	magnetni nanodelci
MRI	magnetno resonančno slikanje (angl. »Magnetic Resonance Imaging«)
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
ND	nanodelci
PAS	površinsko aktivna snov
PBS	fosfatni pufer (angl. »Phosphate Buffered Saline«)
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija (angl. »Photon Correlation Spectroscopy«)
PDI	polidisperzni indeks
PEG	polietilenglikol
PLGA	kopolimer mlečne in glikolne kisline
pMND	polimerni magnetni nanodelci
PVA	polivinilalkohol
RES	retikuloendotelijski sistem
ROS	reaktivne kisikove spojine
SPION	superparamagnetni nanodelec železovega oksida (angl. »Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle«)
TEM	presevni elektronski mikroskop (angl. »Transmission Electron Microscope«)
UT	rotor-stator homogenizator Ultra Turrax
UZ	ultrazvok
ZP	zeta potencial
ZU	zdravilna učinkovina



## 1 Uvod

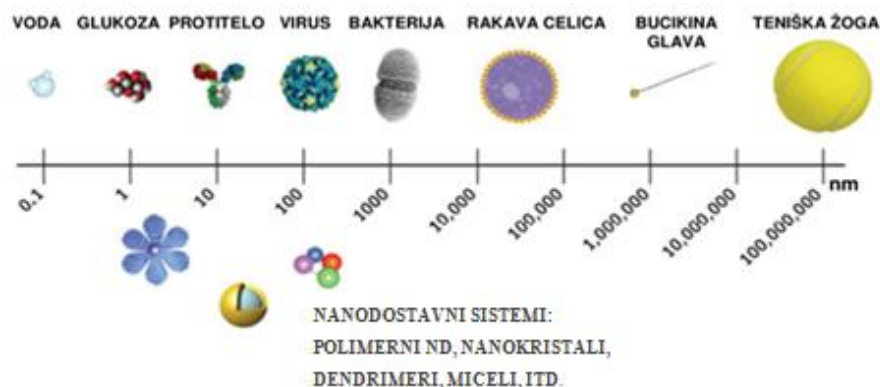
Že dobra štiri desetletja potekajo raziskave v smeri odkrivanja, načrtovanja in razvoja nanodostavnih sistemov. Vendar doseganje želene velikosti sistema in vgrajevanje različnih učinkovin, s ciljem povečevati uspešnost zdravljenja in odpraviti morebitne stranske učinke, predstavlja še dandanes velik izziv na področju farmacije (1,2).

### 1.1 Nanotehnologija, nanomedicina in nanodostavni sistemi

Izraz nanotehnologija označuje tehnologijo, ki se ukvarja z razumevanjem, spreminjanjem in obvladovanjem materialov na atomskem in molekularnem nivoju (3). Nanomedicina pa pomeni uporabo nanotehnoloških pristopov za preprečevanje, spremljanje, diagnosticiranje in zdravljenje bolezni (4). Nanodostavni sistemi so obetavna perspektiva v medicini, saj lahko z njimi dosežemo specifičen terapevtski učinek in večjo učinkovitost zdravljenja ter zmanjšamo pojav stranskih učinkov v primerjavi s klasičnimi zdravili (2,4). Primerni so za uporabo tako v diagnostične kot tudi terapevtske namene. V Evropski uniji in/ali Združenih državah Amerike je registriranih že več kot trideset nanozdravil (5). Največ nanotehnoloških novosti je na področju diagnosticiranja in zdravljenja rakavih bolezni, saj je pogostost teh obolenj vse večja; hkrati pa so zelo resni tudi neželeni učinki citostatikov (2,6). Tako so bila med prvimi registrirana nanotehnološka zdravila s protitumorskimi učinkovinami (5,6).

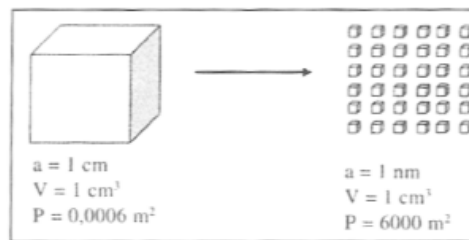
### 1.2 Nanodelci

Po definiciji so nanodelci (ND) trdni koloidni delci z velikostjo od 1 do 100 nanometrov, v širšem pomenu pa med ND prištevamo tudi delce velikosti do 1 mikrometra (1). ND predstavljajo glede na velikost vmesno območje med mikrodelci na eni strani in atomi oziroma molekulami na drugi strani (4,7) (slika 1).



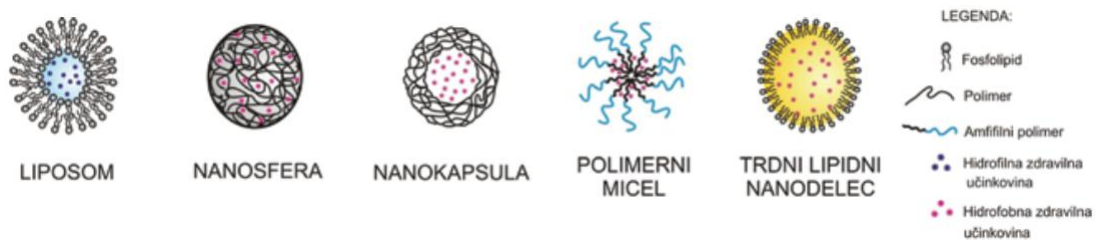
Slika 1: Umestitev nanosistemov na velikostni lestvici (7).

Za razliko od večjih delcev istega kemizma izkazujejo ND drugačne fizikalno-kemijske in farmakokinetične lastnosti, npr. visoko reaktivnost in površinsko energijo, spremenjene električne, optične in magnetne lastnosti ter drugačno obnašanje in porazdeljevanje v organizmu. Razlog za spremenjene lastnosti je večje razmerje med površino in volumnom pri ND v primerjavi z večjimi delci (slika 2). Večje kot je razmerje med površino in volumnom, večji je delež atomov na površini delca, kar se kaže v povečani kemijski reaktivnosti (8). Rezultat so specifične lastnosti nanosistema, ki so ugodne za določene farmacevtske namene. Po drugi strani povečana kemijska reaktivnosti vodi v združevanje delcev, tj. agregacijo in aglomeracijo, ali pa prekomerno biološko reaktivnost (7). Sistem je fizikalno nestabilen, saj se z zmanjševanjem velikosti delcev povečuje Gibbsova prosta energija (7).



Slika 2: Shema povečanja površine z zmanjševanjem velikosti delcev (8).

Glede na kemijsko sestavo delimo ND na anorganske (npr. ND železa, zlata,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ...) in organske (npr. polimerni ND, trdni lipidni ND). ND kot dostavni sistemi se med seboj razlikujejo po zgradbi, lastnostih in namenu uporabe (7,9) (slika 3). Običajno so sestavljeni iz najmanj dveh komponent od katerih je ena učinkovina, ki določa namen uporabe in funkcijo nanosistema (4). V ožjem pomenu izraz ND pomeni trdne delce nanometrskih velikosti, ki so zgrajeni iz nosilnega ogrodja in učinkovine, ki je vključena v ogrodje ali vezana na površino. Glede na notranjo zgradbo delimo ND na nanosfere in nanokapsule. Nanosfera je delec v katerem je učinkovina razporejena po celotnem ogrodju. Nanokapsula pa je zgrajena iz polimerne ovojnice in jedra. Učinkovina se lahko nahaja v jedru ali pa je vključena v ali adsorbirana na ovojnico (7,10) (slika 3).



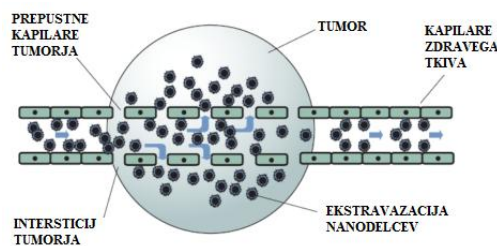
Slika 3: Vrste nanodostavnih sistemov (9).

### 1.3 Prednosti nanodelcev

ND odpirajo nove terapevtske možnosti za učinkovine, ki imajo majhno biološko uporabnost. Z vključevanjem učinkovine v nosilno ogrodje ND učinkovino zaščitimo pred neželenimi vplivi okolja (pH, encimi), izboljšamo njeno stabilnost in/ali dosežemo sproščanje učinkovine na želenem mestu. Prav tako lahko upočasnimo njeno izločanje skozi ledvice, saj so ND bistveno večji v primerjavi s prosto učinkovino. Rezultat je podaljšan razpolovni čas učinkovine. Poleg tega ND lažje prehajajo skozi biološke membrane kot večji delci in vstopajo v znotrajcelični prostor, hkrati pa je manjša verjetnost pojava odpornosti organizma na zdravilno učinkovino (ZU), če jo v telo vnesemo vgrajeno v ND. Zaradi teh lastnosti lahko z vgrajevanjem ZU v ND dosežemo večji terapevtski odziv v primerjavi s klasičnimi farmacevtskimi oblikami že pri nižjih odmerkih ZU (4–6).

#### 1.3.1 Uporaba nanodelcev za ciljano zdravljenje

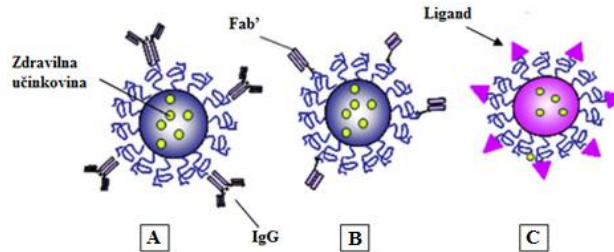
Glavni prednosti uporabe ND sta kontrolirano sproščanje ZU in selektivno ciljanje celic/tkiv, ki ga lahko dosežemo na različne načine.



Slika 4: Shema učinka povečane prepustnosti in zadrževanja (EPR učinek) (7).

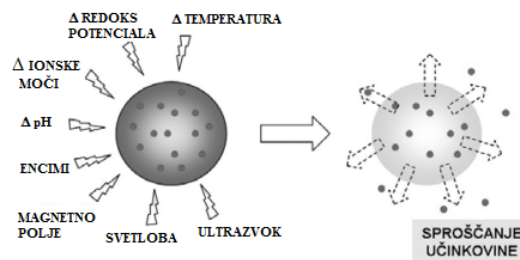
Pasivno ciljanje temelji na ustreznem načrtovanju lastnosti ND, tako da nanodostavni sistem izkorišča fiziološke/patofiziološke pogoje na tarčnem mestu. Pasivno ciljanje je posledica povečane prepustnosti in zadrževanja v tarčnem tkivu, tj. tako imenovani EPR učinek (angl. »*enhanced permeability and retention effect*«). EPR učinek je zlasti značilen za trdne tumorje. Ko le-ti dosežejo velikost 2-3 mm<sup>2</sup>, nastopi angiogeneza. Angiogeneza je pri tumorjih ključna, saj omogoči ustrezno prehranjenost in nadaljnjo rast tumorja. Pride do hitrega nastanka novega žilja, ki se po zgradbi in prepustnosti močno razlikuje od normalnega žilja (slika 4). Širina vrzeli med celicami endotelija je od 380 do 780 nm, zato pravimo, da je tak endotelij fenestriran (11,12). Skozi takšen endotelij lahko prehajajo ND iz krvnega obtoka v tkivo, medtem ko pri normalni strukturi žilnega endotelija ND ostanejo v obtoku. Širina vrzeli med celicami endotelija v zdravem tkivu je manj kot 6 nm

z izjemo ledvic, jeter in vranice, v katerih je širina vrzeli 50 -150 nm (11). Prisotnost fenestracij v žilni steni prispeva k prvemu delu EPR efekta tj. povečani prepustnosti. Povečano zadrževanje ND v tumorjih pa je rezultat okrnjene limfne drenaže v tumorskem tkivu. Za tumorje je značilno neučinkovito odtekanje limfe ali pa je limfno žilje v tumorju celo odsotno, s čimer se učinek nalaganja ND na obolelem mestu še ojača (2,6,11,13).



Slika 5: Nanodostavni sistemi za aktivno ciljanje, ki imajo na svoji površini vezana protitelesa (A), fragmente protiteles (B) ali druge specifične ligande (C) (13).

Koncept aktivnega ciljanja temelji na pripenjanju specifičnih ligandov kot so proteini, protitelesa, nukleinske kisline, sladkorji in peptidi na površino ND (slika 5). Tak nanodostavni sistem je sposoben prepoznati tarčno mesto in se nanj vezati. Tarčna mesta so običajno antigeni, ki so specifično izraženi na tarčnih celicah ali pa je njihov obseg izražanja na tarčnih celicah večji kot na zdravih celicah. Po vezavi sledi sproščanje ZU v znotrajceličnem ali zunajceličnem prostoru, odvisno od prisotnosti ali odsotnosti endocitoze (2,13–16).

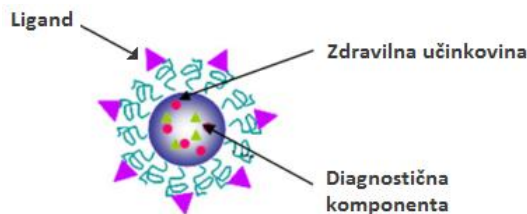


Slika 6: Prikaz sproščanja učinkovine pod vplivom različnih dražljajev (2).

Korak naprej od same ciljane dostave so pametni nanodostavni sistemi, ki kontrolirano sproščajo učinkovine pod vplivom endogenih dejavnikov ali zunanjih dražljajev na tarčnem mestu. Sprememba pH, temperature, prisotnost encimov kot endogenih dejavnikov ali vpliv magnetnega polja, svetlobe ali ultrazvoka kot eksogenih dejavnikov lahko sproži sproščanje učinkovine na želenem mestu v organizmu (slika 6). Magnetne ND lahko uporabimo za pripravo pametnih nanodostavnih sistemov, saj jih lahko s pomočjo magnetnega polja usmerjamo do tarčnega mesta in/ali sprožimo sproščanje ZU pod vplivom zunanjega magnetnega polja (2,14,17).

### 1.3.2 Nanoteranostiki

Teranostik je sistem, ki združuje terapevtsko in diagnostično komponento (13,18) (slika 7). Nanoteranostiki so teranostiki nanometrskih velikosti. Z njimi lahko dosežemo ciljno dostavo ZU le na tarčno mesto, hkrati pa lahko neinvazivno spremljamo lokalizacijo nanodostavnega sistema v organizmu (2). Prednosti takšnih sistemov so neinvazivna zaznava bolezenskih stanj in možnost individualnega oz. prilagojenega zdravljenja (18). Vsak nanoteranostik vključuje terapevtsko in diagnostično komponento. Terapevtska komponenta je ZU, ki je kovalentno ali nekovalentno vezana na ali vgrajena v dostavni sistem. Na površini nanoteranostika je lahko vezan tudi specifični ligand, ki omogoča aktivno ciljanje v organizmu. Namen diagnostične komponente pa je vizualizacija samega sistema. Ponavadi so diagnostična sredstva kovinski ali magnetni nanodelci, fluorescenčne spojine ali radioizotopi. Detektiramo jih lahko z optičnim slikanjem, slikanjem z magnetno resonanco (MRI), računalniško tomografijo (CT), pozitronsko emisijsko tomografijo (PET), ali enofotonsko emisijsko računalniško tomografijo (SPECT) (2,13,18,19).

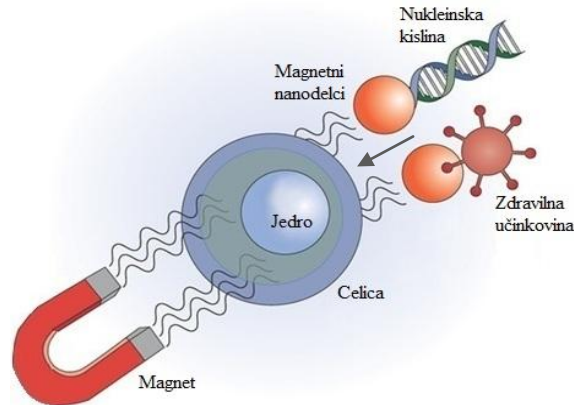


Slika 7: Zgradba teranostika (13).

Idealen nanoteranostik omogoča, da nanosistem doseže tarčno mesto v telesu, kjer se ZU sprosti; bodisi spontano ali pod vplivom različnih dražljajev. Hkrati omogoča časovno spremljanje sistema v organizmu vse od vstopa v organizem, porazdeljevanja in nalaganja na tarčnem mestu. Ideja za razvoj takšnega sistema se je pojavila na področju zdravljenja raka, kjer je izjemnega pomena spremljanje porazdeljevanja, selektivnosti in učinkovitosti ZU. Z uporabo nanoteranostikov lahko zaznamo tumor že v zgodnji fazi, kar pomembno vpliva na potek in izid zdravljenja bolezni (18).

### 1.4 Magnetni nanodelci

Magnetni nanodelci (MND) so delci nanometerskih velikosti z izraženimi magnetnimi lastnostmi, ki omogočajo usmerjanje in vodenje delcev pod vplivom zunanega magnetnega polja in so zato zanimivi za uporabo v biomedicini (slika 8). Predstavljajo lahko komponento pametnih nanodostavnih sistemov za ciljan vnos ZU v organizem.



Slika 8: Shema vodenja MND z vezanimi ligandi (nukleinske kisline, ZU) v zunanem magnetnem polju (20).

Za vodenje MND v organizmu se ponavadi uporabljajo permanentni magneti kot je Nd-Fe-B (21,22). Ker jakost magnetnega polja hitro pada z oddaljenostjo od magnetna, je pomembno, da je tarčno mesto čim bližje površini telesa, kar predstavlja omejitev uporabe MND. Obstaja pa tudi možnost implantacije magnetna v neposredno bližino tarčnega (obolelega) mesta v organizmu. To so izvedli v *in vivo* poskusih na hrčkih, pri katerih so magnet implantirali v osteosarkom. Takšno zdravljenje se je v primerjavi s klasičnim vnosom zdravila pokazalo kot bolj učinkovito in z manj stranskimi učinki (21,23).

#### 1.4.1 Superparamagnetni nanodelci železovega oksida (SPION-i)

Jedro MND, ki daje delcem magnetne lastnosti, tvorijo največkrat SPION-i (angl. »*superparamagnetic iron oxide nanoparticles*«). SPION-i so ND železovega oksida (magnetit -  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , maghemit -  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ali hematit -  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) z velikostjo do 15 nm. Poznamo tudi ND drugih kovinskih oksidov ali zlitin (kobalt, platina, cink), a so ND železovih oksidov za enkrat edini odobreni za klinično uporabo (24). ND železovih oksidov v organizmu, v primerjavi z ND drugih kovinskih oksidov, niso toksični, saj se razgradijo na železove ione in kisikove spojine (21,25). Železovi ioni se v organizmu skladiščijo in se uporabijo za sintezo hemoglobina (26).

Za izdelavo SPION-ov se uporablja veliko različnih metod, ki so prikazane na sliki 9. Vsaka metoda ima svoje prednosti in slabosti. Kot vhodna snov se vedno uporablja železova sol; običajno železov klorid. Najpogosteje uporabljeni sta metoda koprecipitacije in metoda termične razgradnje. Izdelava SPION-ov z obarjanjem je proces pri katerem z dodatkom reagenta dosežemo obarjanje delcev železovega oksida iz raztopine železove soli. Najprej pride do nukleacije, ki je hitra, in nato do počasne rasti nastalih jeder. Pri metodi koprecipitacije gre za tvorbo jeder SPION-ov iz raztopine  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  soli z

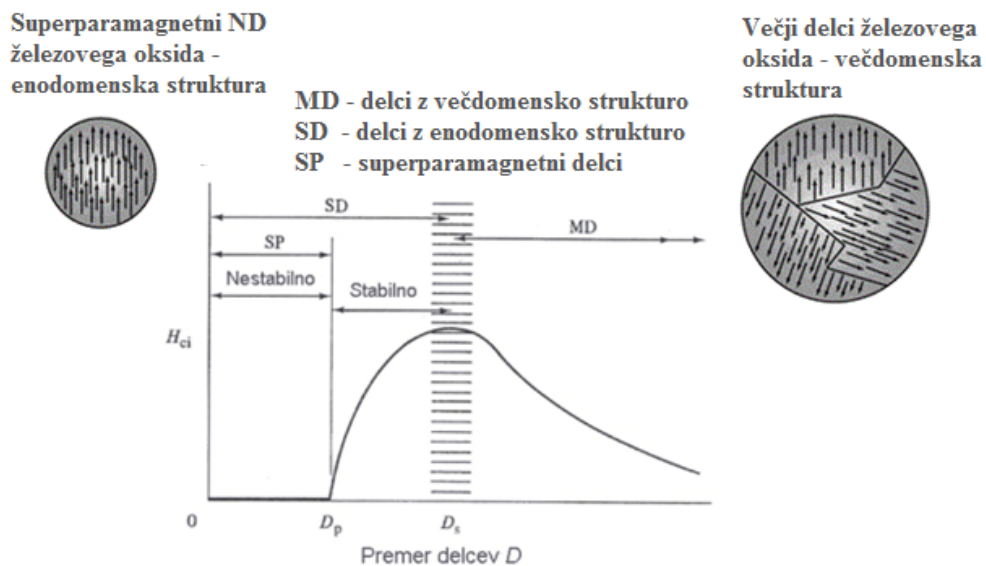
dodatkom baze v inertni atmosferi. Nastanek delcev pri termični razgradnji uravnavamo s temperaturo reakcije ali z vrsto organokovinskih prekurzorjev. Oba postopka omogočata uporabo hidrofobne oleinske ali ricinolejske kisline v procesu izdelave SPION-ov, s čimer dosežemo nastanek hidrofobnega plašča na površini SPION-ov (25–28).

Fizikalne metode	•depozicija plinaste faze, litografija z elektronskim žarkom, pulzna laserska ablacija, z laserjem povzročena piroliza, mletje praškastih delcev
Kemijske metode	•koprecipitacija, mikroemulziska metoda, hidrotermična sinteza, elektrokemijska razgradnja, sonokemijska sinteza, termična razgradnja
Biološke metode	•sinteza s pomočjo gliv, bakterij ali encimov

Slika 9: Metode izdelave SPION-ov (21).

### 1.4.2 Superparamagnetizem

Zaradi svoje sestave in zgradbe izkazujejo SPION-i superparamagnetne lastnosti. To je fenomen, ki se pojavlja pri zelo majhnih feromagnetnih enodomenskih delcih z enoosno simetrijo magnetokristalinične anizotropije. Superparamagnetizem opisuje stanje, ko je termična energija dovolj velika za premagovanje bariere preobrata (rotacije) magnetnega dipola teh delcev (28,29).



Slika 10: Odvisnost koercitivnosti od velikosti delca ter shema enodomenske in večdomenske zgradbe magnetnega delca (28,30).

Področje v snovi, kjer ima spontana magnetizacija enako smer imenujemo magnetna domena. Veliki delci imajo večdomensko zgradbo, medtem ko imajo delci, ki so sestavljeni iz manjšega števila atomov, enodomensko zgradbo (28,30). Pri teh delcih se magnetizacija obrne s hkratno rotacijo vseh spinov v delcu, za kar potrebujemo relativno visoko jakost magnetnega polja. Energetska bariera, ki jo moramo preseči, da obrnemo magnetizacijo takšnega delca, znaša  $KV$ , kjer je  $K$  efektivna konstanta anizotropije in  $V$  volumen delca. Pri neki kritični velikosti ( $D_p$  na sliki 10), bo termična energija večja od energetske bariere, kar bo povzročilo hitro rotacijo magnetizacije delcev med dvema ravnotežnima legama glede na čas opazovanja (28,31).

Z Neelovim modelom lahko izrazimo kritičen volumen delcev pri katerih še opazimo superparamagnetizem. Enačba 1 nam pove, da postanejo delci superparamagnetni takrat, ko znaša energija anizotropije  $25kT$ , kjer je  $k$  Boltzmannova konstanta (28).

$$V_p = \frac{25kT}{K}$$

*Enačba 1*

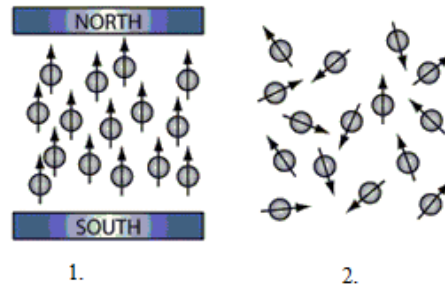
Za delce določene velikosti pa lahko iz enačbe izrazimo temperaturo prehoda v superparamagnetno stanje. To temperaturo imenujemo temperatura zaviranja ( $T_B$ ) (28).

$$T_B = \frac{KV}{25k}$$

*Enačba 2*

Pri temperaturi večji od  $T_B$  so delci v superparamagnetem stanju (32). Takrat so magnetni momenti v relaksiranem stanju in se obnašajo kot paramagneti, kar pomeni, da so pod vplivom zunanjega magnetnega polja ti delci namagneteni. Pri tem je gostota magnetnega polja v delcih veliko večja kot gostota magnetnega polja izven njih (28). Po odstranitvi magnetnega polja pa ne ostanejo namagneteni, ker je termična energija dovolj velika, da povzroči rotacijo magnetnega dipola in s tem izgubo magnetizma. Delci se naključno gibljejo, kar je rezultat Brownovega gibanja, zato običajno ne agregirajo (30) (slika 11). Drugačna situacija je pri temperaturi, ki je nižja od  $T_B$ . Takrat so delci v blokiranem stanju in se obnašajo kot feromagneti (32). Magnetni dipoli ostanejo urejeni tudi izven magnetnega polja (22). Takrat lahko delci interagirajo med seboj in se povezujejo v agregate (28).





Slika 11: Prikaz obnašanja SPION-ov v prisotnosti magnetnega polja (1) in odsotnosti magnetnega polja (2) pri temperaturi večji od temperature zaviranja ( $T_B$ ) (30).

Da imajo delci železovega oksida superparamagnetne lastnosti, mora biti velikost delcev (SPION-ov) pod kritično velikostjo 15 nm (33). Pri telesni temperaturi ( $T_B$  za delce  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  je 50 K (34)) je dovolj termične energije za spontano demagnetizacijo predhodno namagnetjenih delcev, kar pomeni, da ob odstranitvi zunanjega magnetnega polja magnetizem delcev izzveni. To omogoča klinično uporaba SPION-ov, saj lahko pod vplivom zunanjega magnetnega polja dosežemo ciljano dostavo, po odstranitvi magnetnega polja pa delci ostanejo stabilni in ne agregirajo v organizmu (26).

#### 1.4.3 Oblaganje, funkcionalizacija in vgrajevanje SPION-ov v polimerne ND

Za površino SPION-ov lahko rečemo da je inertna, saj na njej ni prisotnih nobenih funkcionalnih skupin (28). Same SPION-e lahko zato uporabimo le za magnetno hipertermijo ali kot kontrastno sredstvo za magnetno resonančno slikanje. Za vse ostale namene uporabe SPION-ov v biomedicini moramo njihovo površino ustrezno spremeniti ali jih vgraditi v ustrezen dostavni sistem.

Običajno površinske lastnosti SPION-ov spremenimo z oblaganjem. S tem se spremeni tudi njihovo obnašanje v organizmu. Poleg tega z ustreznim oblaganjem dosežemo tudi homogeno dispergirano SPION-ov v disperznem mediju. Magnetna tekočina (angl. »ferrofluid«) je homogena suspenzija SPION-ov, ki je stabilna in primerna za uporabo *in vivo* (28). Oblaganje lahko izvedemo med samo sintezo SPION-ov ali po njihovi izdelavi (21). Oblaganje na že pripravljena jedra poteka z adsorpcijo obloge ali kovalentno vezavo (25,35). Snovi, ki jih lahko uporabimo za oblaganje delimo na:

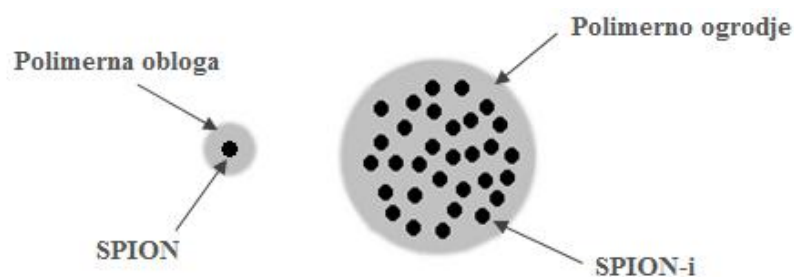
- anorganske (npr. zlato, silicijev dioksid) in
- organske (npr. maščobne kisline (oleinska, ricinolejska kislina), površinsko aktivne snovi (natrijev oleat, dodecilamin, PVA ...), polimeri (dekstran, polietilenglikol, PLGA, hitosan ...) (19,22)

Zlato in silicijev dioksid se velikokrat uporabljata za uvedbo funkcionalnih skupin na površino delcev. Prisotnost silanolnih -OH skupin na tankem sloju silike omogoča pripenjanje različnih molekul na površino ND. Obloga anorganskih snovi na površini SPION-ov ima tudi zaščitno vlogo, saj ščiti delec pred oksidacijo (21).

Oblaganje z oleinsko in ricinolejsko kislino največkrat poteka »in situ« med samo sintezo SPION-ov. Z oleinsko ali ricinolejsko kislino dosežemo hidrofbnost površine SPION-ov in omogočimo pripravo magnetnih tekočin v nepolarnih medijih. Obloga iz oleinske ali ricinolejske kisline preprečuje aglomeracije SPION-ov in hkrati izboljša vgradnjo SPION-ov v določene dostavne sisteme (28).

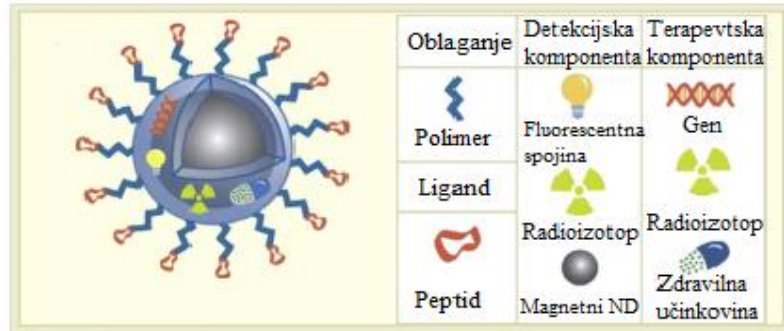
Pri oblaganju s polimeri se uporabljajo naravni ali sintezni polimeri, ki so biorazgradljivi in biokompatibilni (21). S polimerno oblogo se lahko velikost delcev bistveno poveča. Spremenjene so tudi lastnosti samega sistema v odvisnosti od lastnosti polimera. Z oblaganjem s hidrofilnimi polimeri, kot je polietilenglikol, dosežemo podaljšan čas zadrževanja v krvnem obtoku oziroma manjšo opsonizacijo v krvnem obtoku (21,25). Oblaganje s hitosanom pa poveča verjetnost njihovega vstopa v celice zaradi elektrostatskih interakcij med ND in membrano celic (36).

Polimere lahko uporabimo tudi kot ogrodje dostavnega sistema, v katerega vgradimo SPION-e (slika 12). V tem primeru govorimo o polimernih magnetnih ND (pMND). Magnetne lastnosti takšnih delcev so posledica prisotnosti posameznih SPION-ov v ogrodju polimernega nanodelca (21). Med pripravo pMND SPION-e dispergiramo v raztopini polimera (27).



Slika 12: Prikaz zgradbe enojedrnega MND, ki je obložen s slojem polimera( levo), in zgradbe magnetnega polimernega ND (desno).

Priprava pMND poteka v prisotnosti stabilizatorja, ki se veže na površino pMND in tako fizikalno stabilizira pMND ter in zmanjša obseg agregacije in/ali aglomeracije delcev. ND lahko stabiliziramo sterično z vezavo makromolekul, ki sterično preprečujejo stik med delci, ali elektrostatsko z vezavo nabitih molekul na površino delcev (7,28).



Slika 13: Shema zgradbe multifunkcionalnih MND (25).

Z načrtovanim spreminjanjem površine SPION-ov ali pMND dosežemo želene lastnosti in uvedemo funkcionalne skupine za nadaljnjo vezavo učinkovin, ligandov, spojin, ki omogočajo detekcijo sistema, itd. (25) (slika 13). Ligandi so lahko nizkomolekularne spojine ali biomakromolekule, ki prepoznajo in se vežejo na tarčno mesto in s tem omogočijo aktivno ciljanje. V primeru zdravljenja je potrebno, da nanodostavni sistemi z vgrajenimi SPION-i omogočajo vezavo ZU na njihovo površino ali vključitev v njihovo notranjo strukturo. Z vezavo različnih diagnostičnih komponent v ND z vgrajenimi SPION-i omogočamo neinvazivno spremljanje porazdeljevanja MND v organizmu s kombinacijo različnih detekcijskih metod (MRI, PET, optične metode itn.) (2,26,37). Tako ligandi, kot tudi ZU in diagnostične komponente so lahko na površino MND vezani kovalentno ali nekovalentno ali vključeni v ogrodje pMND. Izbira pristopa vezave narekuje na eni strani kemizem funkcionalnih skupin obloge MND, na drugi strani pa komponenta, ki jo želimo vezati (25,35). Cilj je uspešna vezava liganda brez izgube njegove funkcionalnosti (27).

#### 1.4.4 MND v biološkem sistemu

Pot MND v biološkem sistemu se običajno začne z intravenskim vnosom; v obliki infuzije ali intravenske injekcije, v določenih primerih pa tudi v obliki intraarterijske injekcije čim bliže tarčnemu mestu (21). Zaradi parenteralnega načina vnosa v organizem morajo biti MND sterilni, neimunogeni in netoksični. Po vnosu v krvni obtok lahko nastopi aglomeracija MND, kljub temu da so bili MND v formulaciji stabilizirani. Razlog so sestavine krvi, ki se adsorbirajo na površino delcev in nevtralizirajo naboj na njihovi površini (26). Združevanje delcev moramo pri *in vivo* uporabi preprečiti, saj lahko povzroči zamašitev žil. Poleg tega lahko izrazita aglomeracija ND vodi do sprememb magnetnih lastnosti - prehod iz superparamagnetizma v feromagnetizem (28). Zato je

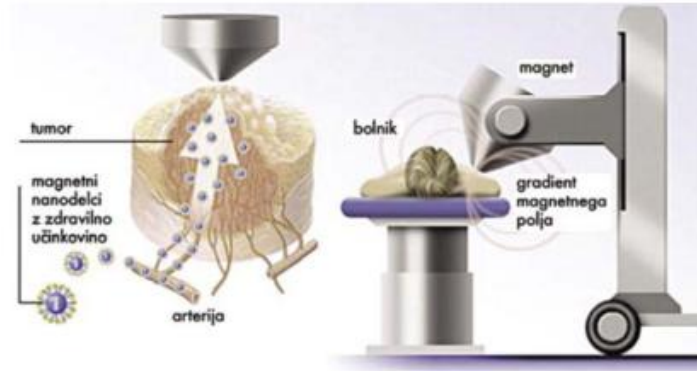
pomembno, da MND dodatno stabiliziramo s stabilizatorji, ki zmanjša obseg agregiranja in/ali aglomeriranja delcev (26).

Na porazdeljevanje MND v organizmu vpliva tudi opsonizacija. Vezava opsoninov tj. proteinov plazme na površino tujega delca je obrambni mehanizem, ki ščiti organizem pred vdorom tujkov (26). Med opsonine štejemo imunoglobulina G in M, komponente sistema komplementa C3, C4, C5 in druge proteine kot so C-reaktivni protein, laminin, fibronektin in kolagen tipa I. Opsonizacija je signal za aktivacijo celic retikuloendotelnega sistema. Te celice odstranijo označen tj. opsoniziran delec iz krvnega obtoka bodisi s fagocitozo, bodisi z aktivacijo naravnih celic ubijalk (38,39). MND so kot tujki v organizmu podvrženi opsonizaciji, ki je prvi korak metabolizma MND. S hidrofilnim oblaganjem površine MND (npr. s PEG-iliranjem ali vezavo drugih hidrofilnih polimerov) bistveno zmanjšamo obseg opsonizacije (9,40). S tem povečamo razpolovni čas nanodostavnega sistema in omogočimo, da MND ostanejo v krvnem obtoku dovolj dolgo, da dosežejo tarčno mesto in se tam zadržijo dovolj dolgo, da sprožijo želeni učinek (2,9,19).

ND lahko iz krvnega obtoka vstopijo v različne organe, kjer je prepustnost žilja povečana; a bolj verjetno je, da bodo končali v tkivih, ki so bolj prekrvavljena (11). Na doseganje tarčnega mesta vpliva tudi velikost delcev, ki je velikokrat ključna za porazdeljevanje ND v biološkem sistemu. Zelo majhni ND, 1-20 nm, imajo dolg čas zadrževanja v obtoku in počasi prehajajo iz žilja v intersticij (7). Hkrati pa se lahko takšni delci izločajo skozi ledvice (41). Tako so za lokalno injiciranje primernejši nekoliko večji MND, npr: 30-100 nm (7). Večje delce, z velikostjo 200-300 nm, privzamejo po vstopu v krvni obtok celice mononuklearno-fagocitnega sistema, ki so prisotne v jetrih, vranici in v manjši meri v kostnem mozgu (26,41). Da ne pride do prehitrega odstranjevanja MND v vranici, je pomembno, da je naboj MND nevtralen (26). Ugotovili so, da je idealna velikost MND za prehajanje in nalaganje v tumorje med 70 nm in 200 nm (38).

Na ciljano dostavo MND do tarčnega mesta vplivajo tudi lastnosti zunanega magnetnega polja (21). Za učinkovito magnetno ciljanje je primerno magnetno polje z veliko jakostjo, visoko amplitudo in čim manj fluktuacijami (25). Vir magnetnega polja mora biti čim bližje tarčnemu mestu; idealno bi bilo na razdalji 0,5 cm (21) (slika 14). Iz naštetih razlogov je uporaba MND primerna za zdravljenje obolenih mest, ki se nahajajo blizu telesne površine, npr. rak dojke. Dostava MND z magnetnim poljem je odvisna tudi od

magnetnih lastnosti samih delcev (delež SPION-ov v MND) (21). Večja vsebnost SPION-ov v sistemu pomeni večjo odzivnost v magnetnem polju. Vseeno pa vsebnost SPION-ov v MND ne sme biti prevelika, saj lahko vpliva na vgrajevanje ZU v dostavni sistem. Dokazali so, da je 8 % (m/m) magnetita v ND iz kopolimera mlečne in glikolne kisline (PLGA) dovolj za usmerjeno vodenje delcev v morskem prašičku (42).



Slika 14: Prikaz uporabe zunanjega magnetnega polja za ciljno dostavo MND v tumorsko tkivo (28).

Preden MND vstopijo v celico, pridejo v stik z njeno membrano. Celična membrana je selektivno prepustna in igra pomembno vlogo pri internalizaciji MND. Obstajajo različni načini interakcij MND z biološkimi membranami. MND manjši od 50 nm ali MND obloženi z lipofilnimi oblogami prehajajo preko celične membrane z difuzijo (26). Večji delci vstopajo v celice z endocitozo. Pri endocitozi celična membrana ovije ND in ga internalizira. Med endocitotne mehanizme štejemo pinocitozo, fagocitozo in z receptorji posredovano endocitozo. S fagocitozo vstopajo v celice delci velikosti do 10  $\mu\text{m}$ . Značilna je za fagocitne celice kot so makrofagi, nevtrofilci in dendritične celice. V manjšem obsegu lahko fagocitirajo tudi druge vrste celic kot so fibroblasti, epitelne in endotelne celice (9). Pinocitoza se lahko odvija v vseh vrstah celic in predstavlja privzem tekočin in v njih raztopljenih topljencev. Vezava liganda na površino MND pa omogoča vstop MND v znotrajcelični prostor s pomočjo z receptorji posredovane endocitoze (s klatrini posredovana endocitoza, s kaveolini posredovana endocitoza). Ob vezavi liganda na ustrezen receptor se sproži signal in vrsta kemičnih reakcij, ki imajo za posledico internalizacijo liganda in neposredno s tem še ND. Našteti mehanizmi *in vivo* običajno potekajo hkrati, po fagocitotni in nefagocitotni poti. Mehanizem privzema je delno odvisen tudi od naboja na površini ND. Kationski sistemi se bolje vežejo na negativno plazmalemo v primerjavi z nevtralnimi ali anionskimi sistemi. Vendar so kationski sistemi neprimerni za uporabo *in vivo* zaradi izrazitih interakcij s serumskimi proteini (9,11,43).

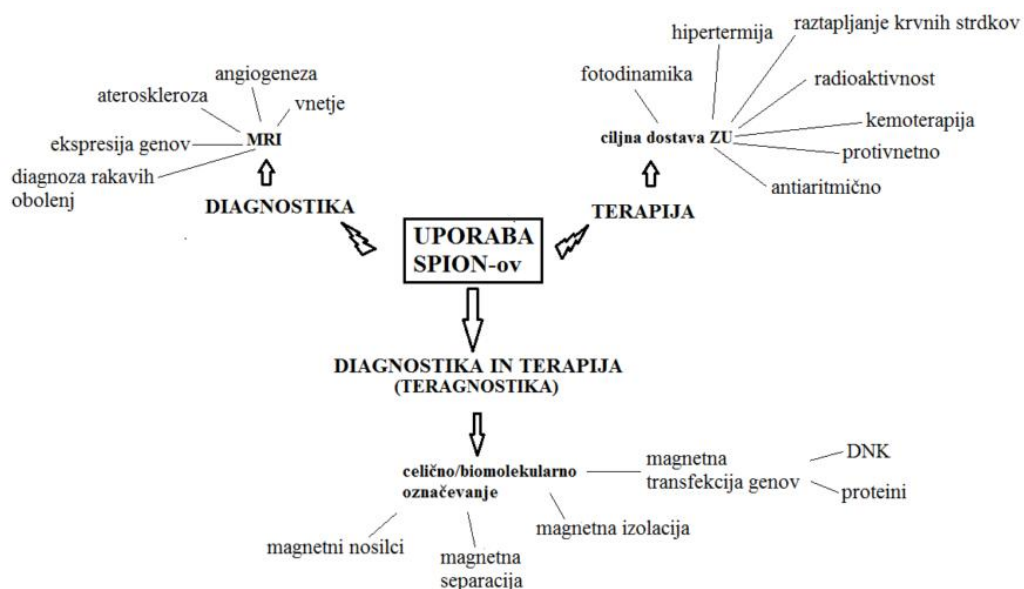
V primeru zdravljenja je ključno, da MND sprožijo učinek v tarčnih celicah. MND kot dostavni sistemi morajo predvsem omogočati vezavo oz. vgradnjo ZU in njen prenos do/v tarčne celice. ZU, ki so vezane na površini MND, se zelo hitro sprostijo po vnosu v organizmu. Zato takšne delce obložimo z oblogo iz različnih polimerov ali kopolimerov, ki zmanjšajo začetno sproščanje (21). Ko MND dosežejo tarčno tkivo, lahko pride do vstopa MND v celice in do znotrajceličnega sproščanja vgrajene učinkovine. Lahko pa ostanejo vezani na tarčno celico in sprostijo učinkovino v zunajcelični prostor (2,14,17). Ob vstopu MND v obolele celice lahko dosežemo tudi ciljanje na subceličnem nivoju npr. v jedro, mitohondrije ali citosol. V tem primeru načrtujemo strukturo MND glede na lastnosti znotrajceličnih struktur. Uporabimo lahko npr. pH odzivne polimere, ki so občutljivi na spremembo pH mikrokolja (npr. kisel pH v lizosomih). Če uporabimo za izdelavo ND kopolimer mlečne in glikolne kisline, se le-ta razgradi s kislom hidrolizo pri čemer interagira z endosomsko membrano in jo destabilizira ter omogoči sproščanje ZU v citosol (9,43). Endosomskemu okolju se lahko izognemo z vgrajevanjem kationskega polimera v ND. Učinek osmotske spužve, ki nastane zaradi osmotskega nabrekanja, povzroči destabilizacijo endosoma in sproščanje ND v citosol (17,26).

Po opravljeni nalogi v organizmu se morajo MND razgraditi ali odstraniti iz telesa. Če uporabljamo biorazgradljive polimere, se ogrodje MND v organizmu razgradi, razgradni produkti pa izločijo iz organizma. SPION-i se v telesu razgradijo na železove ione in kisikove spojine. Pri tem ne nastanejo reaktivne kisikove spojine (ROS) in poškodbe DNK (21). Kljub temu so tudi za SPION-e, podobno kot za vse ostale ND, potrebne dodatne raziskave na področju varnosti. Čeprav ni dokazanih toksičnih učinkov teh snovi, lahko v telesu nastopi neravnovesje železovih ionov (44). Nekateri MND vsebujejo SPION-e obložene s siliko. Silicijev dioksid je biokompatibilen, ampak ni biorazgradljiv (21). V tem primeru se SPION-i ne razgradijo, ampak se izločijo preko ledvic, če so dovolj majhni (45–47).

Za učinkovito zdravljenje in zmanjševanje pojavov stranskih učinkov moramo pri načrtovanju in sintezi MND upoštevati vse parametre in bariere, ki se pojavijo na poti MND od vstopa do izstopa iz organizma. Pri tem pa se moramo zavedati, da imamo opravka s kompleksnimi potmi, ki se lahko razlikujejo med posamezniki (13).

#### 1.4.4 Uporaba MND

Dandanes potekajo intenzivne raziskave na področju uporabe MND za ciljno dostavo kemoterapevtikov, radioizotopov, peptidov in genskega materiala. MND so orodje v diagnostiki ali terapiji, pogosto pa predstavljajo komponento nanoteranostikov. Širok spekter možnosti uporabe MND je prikazan na sliki 15 in zajema MRI slikanje, dostavo ZU pri rakavih obolenjih, dostavo protivnetnih ZU, uporabo MND v fotodinamični terapiji, itd. (19,21). Drug pristop je uporaba samih MND v magnetni hipertermiji. Hipertermija je ena izmed možnih oblik zdravljenja raka. Če MND na tarčnem mestu v organizmu izpostavimo zunanjemu izmeničnemu magnetnemu polju, pride do sproščanja toplote in segrevanja okoliškega tkiva. Rezultat je lokalno segrevanje tumorja do temperature, ki povzroči odmrtnje tkiva na tarčnem mestu (vsaj 30 min pri temperaturi nad 43 °C) (19,48). Večina formulacij MND z ZU se je v fazi preizkušanja na laboratorijskih živalih pokazala kot netoksična in učinkovita za vstop do tarčnega mesta. MND v kombinaciji z ZU doksorubicinom so že uspešno prestali fazo I kliničnih študij, ki so jo izvedli na 14 bolnikih z rakom. Magnetni nanodostavni sistem so vnesli v organizem v obliki intravenske infuzije. Magnet so namestili na razdalji 0,5 cm od tumorja, magnetno polje pa je delovalo 45 min od časa same aplikacije. Rezultati so pokazali, da bolniki dobro prenašajo takšno zdravljenje, MND pa so pri polovici bolnikov uspešno dosegli tarčno mesto. Formulacija je bila varna, vendar so potrebne še nadaljnje izboljšave za učinkovitejše zdravljenje (21). Tako potekajo na področju MND danes intenzivne raziskave, perspektivnost MND pa je prepričala in pritegnila marsikaterega raziskovalca.



Slika 15: Shema področij uporabe MND (27).

## 2 Namen dela

Namen našega raziskovalnega dela je izdelati polimerne magnetne nanodelce (pMND) kot dostavni sistem za ciljano zdravljenje npr. raka dojk. Polimerne MND bomo izdelali iz kopolimera mlečne in glikolne kisline (PLGA) in v polimerno ogrodje vgradili superparamagnetne ND železovega oksida (SPION-e).

V prvem delu našega raziskovalnega dela bomo izbrali ustrezno metodo za izdelavo pMND in jo optimizirali. Polimerne MND bomo poskusili izdelati z emulzijsko-difuzijsko metodo, z dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo in z emulzijsko metodo z odparevanjem topila. V pMND bomo poskusili vgraditi SPION-e obložene z ricinolejsko kislino, SPION-e obložene s citronsko kislino in SPION-e obložene s silicijevim dioksidom. Spreminjali bomo razmerje med polimerom in SPION-i v delcih, razmerje faz in stabilizator pri izdelavi MND. Naš cilj bo izdelati pMND manjše od 250 nm z dovolj velikim deležem vgrajenih SPION-ov, da bodo delci odzivni na vpliv zunanega magnetnega polja, in z vgrajenim ustreznim fluorescenčnim barvilom, da jih bomo lahko vrednotili v disperziji in celični kulturi z metodo fluorescenčne mikroskopije. Izdelane pMND bomo fizikalno ovrednotili (povprečna velikost, PDI) in ocenili vpliv posameznih parametrov procesa izdelave na povprečno velikost in porazdelitev velikosti delcev. MND, ki jih bomo izdelali po optimizirani metodi, bomo očistili (odstranili bomo odvečen stabilizator) in jih skoncentrirali s pomočjo zunanega magnetnega polja. MND bomo v drugem delu diplomske naloge *in vitro* vrednotili na celični liniji hormonsko odvisnega raka dojke T-47D. Ugotavljali bomo vstop MND v celice, njihovo znotrajcelično lokalizacijo, morebiten vpliv na morfologijo celic in subceličnih kultur ter vpliv MND na metabolno aktivnost celic. Poskuse bomo izvajali v odsotnosti in prisotnosti zunanega magnetnega polja, saj pričakujemo, da bo zunanje magnetno polje pospešilo in povečalo obseg vstopa MND v celice.



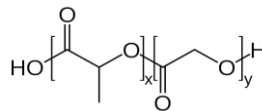
### 3 Materiali in metode

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Materiali za izdelavo pMND

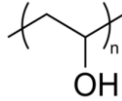
- Kopolimer mlečne in glikolne kisline (PLGA), Resomer<sup>®</sup> RG 503 H in Resomer<sup>®</sup> RG 502 S, Boehringer Ingelheim, Nemčija

PLGA je kopolimer mlečne in glikolne kisline (slika 16). Je biorazgradljiv in biokompatibilen polimer in je eden izmed polimerov, ki se najširše uporabljajo za izdelavo polimernih ND. Njegova uporaba v farmaciji je odobrena s strani Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA). Pri razgradnji poteče hidrolizira do mlečne in glikolne kisline, ki vstopata v Krebsov cikel in se končno metabolizirata do ogljikovega dioksida in vode. Na tržišču najdemo PLGA z različnimi razmerji glikolne in mlečne kisline ter različnimi molekulskimi masami. Prisotne končne karboksilne skupine so lahko proste ali zaestrene. Vse to vpliva na lastnosti polimera in posledično na hitrost njegove razgradnje ter hitrost sproščanja vgrajene učinkovine (13,37).



Slika 16: Kemijska formula kopolimera mlečne in glikolne kisline (PLGA); x predstavlja število monomerov mlečne kisline in y predstavlja število monomerov glikolne kisline.

- Disperzija superparamagnetnih nanodelcev železovega oksida (SPION-ov), ki so jo pripravili na Institutu Jožef Stefan, Odsek za sintezo materialov, Ljubljana, Slovenija. V polimerne ND smo poskusili vgraditi naslednje vzorce SPION-ov s koncentracijo od 40 mg/mL do 130 mg/mL:
  - disperzija SPION-ov, ki so bili prekriti s slojem ricinolejske kisline, v etilacetatu
  - disperzija SPION-ov, ki so bili prekriti s slojem ricinolejske kisline, v kloroformu
  - vodna disperzija SPION-ov, ki so bili prekriti s slojem citronske kisline
  - vodna disperzija SPION-ov prekritih s slojem silike
- Polivinilalkohol (PVA), MOWIOL<sup>®</sup> 4-98, Kuraraz specialties Europe GmbH, Nemčija  
PVA (slika 17) je sintezni polimer, ki ga pripravimo s popolno ali delno hidrolizo polivinilacetata. Je bel ali krem obarvan vodotopen prašek, brez vonja in okusa. Hitrost raztapljanja je večja pri povišani temperaturi (49,50).

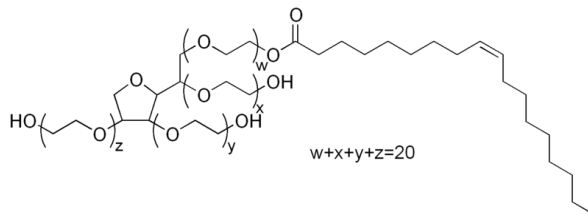


Slika 17: Kemijska formula polivinilalkohola.

V predhodno stehani stekleni čaši smo segreli na  $\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\sim 47,5\text{ mL}$  bidestilirane vode in nato med intenzivnim mešanjem z magnetnim mešalom v segreto vodo dodali 2,5 g PVA ter nadaljevali z intenzivnim mešanjem pri povišani temperaturi dokler se ves PVA ni raztopil ( $\sim 2\text{ h}$ ). Dobljeno raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in nadomestili izparelo vodo do celokupne mase raztopine 50 g. Tako smo pripravili 5 % (m/m) raztopino PVA.

- Polisorbate 80 (Tween<sup>®</sup> 80), Fluka analytical, Anglija

Polisorbat 80 (slika 18) je hidrofilen neionogen emulgator. Je hidrofilna rumena, viskozna, higroskopska tekočina, topna v vodi (51).



Slika 18: Kemijska formula polisorbata 80.

K 2,5 g polisorbata 80 smo dodali 47,5 g bidestilirane vode in mešali na magnetnem mešalu, da se je polisorbat 80 raztopil. Tako smo pripravili 5 % (m/m) raztopino polisorbata 80.

- Hitosan, nizkomolekularni, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija

Hitosan je kopolimer glukozamina in N-acetilglukozamina, ki sta med seboj povezana z  $\beta(1-4)$  vezjo. Je netoksičen, biorazgradljiv in biokompatibilen kationski polisaharid (52,53).

- Barvilo Nile rdeče (Nile red), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Barvilo SPP-189, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko kemijo, Ljubljana, Slovenija
- Bidestilirana voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija
- Etilacetat, Merck, Nemčija
- Kloroform, Merck, Nemčija
- Ocetna kislina, Merck, Nemčija

### 3.1.2 Materiali za izvajanje *in vitro* poskusov na celicah

- Celična kultura T-47D, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Velika Britanija
- 70 % (V/V) etanol, pripravljen z razredčevanjem 96% (V/V) etanola, Kefo, Slovenija
- Fosfatni pufer s pH 7,4 (PBS), pripravljen z raztapljanjem 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O in 0,24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v 800 ml destilirane vode, uravnanjem pH s HCl in dopolnitvijo do 1 L z destilirano vodo.
- Po Dulbeccu spremenjen Eaglov medij (DMEM medij), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Fetalni goveji serum (FBS), Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, ZDA
- 2 mM L-glutamin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- 100 U/mL raztopina antibiotika (penicilin in streptomycin) in antimikotik, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- 0,25 % tripsin x EDTA, Promega Corporation, Medison, WI, ZDA
- HEPES, 1 M, Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, ZDA
- 4 % formalin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- ProLong<sup>®</sup> Antifade Kit, Molecular Probest<sup>TM</sup> – Invitrogen, ZDA
- Barvilo za aktin, Phalloidin-Fluorescein Isothiocyanate, Sigma, P5282, 100μg
- Barvilo za jedra, Hoechst (bisbenzimid H33342), Honezwell Riedel de Haen
- Fiksativ za pripravo TEM preparatov, Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija
- MTS reagent, CellTiter<sup>®</sup> 96 Aqueous One Solution, Medison, WI, ZDA
- Medij za zamrznitev celic Cell Freezing Medium – DMSO Sterile, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija

### 3.2 Laboratorijska oprema

#### 3.2.1 Laboratorijska oprema za izdelavo pMND

- 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 centrifugirke z navojem in pokrovčkom, TPP<sup>®</sup> Techno Plastic Products, Transadingen, Švica

- Mikropravete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Vortex EV-202, Tehnica Železniki, Slovenija
- Homogenizator Ultra-Turrax, IKA, Nemčija
- Ultrazvočna sonda Ultrasonic processor, Illinois, ZDA
- Ultrazvočna kadička, Iskra Sonis 4, Iskra, Slovenija
- Magnetno mešalo IKA RCT basic, IKA® Werke GmbH&Co. KG, Nemčija
- Stresalnik, Vibromix 313 EVT, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Liofilizator Christ Bata 1-8K, Martin Christ, Nemčija
- Zetasizer Nano ZS, Malvern instruments, Malvern, Velika Britanija
- Polistirenska kiveta, Sarstedt Nümbrecht, Nemčija
- Celica za merjenje zetapotenciala, DTS1060, Malvern, Velika Britanija

### **3.2.2 Laboratorijska oprema za izvajanje *in vitro* poskusov na celicah**

- Avtoklav, Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- 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
- Mikrotitrne plošče s 96-imi vdlobinami, TPP® Techno Plastic Products, Transadingen, Švica
- Polistirenske ploščice za gojenje celicnih kultur s 6, 12, 24 vdlobinami, TPP® Techno Plastic Products, Transadingen, Švica
- Petrijevke, TPP® Techno Plastic Products, Transadingen, Švica
- Gojitvene platenke, TPP® Techno Plastic Products, Transadingen, Švica
- CO<sub>2</sub> inkubator, SORVALL® Heraeus, KendroLaboratory products
- Centrifuga CENTRIC 322A, Slovenija
- Krovna stekelca Assistent, Glaswarenfabrik Karen Hecht KG, Sondheim, Nemčija
- Stekelce hemocitometra, BRAND, Nemčija
- Invertni svetlobni mikroskop Olympus CKX41, Japonska
- Fluorescenčni mikroskop Olympus IX81, Tokio, Japan
- Mikrotitrski čitalec, Safire<sup>2</sup>™ Tecan, Švica

### 3.3 Metode

#### 3.3.1 Izdelava polimernih MND

Polimerne MND smo izdelali z metodo obarjanja polimera iz emulzijskega sistema tipa O/V. Polimer in ostale lipofilne sestavine (barvilo) smo raztopili v organskem topilu. Tako pripravljeno raztopino smo emulgirali v vodno raztopino stabilizatorja. Nastala je emulzija tipa O/V. Emulzijo smo nato homogenizirali z rotor-stator homogenizatorjem in/ali s soniciranjem z ultrazvočno sondo (slika 19), da smo dobili čim manjšo velikost dispergiranih kapljic. Sledilo je obarjanje polimera in tako nastanek polimernih ND. Obarjanje polimera smo dosegli bodisi z odparevanjem organskega topila ali pa z difuzijo organskega topila v vodno fazo. Izdelane vzorce smo shranjevali v ustrezno označenih plastičnih centrifugirkah, zaščitene pred svetlobo in v hladilniku pri temperaturi 4 °C.



Slika 19: Ultrazvočna sonda (levo) in rotor-stator homogenizator (desno).

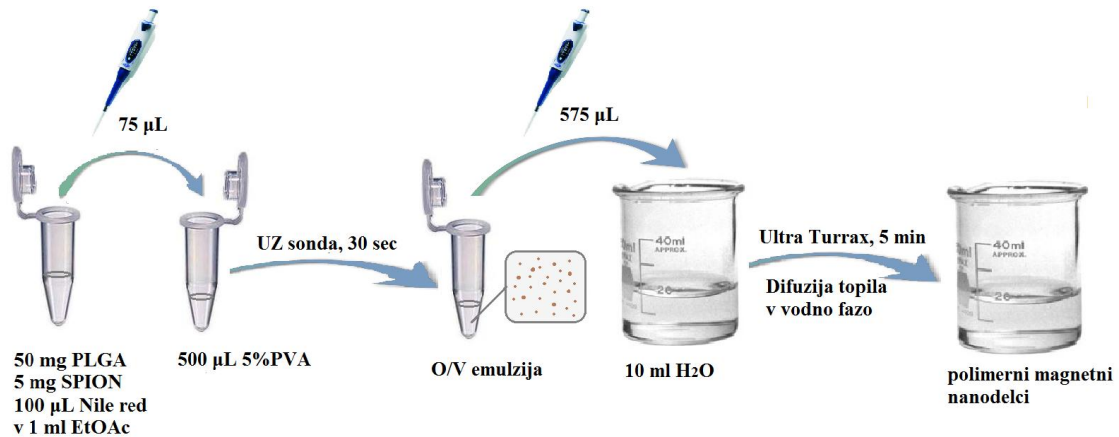
Za razbitje kapljic do nanometremskih velikosti je potreben velik vnos energije. Dosežemo ga s homogeniziranjem z rotor-stator homogenizatorjem ali s soniciranjem z ultrazvočno sondo.

Ultrazvočna sonda deluje na principu visokofrekvenčnega zvoka, ki vnaša v vzorec energijo, zato nastajajo parni mehurčki, ki implodirajo s silo, ki je dovolj velika, da večje delce ali kapljice razbije v nanodelce oz. nanokapljice. Pojav se imenuje kavitacija (54).

Za drug način homogeniziranja smo uporabili rotor-stator homogenizator, ki deluje tako, da vzorec zaradi vrtenja rotorja posepa v glavo za dispergiranje. Centrifugalna sila poganja emulzijo skozi režo med rotorjem in statorjem, zato tok emulzije zato močno udari v steno statorja, kar povzroči razbitje večjih kapljic v manjše. Do razbitja kapljic pride tudi zaradi velikih strižnih sil v reži med rotorjem in statorjem (7,55).

### 3.3.1.1 Izdelava polimernih MND z emulzijsko-difuzijsko metodo

Pri tej metodi uporabimo organsko topilo, ki se delno meša z vodo (npr. etilacetat). V zadnji stopnji izdelave emulzijo tipa O/V razredčimo z večjim volumnom vodne faze, ki je netopilo za polimer. S tem povzročimo difuzijo etilacetata iz emulzijskih kapljic v vodno fazo in obarjanje polimera. Če so parametri med obarjanjem ustrezni, se polimer obori v obliki nanodelcev.



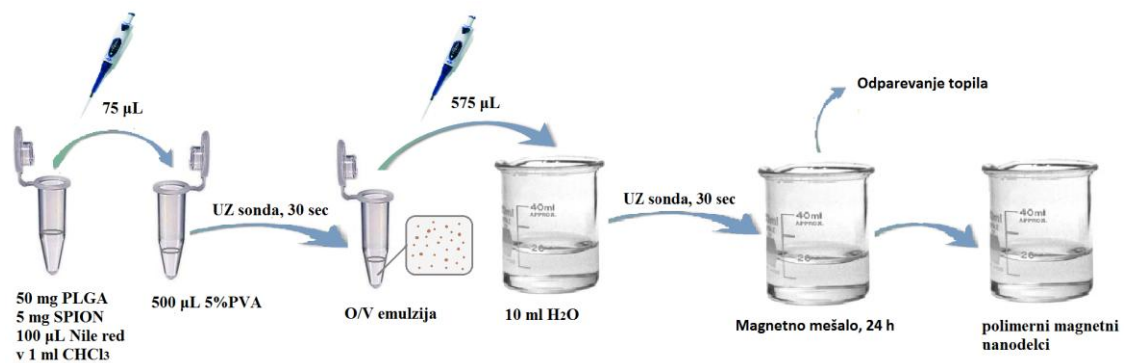
Slika 20: Shema postopka priprave pMND z emulzijsko-difuzijsko metodo.

#### Postopek

V epico smo natančno natehtali 50 mg PLGA in dodali ustrezen volumen disperzije SPION-ov v etilacetatu tako, da je bilo masno razmerje PLGA: SPION-i 10:1, 2:1 ali 1:1. Dodali smo 100 µL raztopine fluorescenčnega barvila Nile rdeče s koncentracijo 33 µg/mL (masna koncentracija barvila glede na polimer je bila 0,066 µg/mg). Vsebino smo dopolnili z etilacetatom do skupnega volumna 1000 µL (slika 20). Dobljeno disperzijo smo vorteksirali, da se je polimer popolnoma raztopil in da so se SPION-i homogeno dispergirali. V drugo epico smo odpipetirali 500 µL 5 % (m/m) raztopine PVA in dodali 75 µL vsebine prve epice (lipofilna faza). Nastal je dvofazni sistem, ki smo ga homogenizirali s soniciranjem z ultrazvočno sondo. Soniciranje je potekalo 30 s pri frekvenci nad 20 kHz in 30 % amplitudi. Vrat sonde je bil ves čas potopljen v tekočino. Epico smo občasno premikali gor-dol s čimer smo dosegli enakomeren vpliv sonde na celoten volumen vzorca. Po končanem soniciranju smo med mešanjem z rotor-stator homogenizatorjem vsebino epice takoj odpipetirali v čašo z 10 mL bidestilirane vode. Vsebino smo pipetirali tik ob režo delujočega homogenizatorja. Homogeniziranje je potekalo 5 min pri hitrosti 7.200 obratov/min.

### 3.3.1.2 Izdelava polimernih MND z emulzijsko metodo z odparevanjem topila

Pri tej metodi uporabimo organsko topilo, ki je hlapno in se ne meša z vodo (npr. diklorometan, kloroform), zato organsko topilo odstranimo iz emulzijskega sistema tako, da ga odparimo. Pri tem pride do obarjanja polimera, ki v zunanji vodni fazi ni topen. Če so parametri med obarjanjem ustrezni, se polimer obori v obliki nanodelcev. Organsko topilo lahko odparimo pri povišani temperaturi, pri znižanem tlaku z rotovaporjem ali pa ga odstranimo z dolgotrajnim mešanjem na magnetnem mešalu pri normalnem zračnem tlaku in sobni temperaturi.



Slika 21: Shema postopka priprave pMND z emulzijsko metodo z odparevanjem topila.

#### Postopek

Priprava vzorca je podobna kot pri predhodno opisani emulzijsko-difuzijski metodi, a z dvema ključnima razlikama (slika 21). Tukaj smo za pripravo osnovne disperzije SPION-ov v raztopini PLGA kot topilo uporabili kloroform. Obe fazi smo združili in nastali dvofazni sistem sonificirali z ultrazvočno sondo 30-60 s in nato tako dobljeno primarno emulzijo odpipetirali v 10 mL bidestilirane vode in ponovno sonificirali 30-60 s. Kloroform smo iz sistema odstranili tako, da smo pustili čašo z vsebino mešati na magnetnem mešalu ali na stresalniku 24 h v digestoriju.

Z emulzijsko metodo z odparevanjem topila smo izdelali različne vzorce tako, da smo spreminjali naslednje parametre:

1. Vrsto polimera
  - PLGA s prostimi končnimi karboksilnimi skupinami (Resomer RG 503H)
  - PLGA z zaestrenimi končnimi karboksilnimi skupinami (Resomer RG 502S)
2. Fluorescenčno barvilo
  - Nile rdeče z masno koncentracijo 0,066 µg/mg glede na polimer,
  - SPP-189 z masno koncentracijo 0,067 µg/mg glede na polimer.

3. Razmerje med PLGA in SPION-i

- 50 mg PLGA: 50 mg SPION-i
- 40 mg PLGA: 10 mg SPION-i
- 35 mg PLGA: 15 mg SPION-i
- 30 mg PLGA: 20 mg SPION-i
- 25 mg PLGA: 25 mg SPION-i
- 50 mg PLGA: 50 mg SPION-i
- 80 mg PLGA: 20 mg SPION-i

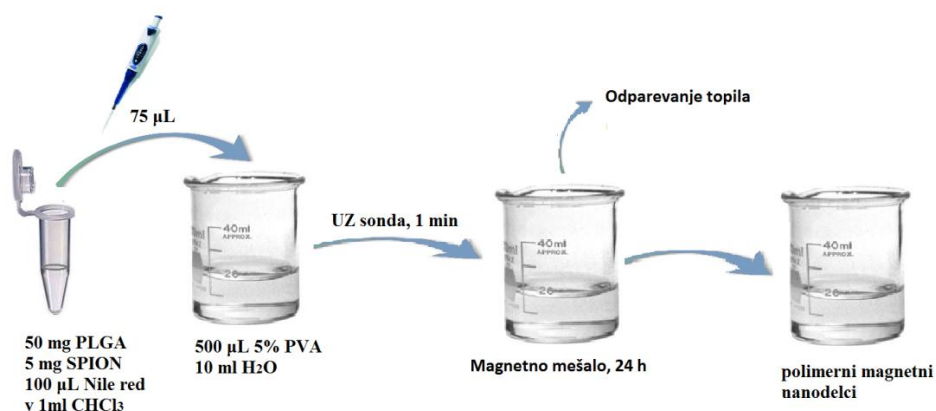
4. Volumen lipofilne faze, ki smo jo dodali k vodni fazi:

- 75  $\mu$ L
- 150  $\mu$ L
- 300  $\mu$ L
- 450  $\mu$ L
- 600  $\mu$ L

5. Volumen vodne faze s stabilizatorjem

- 500  $\mu$ L 5 % (m/m) PVA
- 1000  $\mu$ L 5 % (m/m) PVA

Metodo izdelave pMND z emulzijsko metodo z odparevanjem topila smo spremenili tudi tako, da smo vsebino iz prve epice neposredno dodali k 10,5 mL 0,25 % (m/m) vodne raztopine PVA in nato končno emulzijo sonicirali (slika 22). Po spremenjeni metodi smo izdelali vzorce tako, da smo spreminjali volumen lipofilne faze od 75  $\mu$ L do 600  $\mu$ L.

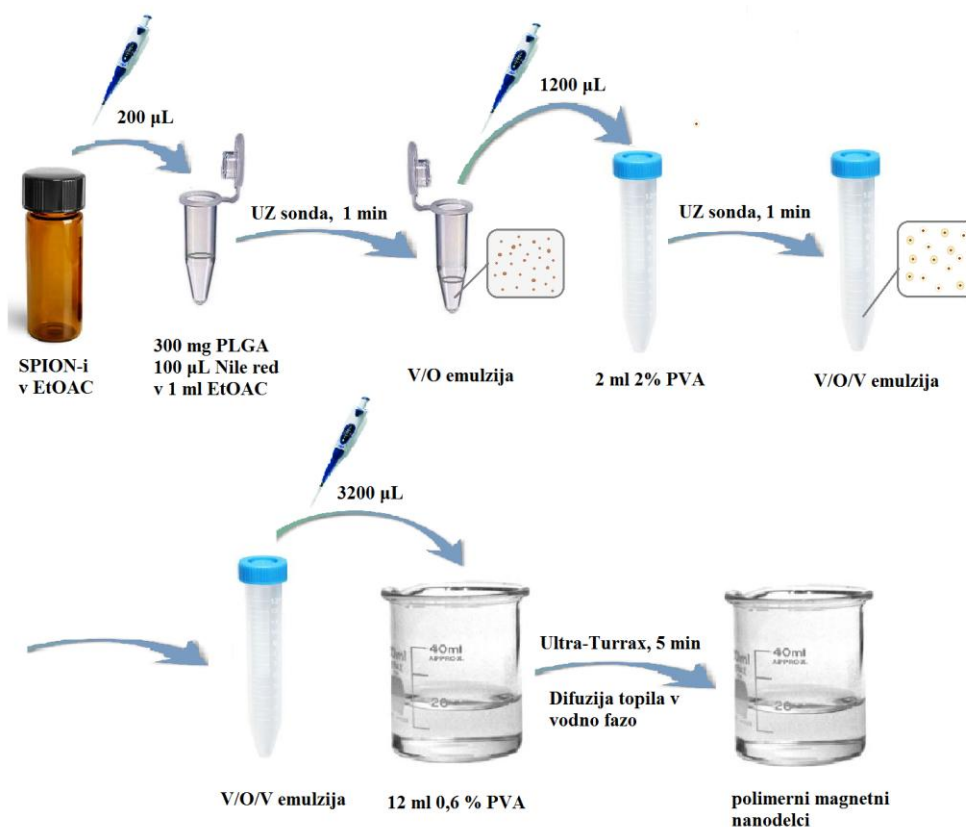


Slika 22: Shema postopka priprave pMND z emulzijsko metodo z odparevanjem topila brez stopnje priprave primarne emulzije.



### 3.3.1.3 Izdelava polimernih MND z dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo

Dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo smo uporabili za izdelavo pMND s hidrofilno disperzijo SPION-ov (SPION-i z na površini vezano citronsko kislino ali siliko). Pri dvojno emulzijsko-difuzijski metodi v prvi stopnji pripravimo emulzijo tipa  $V_1/O$ , ki jo nato dispergiramo v sekundarno vodno fazo s stabilizatorjem tako, da dobimo dvojno emulzijo tipa  $V_1/O/V_2$ . Organsko topilo nato odstranimo iz sistema bodisi z dodatkom večjega volumna vodne faze, kar povzroči difuzijo organskega topila in obarjanje polimera, ki v vodi ni topen, ter nastanek ND ali z odparevanjem organskega topila iz sistema.



Slika 23: Shema postopka priprave pMND z dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo.

#### Postopek

V epico smo natehtali 300 mg PLGA, dodali 100 µL raztopine fluorescenčnega barvila ( $C_{\text{Nile red}} = 33 \mu\text{g/mL}$ ) in vse skupaj raztopili v etilacetatu tako, da je bil celokupni volumen raztopine 1000 µL (slika 23). K raztopini smo dodali 200 µL vodne disperzije SPION-ov (2 mg, 8 mg ali 22 mg) in sonicirali z ultrazvočno sondo 1 min. Nastalo emulzijo tipa  $V/O$  smo hitro odpipetirali v centrifugirko z 2 mL 2 % (m/m) vodne raztopine stabilizatorja in ponovno sonicirali 1 min z ultrazvočno sondo, da smo dobili emulzijo tipa  $V_1/O/V_2$ .

Dvojno emulzijo smo nato odpipetirali med homogeniziranjem z rotor-stator homogenizatorjem v časo s 14 mL 0,6 % (m/m) vodne raztopine stabilizatorja in homogenizirali 5 min pri hitrosti 7.200 obratov/min.

Z dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo smo izdelali različne vzorce pMND tako, da smo spreminjali:

1. Osnovno disperzijo SPION-ov
  - disperzija SPION-ov z na površini vezano citronsko kislino;
  - disperzija SPION-ov z na površini vezano siliko;
2. Vrsto polimera
  - PLGA s prostimi končnimi karboksilnimi skupinami (Resomer RG 503H);
  - PLGA z zaestrenimi končnimi karboksilnimi skupinami (Resomer RG 502S);
3. Vrsto stabilizatorja
  - Polisorbat 80;
  - PVA.

#### **3.3.1.4 Priprava raztopina barvila**

##### *Barvilo Nile rdeče*

Osnovno raztopino barvila Nile rdeče smo pripravili tako, da smo 1,8 mg barvila raztopili v 5 mL  $\text{CHCl}_3$  in iz te raztopine pripravili raztopino s koncentracijo 33  $\mu\text{g/mL}$  (93  $\mu\text{L}$  osnovne raztopine + 907  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3$ ), ki smo jo uporabili pri izdelavi ND. Koncentracija barvila glede na polimer v ND je bila 0,007  $\mu\text{g/mg}$ , 0,013  $\mu\text{g/mg}$ , 0,033  $\mu\text{g/mg}$  in 0,066  $\mu\text{g/mg}$ .

##### *Barvilo SPP-189*

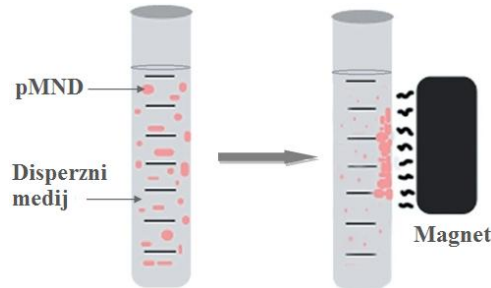
Osnovno raztopino SPP-189 smo pripravili tako, da smo 1,8 mg barvila raztopili v 1 mL  $\text{CHCl}_3$ . V MND smo nato vgrajevali različne koncentracije barvila glede na polimer: 3,6  $\mu\text{g/mg}$ , 0,36  $\mu\text{g/mg}$ , 0,067  $\mu\text{g/mg}$ , 0,0067  $\mu\text{g/mg}$ , 0,00067  $\mu\text{g/mg}$  in 0,000067  $\mu\text{g/mg}$ .

#### **3.3.1.5 Oblaganje polimernih MND s hitosanom**

Na osnovi literaturnega pregleda (36) smo se odločili pripraviti pMND obložene s hitosanom tako, da smo k disperziji pMND med mešanjem na magnetnem mešalu dodali raztopino hitosana v 1 % (m/v) vodni raztopini očetne kisline tako, da je bila končna koncentracija hitosana v vzorcu 0,1 % (m/v). Pred oblaganjem smo preverili stabilnost pMND v 1 % (m/v) vodni raztopini očetne kisline.

### 3.3.1.6 Čiščenje disperzije polimernih MND v magnetnem polju

S pomočjo magnetnega polja smo izvedli čiščenje pMND (slika 24). S čiščenjem v magnetnem polju smo odstranili presežni stabilizator, ki se ni adsorbiral na površino delcev in pMND ločili od tistih ND, ki niso vsebovali vgrajenih SPION-ov. Poleg tega smo vzorce s tem postopkom tudi skoncentrirali.



Slika 24: Shema čiščenja vzorca polimernih MND v magnetnem polju.

Plastično 15 mL centrifugirko z vzorcem pMND smo postavili ob magnet. Magnetno polje je povzročilo zbiranje pMND ob steni centrifugirke. Po 1 h smo medij s preostalo disperzijo delcev (supernatant) previdno odpipetirali v drugo centrifugirko. pMND, ki so ostali na steni centrifugirke, pa smo s pomočjo ultrazvočne kadičke redispergirali v 1 mL bidestilirane vode. Postopek čiščenja smo spremljali z merjenjem velikosti delcev vsake posamezne frakcije. Pomerili smo velikosti redispergiranih pMND kot tudi pMND, ki so ostali v supernatantu. Supernatant smo nato ponovno postavili ob magnet in postopek ponovili. Z vsako naslednjo frakcijo so se ob steni centrifugirke ob magnetu zbrali manjši delci. Zadnjo frakcijo smo na magnetu pustili 24 h, da smo iz vzorca zbrali tudi karseda majhne pMND.

### 3.3.1.7 Liofilizacija disperzije polimernih MND

S postopkom liofilizacije lahko koloidne disperzije pretvorimo v dolgotrajno stabilno suho stanje. Liofilizacija je počasna in draga metoda sušenja vzorcev; kljub temu pa se ta metoda najpogosteje uporablja za sušenje termolabilnih vzorcev (7). Pri našem delu smo s pomočjo liofilizacije določali koncentracijo pMND v frakcijah po čiščenju v magnetnem polju tako, da smo alikvotne pMND (1 mL) odpipetirali v predhodno označene in stehtane epice. Epice z vzorcem smo zamrznili v zamrzovalniku pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , zamrznjene namestili v bučke in le-te na liofilizator. Liofilizacija je potekala 20 h pri tlaku 0,630 mbar in sobni temperaturi. Po končani liofilizaciji smo epice z vzorcem stehtali in iz razlike mas po in pred liofilizacijo izračunali maso pMND:

$$m(pMND) = m(\text{epic po liofilizaciji}) - m(\text{prazne epice})$$

Liofilizirane vzorce smo hranili na sobni temperaturi zaščitene pred svetlobo.

### 3.3.2 Vrednotenje polimernih MND

Po izdelavi smo pMND vrednotili glede na naslednje parametre:

1. Izgled disperzije (organoleptično vrednotenje);
2. Povprečen premer delcev in porazdelitev velikosti delcev (fotonska korelacijska spektroskopija);
3. Naboj na površini delcev (laserska Dopplerjeva elektroforeza);
4. Fluorescenca delcev (fluorescenčna mikroskopija);
5. Oblika in morfologija delcev (presevna elektronska mikroskopija).

Organoleptično smo vzorce vrednotili tekom celotnega postopka izdelave pMND. Takšno vrednotenje nam je omogočilo hitro, toda grobo oceno dobljenega vzorca. Opazovali smo lastnosti disperzij SPION-ov (vzorci SPION-ov, ki smo jih dobili z IJS), disperzije SPION-ov v raztopini PLGA, emulzije med samim procesom izdelave, disperzije pMND v bidestilirani vodi, očiščene frakcije pMND in redispergirani liofilizirani pMND.

Povprečni premer delcev ( $d$ ) in polidisperzni indeks (PDI) smo izmerili z metodo fotonske korelacijske spektroskopije z napravo Zetasizer Nano ZS. Povprečni premer nam pove povprečno hidrodinamsko velikost ND v disperziji. Polidisperzni indeks pa je merilo za širino porazdelitve velikosti ND. Vrednosti blizu 0 kažejo na monodisperznost vzorca, kar pomeni, da so delci zelo podobnih velikosti, medtem ko vrednosti blizu 1 kažejo na polidisperznost vzorca. Fotonska korelacijska spektroskopija temelji na detekciji dinamičnega sipanja svetlobe. Osnova metode je Brownovo gibanje delcev, tj. naključno gibljenje delcev zaradi trkov z molekulami disperznega medija. Pri tem se majhni delci gibljejo hitreje kot veliki delci. Povezava med velikostjo delca in njegovo hitrostjo je definirana s Stokes-Einsteinovo enačbo. Ko vzorec osvetlimo z laserskim žarkom meri naprava fluktuacijo intenzitete sipane svetlobe in jo uporabi za izračun velikosti delcev (7,56).

Vzorec pMND (~ 1 mL) smo odpipetirali v kiveto in izmerili velikost in PDI. Za vsak vzorec je aparatura izvedla tri serije meritev. Meritev je potekala pri naslednjih pogojih: 25 °C; kot merjenja 173°; viskoznost medija 0,8872 mPas; lomni količnik medija 1,330, valovna dolžina laserske svetlobe 633 nm.

Z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze smo z napravo Zetasizer Nano ZS določili zeta potencial pMND. Zeta potencial kaže na fizikalno (ne)stabilnost koloidnih disperzij. Če imajo delci močno negativen ali pozitiven naboj, se med seboj odbijajo. V obratnem primeru lahko nastopi združevanje delcev, saj privlačne sile med delci prevladajo nad odbojnimi. Splošno velja, da je koloidni sistem, ki je elektrostatsko stabiliziran, stabilen, če je absolutna vrednost zeta potenciala večja od 30 mV (7,56).

Zeta potencial smo izmerili pri enakih pogojih, kot povprečni premer delcev tako, da smo disperzije pMND s pomočjo injekcijske brizge previdno napolnili v elektroforezno celico.

Vizualizacijo pMND pod fluorescenčnim mikroskopom smo dosegli z vgrajevanjem fluorescenčnega barvila v polimerno ogrodje MND. Snovi, ki fluorescirajo, imajo v svoji strukturi fluorofore, ki absorbirajo svetlobo krajših valovnih dolžin in oddajajo svetlobo daljših valovnih dolžin. S pomočjo fluorescenčne mikroskopije smo vrednotili fluorescenco izdelanih pMND in vrednotili morebitni pojav agregiranja delcev v vzorcu.

Obliko pMND smo ocenili s presežno elektronsko mikroskopijo (TEM). Ločljivost TEM je v nanometriškem območju, zato omogoča podroben vpogled v notranjo strukturo vzorca in tako ugotavljanje uspešnosti vgradnje SPION-ov v polimerno ogrodje (7). TEM analizo vzorcev so izvedli kolegi na IJS.

### **3.3.3 Gojenje celične linije T-47 D**

Biološki odziv na izdelane pMND smo *in vitro* vrednotili na celični liniji T-47D. Celice T-47D so tumorske celice hormonsko odvisnega raka dojk. Delo je potekalo v aseptičnih pogojih in v skladu z dobro laboratorijsko prakso. Delali smo v komori z laminarnim pretokom filtriranega zraka (LAF) s predhodno sterilizirano laboratorijsko opremo. Pred začetkom smo delovno površino LAF komore ter vse reagentne in pripomočke, ki smo jih vnesli v komoro, prebrisali s 70 % (V/V) etanolom.

#### **3.3.3.1 Priprava rastnega medija za gojenje celic T-47D**

Rastni medij smo pripravili v skladu z recepturo, ki je navedena v preglednici I. V sterilno 50 mL centrifugirko smo prenesli ustrezne količine posameznih sestavin in medij dobro premešali, označili z datumom izdelave in vsebino, ter shranili v hladilniku pri 4 °C.

**Preglednica I: Sestava rastnega medija za gojenje celic T-47D.**

Sestavine	Količine za 50 mL
DMEM medij	44 mL
FBS	5 mL
2 mM L-glutamin	0,5 mL
100 U/mL raztopina antibiotika/antimikotika	0,5 mL

### **3.3.3.2 Odmrzovanje celične linije**

Celice T-47D so bile shranjene pod kontroliranimi pogoji v tekočem dušiku na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 1 mL medija za zamrzovanje celic. Celice smo hitro odtalili in vsebino prenesli k 9 mL gojitvenega medija v sterilni centrifugirki. Nato smo 5 min centrifugirali pri 1300 obr/min, da so se celice posedle. Supernatant smo odpipetirali, sediment pa redispergirali v 1 mL rastnega medija. Suspenzijo celic smo prenesli v gojitveno platenko ( $75\text{ cm}^2$ ), kamor smo predhodno odpipetirali 15 mL rastnega medija. Gojitveno platenko smo inkubirali pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$ . Ko je sloj celic dosegel 70-80 % konfluenco, smo celice presadili.

### **3.3.3.3 Priprava celic za in vitro poskuse**

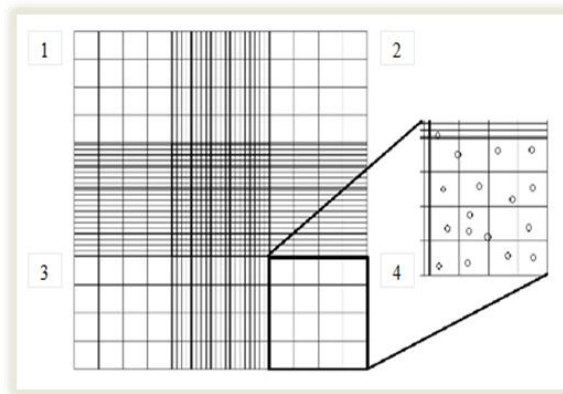
Z invertnim mikroskopom smo spremljali rast in konfluenco celic v kulturi. Celice v pogojih *in vitro* rastejo v monosloju, pritrjene na podlago gojitvene platenke. Rastni medij smo zamenjali vsake 3 dni, če celice v tem času niso dosegle 70-80 % konfluente. Rastni medij smo odlili in v gojitveno platenko odpipetirali 15 mL svežega rastnega medija. Ko so celice dosegle 70-80 % konfluenco, kar pomeni, da so prerastle 70-80 % površine dna platenke, smo jih uporabili za poskuse in/ali presadili v novo gojitveno platenko. Presaditev določenega števila celic v gojitveno platenko s svežim rastnim medijem imenujemo pasaža. Sajenje celic na ustrezne ploščice za gojenje celic je potekalo tako, da smo najprej pripravili suspenzijo celic in določili številsko koncentracijo celic v suspenziji. Del celic smo nato nasadili na ustrezne ploščice za izvedbo poskusa z MND, ostanek celic pa smo nasadili v novo gojitveno platenko.

Priprava suspenzije celic je potekala po naslednjih korakih:

1. Kulturi celic smo odstranili gojišče;
2. Celice smo sprali s 5 mL PBS, s čimer smo odstranili ostanek gojišča s FBS, ki zavira delovanje tripsina. Tripsin je proteolitični encim, ki razgrajuje medcelične povezave in povezave celic s podlago;

3. Dodali smo raztopino tripsina (1 mL v gojitveno plastenko s površino 75 cm<sup>2</sup> oziroma 0,5 mL v gojitveno plastenko s površino 25 cm<sup>2</sup>), plastenko smo na rahlo nagibali, da se je raztopina tripsina razporedila po celotni površini dna plastenke in pustili 5 min, da so se celice ločile od podlage;
4. Dodali smo 4 mL svežega gojitvenega medija s FBS, ki je ustavil delovanje tripsina (skupni volumen v plastenki: 5 mL);
5. S pipeto smo celice sprali s podlage in jih s previdnim pipetiranjem pretvorili v homogeno suspenzijo, ki smo jo prenesli v sterilno 15 mL centrifugirko;
6. Centrifugirali smo 5 min pri 1300 obr./min;
7. Supernatant smo odlili;
8. Sediment smo redispergirali v 1,5 mL svežega gojitvenega medija;
9. V novo gojitveno plastenko ali v primeru poskusa s polistirensko ploščo smo nasadili celice z gostoto od 1 x 10<sup>4</sup> do 4 x 10<sup>4</sup> celic/cm<sup>2</sup>.

Za ugotavljanje števila celic v suspenziji smo pred centrifugiranjem (korak 6) 50 µL suspenzije celic razredčili v epici s 450 µL PBS (faktor redčenja F = 10). Nato smo razredčeno suspenzijo celic prenesli na hemocitometer in s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa prešteli celice v štirih kvadratnih poljih, od katerih je vsako polje razdeljeno na 16 manjših kvadratov (slika 25).



Slika 25: Prikaz stekelca hemocitometra, kjer štejemo celice.

Številsko koncentracijo celic v vzorcu izračunamo s pomočjo enačbe 3.

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

*Enačba 3*

*N.....število celic v vzorcu*

*n<sub>i</sub>.....število celic v posameznem kvadratu hemocitometra*

*F.....faktor redčenja*

### 3.3.4 Vrednotenje polimernih MND na celični liniji

Celice smo tekom gojenja in poskusov opazovali s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa neposredno v gojišču. Pred izvedbo vsakega poskusa in po njem smo preverjali, ali je prišlo do znatnih spremembe v pritrjanju in/ali obliki celic ter prisotnosti morebitnih tujkov ali kontaminacije. Nato smo z »normalnimi« celicami izvedli naslednje poskuse:

- Spremljanje vstopa pMND v celice pod fluorescenčnim mikroskopom in barvanje posameznih celičnih struktur.
- Spremljanje vstopa pMND v celice in vpliv pMND na morfologijo celic s TEM.
- Ugotavljanje vpliva pMND na viabilnost celic z MTS testom.

#### 3.3.4.1 Spremljanje vstopa polimernih MND v celice pod fluorescenčnim mikroskopom

V vsako vdolbino polistirenske plošče s 6 vdolbinami smo položili predhodno sterilizirano krovno stekelce in nanj nasadili celice T-47D z gostoto  $1-4 \times 10^4$  celic/cm<sup>2</sup> v 2244  $\mu$ L medija. Celice smo nasadili v vdolbine v sredini plošče, saj so bile le-te v poskusih v magnetnem polju najbliže magnetu in je bila posledično jakost magnetnega polja tam največja. Celice smo inkubirali 24 h pri 37 °C in v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>, da so se pritrdele na podlago. Nato smo rastni medij previdno odpipetirali s celic in dodali vzorec ustrezne koncentracije PLGA ND z vgrajenimi SPION-i in fluorescenčnim barvilom Nile rdeče. En del poskusov je potekal tako, da smo opazovali le fluorescenco pMND. V drugem delu poskusa smo celične strukture obarvali in opazovali fluorescenco pMND, jedra in aktinskih filamentov.

Pri spremljanju vstopa pMND v celice smo uporabili naslednje vzorce pMND:

- pMND I. frakcije čiščenja z velikostjo  $339,3 \pm 0,9$  nm (končna koncentracija na celicah 50  $\mu$ g/mL ali 100  $\mu$ g/mL);
- pMND II. frakcije čiščenja z velikostjo  $228,4 \pm 1,6$  nm; delce smo obložili s hitosanom (končna koncentracija na celicah 100  $\mu$ g/mL);
- pMND III. frakcije čiščenja z velikostjo  $208,2 \pm 0,8$  nm (končna koncentracija na celicah 50  $\mu$ g/mL ali 100  $\mu$ g/mL).

Znotrajcelične strukture smo obarvali pri vzorcu, kjer smo celice izpostavili polimernim MND III. frakcije čiščenja z velikostjo  $208,2 \pm 0,8$  nm (končna koncentracija na celicah 100  $\mu$ g/mL).



Poleg celic, ki smo jih izpostavili pMND, smo v vseh primerih pripravili tudi kontrolni vzorec, kjer smo namesto pMND k celicam dodali le enak volumen, kot je bil volumen vzorca pMND, prečiščene vode ali gojitvenega medija.

Za vsak poskus, ki smo ga izvajali, smo nasadili tri plošče s celicami:

- 1. plošča je bila po dodatku polimernih MND 24 h v inkubatorju pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>;
- 2. plošča je bila po dodatku polimernih MND 2 h v inkubatorju pri 37 °C izpostavljena magnetnemu polju (nameščena neposredno nad magnetom);
- 3. plošča je bila po dodatku polimernih MND 2 h v inkubatorju pri 37 °C izven dosega magnetnega polja.

2. in 3. plošča v inkubatorju nista bili izpostavljeni atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> v zraku, zato smo v rastni medij za vzdrževanje pH dodali 10-20 mM HEPES. HEPES je pufer, ki vzdržuje fiziološki pH medija kljub spremembam v koncentraciji ogljikovega dioksida.

Po izvedbi poskusa z pMND smo pripravili preparate za mikroskopiranje po naslednjem postopku:

1. S celic smo odstranili rastni medij;
2. Celice smo sprali s 750 µL PBS (1-2 krat);
3. Celice smo fiksirali 10 min s 500 µL 4 % (m/v) raztopine formalina;
4. Raztopino formalina smo odstranili in celice sprali s 750 µL PBS;

V primeru barvanja celičnih struktur je postopek na začetku enak zgornjemu, nato pa se nadaljuje z naslednjimi koraki:

5. Celice smo permeabilizirali 10 min s 400 µL 0,25 % raztopine Triton-X100;
6. Raztopino Tritona-X100 smo odstranili in celice sprali s 750 µL PBS;
7. Celice smo inkubirali 30 min s 500 µL raztopine barvila za jedra s koncentracijo 15 µg/mL v PBS za 30 min;
8. Raztopino barvila za jedro smo odstranili in celice sprali s 750 µL PBS;
9. Celice smo inkubirali 30 min s 500 µL raztopine barvila za aktin s koncentracijo 1 µg/mL v PBS;
10. Raztopino barvila za aktin smo odstranili in celice sprali s 750 µL PBS.

Za barvanje celičnih jeder smo uporabili modro barvilo Hoechst H33342, za barvanje aktina pa smo uporabili zeleno barvilo Phalloidin-fluorescein.

V obeh primerih smo krovna stekelca s preparatom celic rahlo osušili na papirnati brisači in jih nato prenesli na objektna stekelca, tako da so bile celice med krovnim in objektnim stekelcem. Na objektno stekelce smo predhodno kanili kapljico reagenta, ki preprečuje bledenje fluorescence. Objektna stekelca smo ustrezno označili in pustili 48 h v temnem prostoru na sobni temperaturi, da so se posušila. Tako pripravljene preparate smo pregledali pod fluorescenčnim mikroskopom pri ustrezni nastavitvi svetlobe in filtru, optimalnemu za uporabljeno barvilo:

- DAPI filter za fluorescenco barvila, s katerim smo barvali jedra (Hoechst H33342);
- FITC filter za fluorescenco barvila, s katerim smo barvali aktin (Phalloidin-fluorescein);
- Tx-RED filter za fluorescenco barvila, ki smo ga vgradili v MND (Nile rdeče).

#### ***3.3.4.2 Spremljanje vstopa polimernih MND v celice s presevno elektronsko mikroskopijo***

S TEM mikroskopijo, ki je namenjena vizualizaciji notranje strukture bioloških vzorcev, smo preverjali vstop pMND v celice in njihov vpliv na morfologijo celic. Celice T-47D smo nasadili z gostoto  $3 \times 10^4$  celic/cm<sup>2</sup> v petrijevke s 3 mL ravnega medija. Celice smo inkubirali 4 dni pri 37 °C in v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. pMND smo dodali tako, da smo celicam zamenjali medij in dodali 2 mL svežega medija z dodanim 10 mM HEPES-om in 100 µg/mL pMND I. frakcije čiščenja, z velikostjo  $339,3 \pm 0,9$  nm. Tudi v tem primeru smo pripravili 3 petrijevke s celicami:

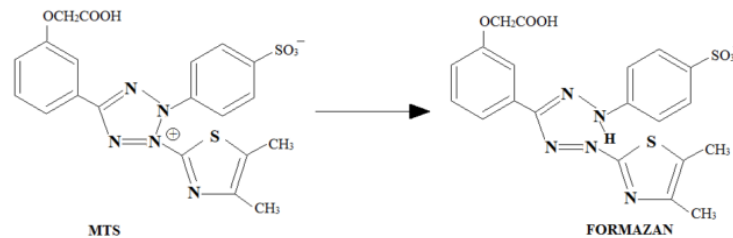
- 1. petrijevko smo po dodatku pMND izpostavili magnetnemu polju in inkubirali pri 37 °C 3 h in 30 min;
- 2. petrijevko smo po dodatku pMND inkubirali pri 37 °C 3 h in 30 min izven dosega magnetnega polja;
- 3. petrijevko brez pMND, ki je predstavljala kontrolo, smo inkubirali pri 37 °C 3 h in 30 min izven dosega magnetnega polja.

Vzorci smo nato fiksirali s fiksativom za TEM mikroskopijo, ki so ga pripravili na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete. Fiksirane vzorce smo odnesli na Inštitut za biologijo celice Medicinske fakultete, kjer so do konca pripravili preparate in vzorce pregledali s TEM mikroskopijo.

### 3.3.4.3 Vpliv polimernih MND na metabolno aktivnost celic

Za ugotavljanje vpliva pMND na metabolno aktivnost celic smo uporabili MTS test, ki je enostavna in kvantitativna kolorimetrična metoda za določevanje števila živih celic v različnih raziskavah toksičnosti in proliferacije. Glavna prednost tega testa je hitrost. Metoda je primerna za celice, ki rastejo v enem sloju. Zveza med količino nastalega produkta in številom živih celic je pri homogeni populaciji v optimalnem območju linearna in specifična za vsako celično linijo.

MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol je rumeno obarvan reagent, ki ga mitohondrijska dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v rdeče obarvan produkt formazan (slika 26). Produkt je topen v celičnem mediju. Sprememba barve je opazna tudi s prostim očesom. Absorbanco nastalega produkta izmerimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 490 nm. Količina nastalega produkta je sorazmerna številu živih (metabolno aktivnih) celic v vzorcu.



Slika 26: Pretvorba MTS reagenta v metabolno aktivnih celicah v rdeče obarvan formazan.

Celice T-47D smo nasadili z gostoto  $2 \times 10^4$  celic/cm<sup>2</sup> na mikrotitrne plošče s 96-imi vdolbinami. Celice smo nasadili le v vdolbine na osrednjem delu mikrotitrne plošče, da je bil vpliv magnetnega polja na celice karseda homogen. Volumen rastnega medija v eni vdolbini je bil 80  $\mu$ L. Plošče s celicami smo inkubirali 24 h pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, da so se celice pritrile na podlago; nato pa smo izvedli načrtovan poskus.

Vzorci smo pripravili v skladu s shemo, ki je prikazana na sliki 27. V vdolbine prvih petih vrstic, kjer so bile nasajene celice, smo dodali vzorec ustrezne koncentracije:

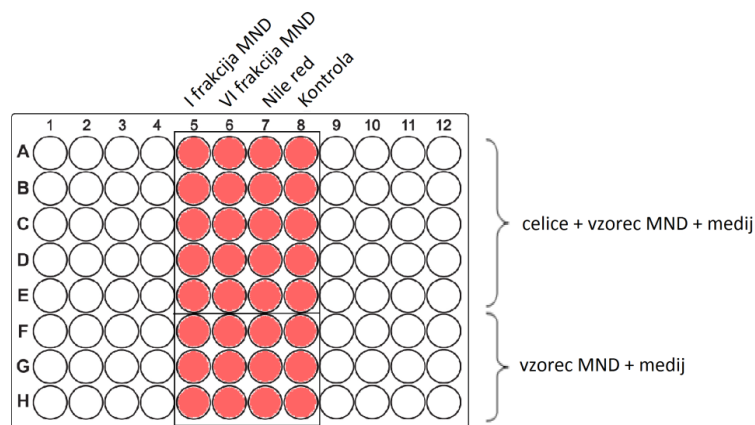
- pMND I. frakcije čiščenja z velikostjo  $339,3 \pm 0,9$  nm (končna koncentracija na celicah 100  $\mu$ g/mL);
- pMND VI. frakcije čiščenja z velikostjo  $185,5 \pm 4,7$  nm (končna koncentracija na celicah 100  $\mu$ g/mL);
- barvilo Nile rdeče (končna koncentracija na celicah  $6,78 \times 10^{-5}$  mg/mL).

V zadnjo vrsto, ki je bila kontrolna, smo dodali le medij tako, da je bil končni volumen na celicah enak kot v vdolbinah z vzorcem pMND ali barvila tj. 100  $\mu$ L.

K absorbanci vzorca, ki jo izmerimo, lahko poleg formazana, ki nastane med testom, prispevajo tudi druge komponente v vzorcu. Zato smo poskus izvajali tako, da smo izmerili tudi absorbanco ozadja tj. vzorcev brez celic z dodanimi vsemi ostalimi komponentami, ki smo jih dodali tudi k celicam. Absorbance teh vdolbin (ozadja) smo odšteli od absorbance vdolbin s celicami.

Za test smo pripravili 6 mikrotitrskih plošč:

1. ploščo smo 2 h izpostavili magnetnemu polju v inkubatorju pri 37 °C in jo nato inkubirali nadaljnjih 22 h v inkubatorju pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>;
2. ploščo smo inkubirali 24 h izven magnetnega polja v inkubatorju pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> (kontrola za 1. ploščo);
3. ploščo smo izpostavili magnetnemu polju za 2 h v inkubatorju pri 37 °C in jo nato inkubirali nadaljnjih 46 h v inkubatorju pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>;
4. ploščo smo inkubirali 48 h v inkubatorju pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> (kontrola za 3. ploščo);
5. ploščo smo izpostavili magnetnemu polju za 2 h v inkubatorju pri 37 °C in jo nato inkubirali nadaljnjih 70 h v inkubatorju pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>;
6. ploščo smo inkubirali 72 h v inkubatorju pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> (kontrola za 5. ploščo).



Slika 27: Shema primera priprave mikrotitrskе ploščе z vzorci za MTS test.

Po končani inkubaciji smo v LAF komori v vsako vdolbino dodali 10  $\mu$ L MTS reagenta. Celice smo inkubirali 1-4 h pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> in nato spektrofotometrično izmerili absorbanco vzorca pri valovni dolžini 490 nm.

Relativno metabolno aktivnost celic smo izračunali s pomočjo enačbe 4. Metabolno aktivnost celic, ki so bile izpostavljene MND, smo izrazili relativno glede na metabolno aktivnost kontrolnih celic, ki niso bile izpostavljene MND.

$$\text{Metabolna aktivnost (\%)} = \frac{Ac - Am}{Ac' - Am'}$$

*Enačba 4*

*Ac.....absorbanca celic po dodatku vzorca*

*Am.....absorbanca medija po dodatku vzorca*

*Ac'.....absorbanca kontrolnih celic*

*Am'.....absorbanca medija*

## 4 Rezultati in razprava

### 4.1 Optimizacija metode izdelave MND

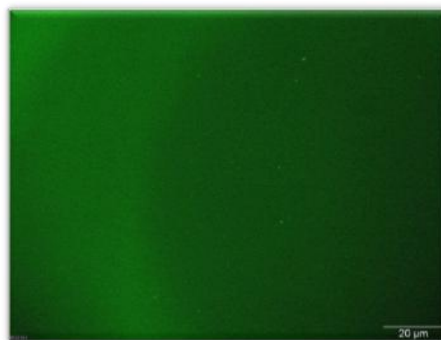
V prvem delu diplomske naloge smo se osredotočili na optimizacijo metode izdelave polimernih ND z vgrajenimi SPION-i s ciljem, da bi izdelali čim manjše ND s karseda ozko porazdelitvijo velikosti delcev, saj so takšni nanodelci zaželeni za znotrajcelični vnos ZU. Hkrati smo v tem delu optimizirali tudi fluorescenčne lastnosti pMND, saj je fluorescenca ND bistvenega pomena za njihovo vizualizacijo s fluorescenčno mikroskopijo.

#### 4.1.1 Izbira fluorescenčnega označevalca in njegove optimalne koncentracije za izdelavo fluorescenčno označenih polimernih ND

Za spremljanje ND s fluorescenčno mikroskopijo smo v postopku izdelave ND v polimerno ogrodje vgradili fluorescenčno barvilo; bodisi Nile rdeče ali SPP-189.

Ugotavljali smo, kakšna koncentracija barvila SPP-189 je potrebna, da delce vidimo pod fluorescenčnim mikroskopom. SPP-189 je kumarinski derivat z dolgo lipofilno verigo, zato se za razliko od 6-kumarina, ki se pogosto uporablja za fluorescenčno označevanje ND, močneje veže z lipofilnimi strukturami (58).

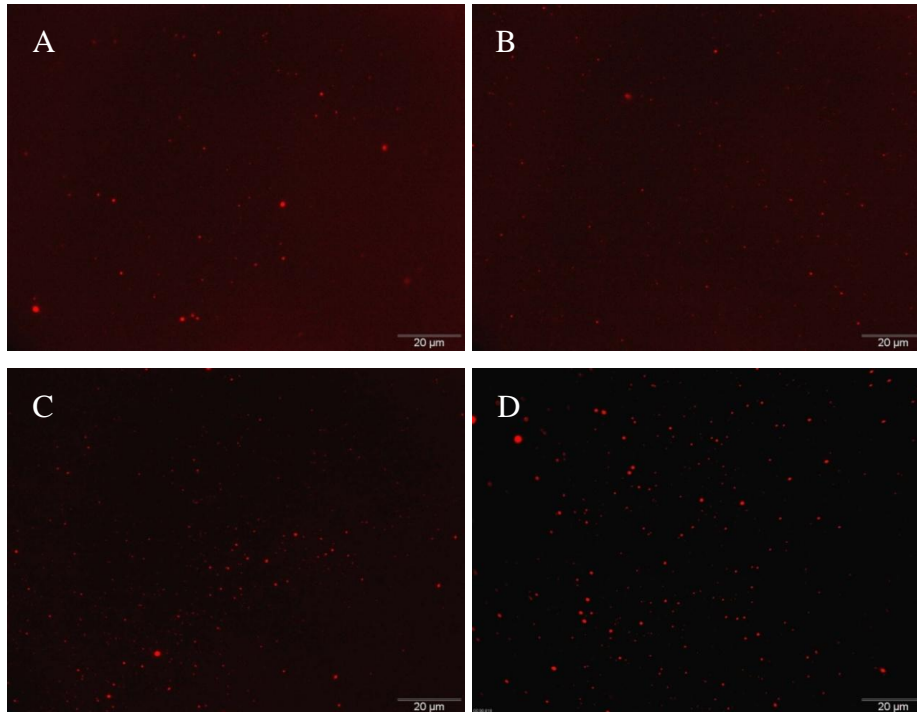
Ugotovili smo, da PLGA ND s SPP-189 fluorescirajo zeleno in so pod mikroskopom vidni le pri dveh proučevanih koncentracijah SPP-189 glede na polimer (0,36  $\mu\text{g}/\text{mg}$  in 0,067  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Toda fluorescenca delcev je bila zelo šibka, opazili smo le nekaj svetlo zelenih pik, ki so predstavljale nanodelce (slika 28). Fluorescenca delcev in s tem slika pod mikroskopom je bila boljša pri nižji koncentraciji fluorescenčnega barvila v delcih.



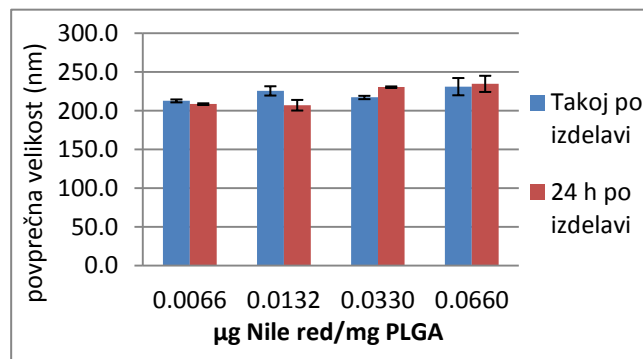
Slika 28: PLGA ND z vgrajenim barvilom SPP-189 ( $C_{\text{SPP-189}} = 0,067 \mu\text{g}/\text{mg}$ ).

Tudi Nile rdeče je lipofilno fluorescenčno barvilo, ki smo ga v ND vgrajevali v koncentraciji 0,007  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 0,013  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 0,033  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 0,066  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (slika 29). PLGA ND

z barvilom Nile rdeče so pod fluorescenčnim mikroskopom fluorescirali rdeče, hkrati pa smo opazili, da so bili prisotni ND različnih velikosti. V primerjavi z ND, ki so imeli vgrajeno barvilo SPP-189, je bila fluorescenca ND z barvilom Nile rdeče bolj intenzivna. Ugotovili smo, da se intenziteta fluorescence delcev s koncentracijo vgrajenega fluorescenčnega barvila povečuje. PLGA ND s koncentracijo barvila Nile rdeče 0,066  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (slika 29 D) so bili dobro vidni pod fluorescenčnim mikroskopom, zato smo se odločili, da bomo takšno koncentracijo barvila uporabljali v nadaljnjih poskusih.



Slika 29: PLGA ND z vsebnostjo barvila Nile rdeče (A) 0,007  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ; (B) 0,013  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ; (C) 0,033  $\mu\text{g}/\text{mg}$  in (D) 0,066  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Vse slike smo posneli pri enakih nastavitvah parametrov mikroskopa.

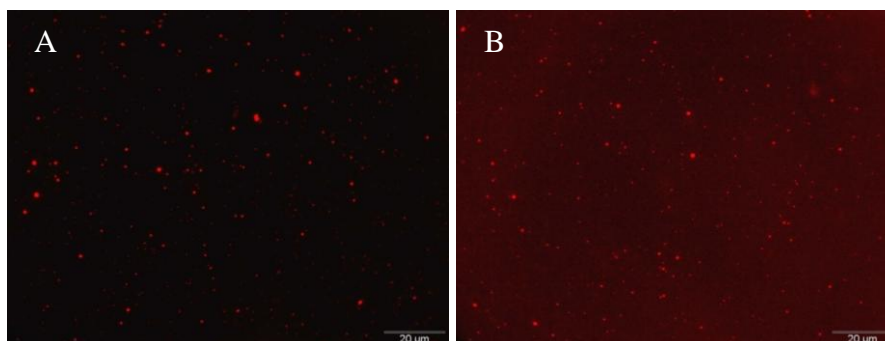


Slika 30: Povprečna velikost PLGA ND z različnimi koncentracijami barvila Nile rdeče takoj po izdelavi in 24 h po izdelavi.

Povprečna velikost vseh polimernih ND z barvilom Nile rdeče, ki smo jo izmerili, je bila takoj po izdelavi  $221,7 \pm 8,3$  nm in PDI  $0,25 \pm 0,10$ . Za potrditev stabilnosti vzorca smo

velikost delcev in PDI izmerili še 24 h po izdelavi. Povprečna velikost je znašala  $220,3 \pm 14,4$  nm in PDI  $0,27 \pm 0,06$ , kar pomeni, da je bil vzorec glede na velikost delcev stabilen (slika 30).

Z obema metodama smo izdelali PLGA ND brez vgrajenih SPION-ov, a z vgrajenim barvilom Nile rdeče (slika 31). Vzorca smo uporabljali kot kontrolo pri nadaljnjem mikroskopiranju.



Slika 31: PLGA ND z vgrajenim barvilom Nile rdeče ( $0,033 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) izdelani z emulzijsko-difuzijsko metodo (A) in z emulzijsko metodo z odparevanjem topila (B).

Velikosti in PDI PLGA ND s fluorescenčnimi barvili, ki smo jih izdelali, so prikazane v preglednici II. Podatki kažejo, da je velikost PLGA ND z barvilom Nile rdeče, ki smo jih izdelali z emulzijsko metodo z odparevanjem topila, manjša kot velikost ND, ki smo jih izdelali z emulzijsko-difuzijsko metodo. Metoda izdelave in s tem razlika v uporabljenem topilu, vpliva na velikost delcev. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da lahko z metodo odparevanja topila izdelamo manjše ND enake sestave kot z emulzijsko-difuzijsko metodo.

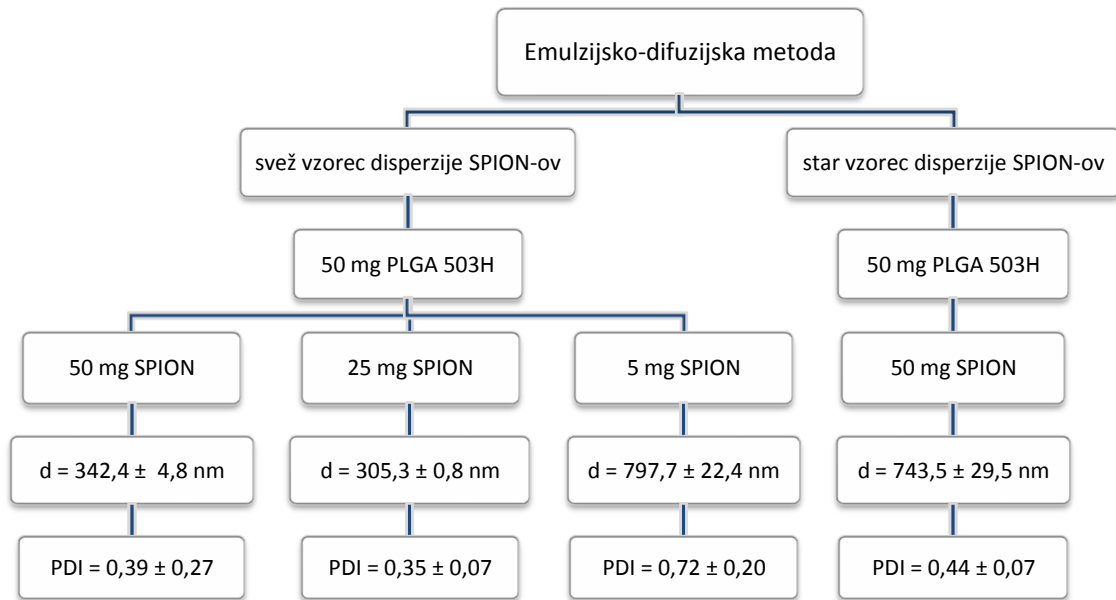
Preglednica II: Velikosti in PDI PLGA ND brez/ z fluorescenčnim barvilom Nile rdeče.

Metoda	Barvilo	d (nm)	PDI
Emulzijsko-difuzijska	/	$327,1 \pm 23,4$	$0,36 \pm 0,04$
Emulzijsko-difuzijska	Nile rdeče	$226,9 \pm 11,0$	$0,28 \pm 0,08$
Emulzijska z odparevanjem topila	Nile rdeče	$144,4 \pm 1,30$	$0,18 \pm 0,01$

#### 4.1.2 Izdelava MND z emulzijsko-difuzijsko metodo

S to metodo smo izdelali ND z vgrajenimi SPION-i, ki so bili obloženi z ricinolejsko kislino. Povprečne velikosti in PDI MND z različno sestavo so prikazane na sliki 32. Vsi polimerni MND izdelani z emulzijsko-difuzijsko metodo so bili fizikalno nestabilni, saj smo po določenem času v vseh vzorcih opazili izpadanje delcev, ne glede na to, kakšno je bilo masno razmerje med PLGA in SPION-i.





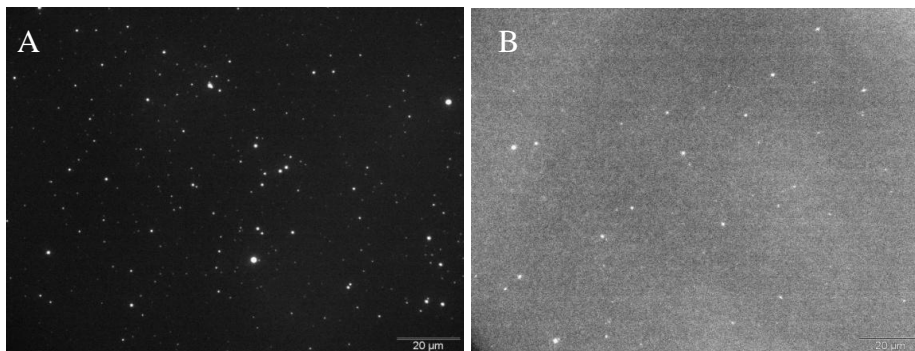
Slika 32: Velikosti in PDI MND, ki smo jih izdelali z emulzijsko-difuzijsko metodo.

Disperzije MND z večjo vsebnostjo SPION-ov v MND so bile temnejše obarvane in izrazito nestabilne. Delci so se združevali v agregate, ki so bili prisotni na površini disperzije, ter na stenah in dnu vsebnika. V času merjenja velikosti so delci sedimentirali na dno kivete. Zaradi tega je izmerjena povprečna velikost delcev nereprezentativna in manjša kot dejanska v disperziji. Po pregledu pod fluorescenčnim mikroskopom smo opazili, da ti delci le šibko fluorescirajo. Z zmanjševanjem vsebnosti SPION-ov v MND so delci intenzivneje fluorescirali pod fluorescenčnim mikroskopom. Disperzije teh vzorcev pa so bile na videz bolj transparentne, homogene in svetlo rjave barve. Po določenem času se je tudi v teh vzorcih pojavil sediment, ki pa smo ga lahko ponovno redispergirali. Vzorec, ki je vseboval 5 mg SPION-ov in 50 mg polimera, je bil stabilen dovolj časa za meritev velikosti s fotonsko korelacijsko spektroskopijo. Zato lahko zaključimo, da smo le pri tem vzorcu z meritvijo dobili zanesljive podatke o velikosti delcev. Glede na velikost delcev, s to metodo nismo uspeli izdelati MND, ki bi bili primerni za uporabo *in vivo*. Po literarnih podatkih je namreč zaželena velikost do 250 nm, s PDI pod 0,3 (7,40). Razloga za neustrezno velikost in nestabilnost vzorcev sta vsaj dva:

1. Hitrost homogeniziranja z rotor-stator homogenizatorjem, ki smo jo uporabili za izdelavo MND, je bila premajhna. S povečanjem obratov iz 7.200 obr/min na 24.000 obr/min bi glede na predhodne raziskave najverjetneje lahko dosegli manjšo povprečno velikost delcev (27). S tem bi vplivali tudi na večjo stabilnost in manjše izpadanje delcev.

2. Težava, ki smo jo opazili med pripravo MND, pa so bile predvsem spremenljive lastnosti disperzije SPION-ov v etilacetatu. Opazili smo razlike v lastnostih disperzije, če je bila le-ta sveže pripravljena ali je stala dlje časa. S staranjem se spreminjajo lastnosti disperzije, kar opazimo tudi vizualno saj dobi disperzija rjavo-rdeč lesk v nasprotju s svežim vzorcem, ki je precej temnejši in bolj črno obarvan. Disperzije MND, pri katerih smo za pripravo uporabili 50 mg SPION-ov iz disperzije SPION-ov starejšega vzorca, so bile bolj stabilne kot disperzije MND pripravljene iz disperzije SPION-ov stare le nekaj dni (»svež« vzorec). Pri drugem vzorcu so delci tako hitro sedimentirali, da podatki o velikosti delcev niso zanesljivi. Zato lahko zaključimo, da je dejanska povprečna velikost delcev v vzorcu večja kot izmerjena. S staranjem se lastnosti disperzije SPION-ov v etilacetatu spreminjajo tako, da postanejo bolj ugodne za vgrajevanje v polimerno ogrodje.

Ugotovili smo, da delež SPION-ov v MND vpliva na stabilnost samega sistema. Večji kot je delež, prej nastopi sedimentacija delcev, kar je posledica večje gostote železovega oksida ( $\rho_{\text{maghemit}} = 5,59 \text{ g/cm}^3$  (28)) v primerjavi z gostoto polimera ( $\rho_{\text{PLGA}} = 1,34 \text{ g/cm}^3$  (59)). Razmerje med PLGA in SPION-i v MND vpliva tudi na fluorescenco MND (slika 33). S povečevanjem masnega deleža SPION-ov v MND postaja fluorescenca delcev vse šibkejša kljub temu, da so imeli vsi delci vgrajeno enako koncentracijo fluorofora. Fluorescenca MND, ki so vsebovali 5 mg SPION-ov, je bila primerljiva s kontrolnimi polimernimi ND brez SPION-ov. Za razliko od njih je bila fluorescenca vzorcev s 50 mg SPION-ov komaj zaznavna. Predvidevamo, da pride do interakcij med fluoroforom in SPION-i, zato delci ne fluorescirajo oz. je fluorescenca zelo šibka (60).

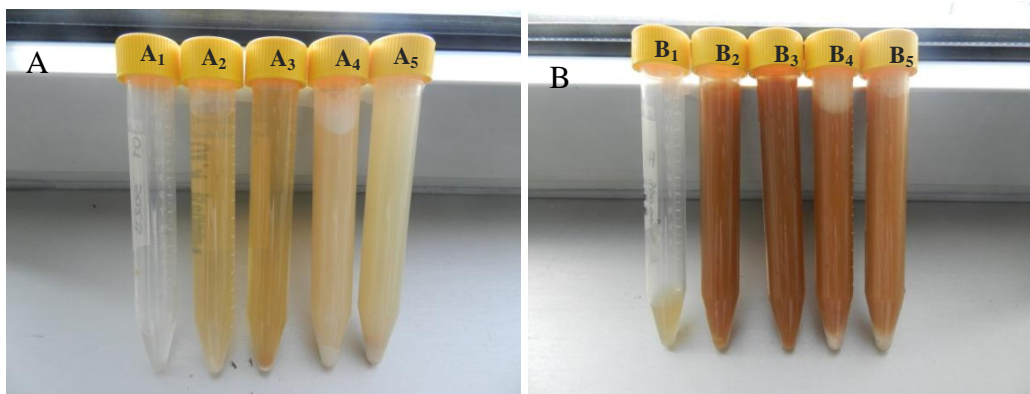


Slika 33: Polimerni MDN, ki vsebujejo (A) 50 mg PLGA in 5 mg SPION-ov ter (B) 50 mg PLGA in 25 mg SPION-ov.

#### 4.1.3 Izdelava MND z dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo

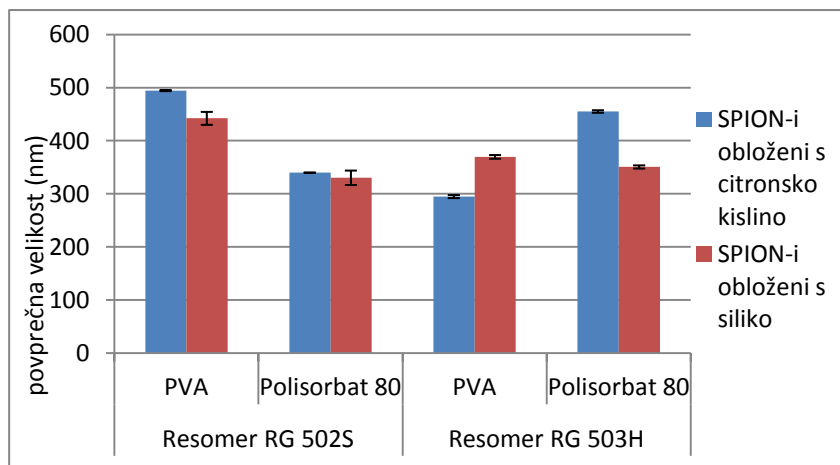
Z dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo smo skušali v polimerno ogrodje vgraditi hidrofilne vzorce SPION-ov: (SPION-e obložene s citronsko kislino in SPION-e obložene s siliko tj. sloj silicijevega dioksida). Prednost hidrofilnih SPION-ov je manjša opsonizacija superparamagnetnih ND železovega oksida v organizmu. SPION-i obloženi s siliko se ne razgradijo v organizmu in se, če so dovolj majhni, izločajo s filtracijo skozi ledvice. To je ugodno, ker ne pride do porušanja ravnovesja železovih ionov v celicah (44).

Pri izdelavi ND s to metodo smo opazili izrazito obarjanje polimera iz sistema (slika 34). Vzrok je verjetno majhna afiniteta med SPION-i s hidrofilno površino in hidrofobnim polimerom (PLGA), zato se SPION-i niso vgradili v polimerno ogrodje, ampak so ostali dispergirani v disperznem mediju. Pri izdelavi ND smo uporabili dve vrsti polimera: PLGA s prostimi terminalnimi –COOH skupinami (Resomer RG 503H) in PLGA z zaestrenimi končnimi –COOH skupinami (Resomer RG 502S), zato je slednji bolj hidrofoben. Glede na lastnosti polimera bi pričakovali več interakcij in boljše vgrajevanje hidrofilnih SPION-ov v delce iz Resomera RG 503H, a smo v obeh primerih dobili podobne rezultate, tj. ločeno obarjanje polimera v obliki bele oborine (slika 34). Metodo izdelave smo modificirali tudi tako, da smo spremenili razmerje dodanega polimera in SPION-ov ter vrsto stabilizatorja. Kot stabilizator smo uporabili PVA ali polisorbata 80.



Slika 34: Vzorci pripravljene z dvojno emulzijsko-difuzijsko metodo. (A) Vzorci s SPION-i obloženimi s citronsko kislino: A1 – redispergirana 1. frakcija čiščenja v magnetnem polju vzorca A2; A2 – vzorec Resomer RG 502S in stabilizator PVA; A3 – vzorec Resomer RG 503H in stabilizator PVA; A4 – vzorec Resomer RG 503H in stabilizator polisorbata 80; A5 – vzorec Resomer RG 502S in stabilizator polisorbata 80. (B) Vzorci s SPION-i obloženimi s siliko: B1 - redispergirana 1. frakcija čiščenja v magnetnem polju vzorca B2; B2 – vzorec Resomer RG 502S in stabilizator PVA; B3 – vzorec Resomer RG 503H in stabilizator PVA; B4 – vzorec Resomer RG 503H in stabilizator polisorbata 80; B5 – vzorec Resomer RG 502S in stabilizator polisorbata 80.

Disperzije, ki so vsebovale hidrofilne SPION-e obložene s citronsko kislino, so bile po izdelavi rjave barve z oranžnim odtenkom in motne. Disperzije, ki so vsebovale SPION-e obložene s siliko, so bile na videz svetlejšje in bolj transparentne; ob uporabi polisorbata 80 kot stabilizatorja pa celo na videz mlečne (slika 34). V vseh vzorcih smo po določenem času opazili belo oborino, ki je bila bolj izrazita v primeru uporabe polisorbata 80. Kadar smo pri izdelavi vzorca uporabili SPION-e obložene s citronsko kislino in PVA kot stabilizator, smo na špranji homogenizatorja opazili nalaganje polimera v obliki lepljive mase. Torej so med izdelavo nastale izgube. Z zamenjavo stabilizatorja, tj. z uporabo polisorbata 80, smo se omenjeni težavi izognili in lepljive vsebine na homogenizatorju nismo opazili. Pri vzorcih s SPION-i s siliko v nobenem primeru nismo opazili pojava lepljive snovi na homogenizatorju. Pri obeh vzorcih, ki smo jih očistili v magnetnem polju (slika 34, A1 in B1) in ponovno redispersgirali, vidimo, da sta vzorca skoraj popolnoma transparentna in brez oborine. Na podlagi tega lahko sklepamo, da vzorca vsebujeta predvsem dispergirane nevgrajene SPION-e; torej v postopku izdelave SPION-ov nismo uspeli vgraditi v polimerno ogrodje. Na sliki 35 so prikazane izmerjene povprečne velikosti delcev, ki so dejansko povprečne vrednosti dveh populacij: polimernih ND in SPION-ov v vzorcu.



Slika 35: Povprečne velikosti ND v vzorcih s hidrofilnimi SPION-i.

Rezultati kažejo, da na velikost delcev vplivata tako vrsta polimera kot tudi vrsta uporabljenega stabilizatorja. V obeh primerih kombinacija PVA in Resomer RG 502S daje delce z največjo velikostjo. Povprečna velikost v vzorcih, ki vsebujejo Resomer RG 503H in PVA kot stabilizator, je manjša, kot povprečna velikost v vzorcih, ki vsebujejo Resomer RG 502S in PVA kot stabilizator. Z uporabo stabilizatorja polisorbata 80 smo dobili nekoliko manjše delce v primeru Resomera RG 502S kot v primerjavi z Resomerom

RG 503H. Poudariti moramo, da so to izmerjene velikosti takoj po izdelavi, preden je nastopila sedimentacija in da polimerni delci v vzorcih verjetno niso bili magnetni, kar kaže pojav bele oborine in rjavega supernatanta. Za izdelavo pMND s hidrofilnimi SPION-i se je uporabljen pristop izkazal kot neustrezen. Poskusili bi lahko na primer z uporabo drugih polimerov ali drugih metod izdelave.

#### 4.1.4 Izdelava MND z emulzijsko metodo z odparevanjem topila

Z emulzijsko metodo z odparevanjem topila smo izdelali pMND iz disperzije SPION-ov v kloroformu. Kloroform smo iz emulzijskega sistema odstranili z dolgotrajnim mešanjem na magnetnem mešalu ali stresalniku pri sobni temperaturi in normalnem zračnem tlaku (24 h v digestoriju). Ugotavljali smo, kako način mešanja vpliva na velikost delcev v disperziji. Rezultati povprečnih velikosti delcev in PDI so prikazani v preglednici III.

**Preglednica III: Povprečne velikosti delcev in PDI vzorcev MND, ki smo jih izdelali z emulzijsko metodo z odparevanjem topila.**

Sestava pMND	Način mešanja	d (nm)	PDI
50 mg PLGA + 5 mg SPION-ov	Mag. mešalo	185,1 ± 1,4	0,12 ± 0,01
	Stresalnik	252,8 ± 4,9	0,40 ± 0,09
50 mg PLGA + 50 mg SPION-ov	Mag. mešalo	219,9 ± 2,2	0,25 ± 0,03
	Stresalnik	238,9 ± 1,5	0,17 ± 0,01

Rezultati kažejo, da je povprečna velikost pMND, ki smo jih izdelali z uporabo magnetnega mešala, manjša kot povprečna velikost pMND, ki smo jih izdelali z uporabo stresalnika. Razlog je adsorpcija večjih pMND iz disperzije na magnet magnetnega mešala, zato je bila povprečna velikost delcev v disperziji manjša. pMND so se tako močno vezali na magnet magnetnega mešala, da jih nismo mogli popolnoma odstraniti in ponovno dispergirati v mediju. Večji pMND imajo več vgrajenih SPION-ov in zato bolj izražene magnetne lastnosti, zato se prej in močneje vežejo na površino magnetka, ki ga uporabljamo za mešanje vzorca. Kljub izgubam, ki so nastale, smo se odločili, da bomo nadaljevali z izdelavo delcev z uporabo magnetnega mešala, saj je bila njihova povprečna velikost manjša.

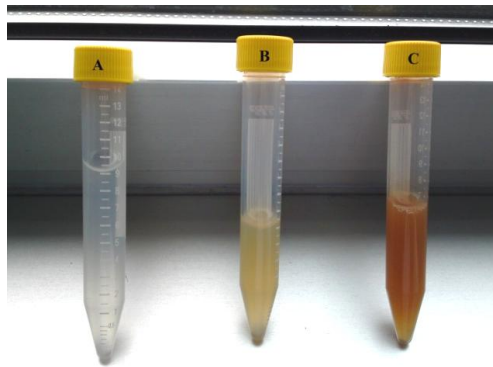
Cilj našega raziskovalnega dela je bil izdelati stabilne pMND z velikostjo pod 250 nm, ki karseda intenzivno fluorescirajo pod mikroskopom in vsebujejo vgrajen čim večji delež SPION-ov, saj vsebnost SPION-ov v delcih vpliva na odzivnost pMND na zunanje magnetno polje. Čim boljša odzivnost oziroma čim večja vsebnost SPION-ov v pMND je zaželena zato, da bomo pMND pri potencialni uporabi *in vivo* čim lažje usmerjali v

biološkem sistemu s pomočjo zunanjega magnetnega polja. Zato smo se posvetili tudi optimizaciji vsebnosti deleža SPION-ov v pMND. Začeli smo z izdelavo pMND, ki so vsebovali 50 mg PLGA in 50 mg SPION-ov. Ker je bila fluorescenca pMND šibka in vzorci nestabilni, smo zmanjševali delež SPION-ov. Na sliki 36 so prikazane disperzije pMND z različnim razmerjem PLGA:SPION-i. Iskali smo optimalno razmerje SPION-ov in PLGA, pri katerem je vsebnost SPION-ov takšna, da se delci odzivajo na prisotnost zunanjega magnetnega polja, hkrati pa je fluorescenca dovolj intenzivna za njihovo vizualizacijo. V preglednici IV so zbrane lastnosti vzorcev, ki smo jih izdelali z emulzijsko metodo z odparevanjem topila in z različnimi razmerji med PLGA in SPION-i. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da so imeli najboljše lastnosti MND izdelani iz 50 mg PLGA in 5 mg SPION-ov.

**Preglednica IV: Povprečna velikost delcev, PDI, organoleptične lastnosti in fluorescenca vzorcev MND, ki smo jih izdelali z emulzijsko metodo z odparevanjem topila.**

<b>m<sub>(PLGA)</sub> (mg)</b>	<b>m<sub>(SPION-i)</sub> (mg)</b>	<b>d (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Organoleptične lastnosti</b>	<b>Fluorescenca</b>
50	5	166,4 ± 2,3	0,14 ± 0,01	Svetlo rjave disperzije, transparentne, ni opaznega izpadanja delcev.	Delci intenzivno fluorescirajo.
40	10	168,1 ± 0,7	0,16 ± 0,02	Rjave disperzije, prisotno je izpadanje delcev.	Delci dobro vidni pod mikroskopom, a prisotni delci v obliki skupkov.
35	15	173,4 ± 1,2	0,11 ± 0,02	Rjave disperzije, prisotno je izpadanje delcev.	Delci slabo vidni pod mikroskopom, prisotni so tudi večji delci.
30	20	172,0 ± 0,4	0,07 ± 0,01	Temno rjave disperzije, prisotno je izpadanje delcev.	Delci slabo vidni pod mikroskopom, fluorescirajo le večji delci.
25	25	205,6 ± 0,5	0,09 ± 0,01	Temno rjave disperzije, prisotno je izpadanje delcev.	Delci slabo vidni pod mikroskopom.
50	50	191,0 ± 1,5	0,08 ± 0,01	Temno rjave disperzije, prisotni so veliki rjavi delci, ki sedimentirajo.	Delci slabo vidni pod mikroskopom.
80	20	186,8 ± 2,1	0,08 ± 0,02	Temno rjave disperzije, prisotni so veliki rjavi delci ki sedimentirajo, vendar se redispergirajo po stresanju.	Delci slabo vidni pod mikroskopom.

Tudi pri pMND, ki smo jih izdelali z emulzijsko metodo z odparevanjem topila, smo opazili nestabilnost vzorca in izpadanje delcev, vendar v manjši meri v primerjavi z emulzijsko-difuzijsko metodo. Da so ti delci bolj stabilni, kažejo tudi njihove manjše povprečne velikosti (166-186 nm) in PDI, katerega vrednost je bila okrog 0,1. Delež SPION-ov v pMND vpliva na njihovo agregiranje in s tem tudi na stabilnost samega vzorca; prav tako pa tudi na fluorescenco pMND. Z zmanjševanjem vsebnosti SPION-ov v pMND se zmanjšuje pojav agregiranja pMND in poveča se intenziteta njihove fluorescence.



Slika 36: Vzorci ND, ki smo jih izdelali z metodo odparevanja topila: A – polimerni ND z barvilom Nile rdeče; B – polimerni MND z barvilom Nile rdeče ( $m_{(PLGA)}:m_{(SPION-i)} = 1:10$ ); C - polimerni MND z barvilom Nile rdeče ( $m_{(PLGA)}:m_{(SPION-i)} = 1:1$ ).

#### 4.1.4.1 Vpliv volumna vodne faze na velikost in polidisperznost pMND

S ciljem ugotoviti, ali volumen vodne faze s stabilizatorjem vpliva na povprečno velikost in PDI pMND, smo pri izdelavi spreminjali volumen dodane vodne faze. Rezultati prikazani v preglednici V kažejo, da je vpliv volumna pogojen s sestavo pMND. V nobenem primeru pa vpliv volumna vodne faze ni zelo izrazit.

Preglednica V: Povprečna velikost in PDI pMND, ki smo jih izdelali z različnim volumnom dodane vodne faze.

$m_{(PLGA)}$ (mg)	$m_{(SPION-ov)}$ (mg)	$V_{(PVA)}$ ( $\mu$ L)	d (nm)	PDI
50	50	500	$191,0 \pm 1,5$	$0,08 \pm 0,01$
		1000	$205,8 \pm 0,9$	$0,09 \pm 0,02$
80	20	500	$186,8 \pm 0,9$	$0,08 \pm 0,02$
		1000	$170,3 \pm 1,3$	$0,12 \pm 0,03$

Z organoleptičnim vrednotenjem smo ugotovili, da povečan volumen vodne faze ne vpliva bistveno na agregacijo delcev, saj je bila koncentracija stabilizatorja v obeh primerih ista. Disperzije so bile temno rjave barve. Intenziteta barve je korelirala z vsebnostjo SPION-ov v vzorcu. pMND so zelo hidrofobni in se zato radi adsorbirajo na stene centrifugirke ali pa

sedimentirajo na dno vsebnika. S povečanjem volumna vodne faze z isto koncentracijo stabilizatorja nismo odpravili opisanih težav, zato smo se odločili, da bomo v pripravi pMND za nadaljnje poskuse uporabljali 500  $\mu$ L vodne faze s 5 % (m/V) PVA.

#### 4.1.4.2 Vpliv volumna lipofilne faze na velikost in polidisperznost pMND

Kot najbolj stabilni vzorci, ki so hkrati intenzivno fluorescirali, so se izkazali pMND pripravljene z razmerjem med PLGA in SPION-i 10:1. Zato smo izhajali iz sestave teh vzorcev in ugotavljali vpliv volumna lipofilne faze na velikost in polidisperznost pMND. V preglednici VI so prikazani rezultati poskusa povečevanja volumna lipofilne faze pri izdelavi MND s 50 mg PLGA in 5 mg SPION-ov.

**Preglednica VI: Vpliv volumna lipofilne faze na povprečno velikost, PDI, organoleptične lastnosti in fluorescenco MND, ki smo jih pripravili z emulzijsko metodo z odparevanjem topila.**

$V_{\text{(lipofilne faze)}}$ ( $\mu$ L)	d (nm)	PDI	Organoleptične lastnosti	Fluorescenca
75	166,4 $\pm$ 2,3	0,14 $\pm$ 0,01	Svetlo rjavo-oranžne disperzije, transparentne, brez opaznega izpadanja delcev.	Intenzivna fluorescenca delcev.
150	194,8 $\pm$ 1,7	0,14 $\pm$ 0,01	Rjave disperzije.	Intenzivna fluorescenca delcev.
300	234,6 $\pm$ 2,3	0,18 $\pm$ 0,01	Rjave disperzije.	Intenzivna fluorescenca delcev.
450	247,6 $\pm$ 2,2	0,23 $\pm$ 0,02	Temno rjave disperzije, opazno je izpadanje delcev.	Intenzivna fluorescenca delcev.
600	307,4 $\pm$ 1,5	0,27 $\pm$ 0,01	Temno rjave disperzije, opazno je izpadanje delcev.	Intenzivna fluorescenca delcev.

S povečevanjem volumna lipofilne faze sta se povečevala tudi povprečna velikost delcev in PDI. Delci v vseh vzorcih so intenzivno fluorescirali pod fluorescenčnim mikroskopom, kar je pričakovano, saj je bila njihova sestava enaka; razlikovala pa se je njihova koncentracija v vzorcu. Pri večjem volumnu dodane lipofilne faze smo opazili obarjanje (izpadanje) delcev, kar je posledica večje povprečne velikosti delcev v vzorcu. Razlog je lahko neenakomeren učinek soniciranja na celoten volumen emulzije, saj gre pri večjih volumnih dodane lipofilne faze za posledično večji volumen vzorca, zato je lahko energija, ki jo vnesemo v sistem s soniciranjem neenakomerno porazdeljena oz. to pomeni nehomogeno velikost kapljic v emulziji. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko



zaključimo, da je optimalen manjši volumen lipofilne faze, ker je soniciranje vzorca v tem primeru bolj učinkovito in so dobljeni pMND povprečno manjše velikosti.

#### 4.1.4.3 Modifikacija emulzijske metode z odparevanjem topila

Emulzijsko metodo z odparevanjem topila smo modificirali tako, da smo izpustili stopnjo priprave primarne emulzije, ampak smo organsko fazo neposredno emulgirali v vodno fazo (10,5 mL) s stabilizatorjem (0,25 % (m/V) PVA). Celokupna količina stabilizatorja je bila tako enaka kot v primarni metodi izdelave, volumen emulzije, ki smo jo sonicirali z uporabo ultrazvočne sonde, pa je bil večji. Rezultati so prikazani v preglednici VII.

**Preglednica VII: Vpliv modifikacije emulzijske metode z odparevanjem topila na povprečno velikost, PDI, organoleptične lastnosti in fluorescenco MND.**

<b>m<sub>(PLGA)</sub> (mg)</b>	<b>m<sub>(SPION-ov)</sub> (mg)</b>	<b>d (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Organoleptične lastnosti</b>	<b>Fluorescenca</b>
50	5	332,6 ± 10,5	0,33 ± 0,04	Svetlo rjave disperzije, opazna sedimentacija rjavih delcev.	Delci intenzivno fluorescirajo, a so združeni v skupke.
40	10	347,7 ± 2,5	0,31 ± 0,01	Rjave disperzije, opazna sedimentacija delcev.	Delci intenzivno fluorescirajo, a so združeni v skupke.
35	15	291,3 ± 84,0	0,46 ± 0,04	Skoraj brezbarvne disperzije, obsežna sedimentacija delcev.	Delci niso vidni pod mikroskopom.
30	20	209,1 ± 2,1	0,28 ± 0,03	Svetlo rjave disperzije, obsežna sedimentacija delcev.	Delci niso vidni pod mikroskopom.

Povprečna velikost pMND, ki smo jih izdelali z modificirano metodo, je bila večja kot velikost pMND, ki smo jih izdelali z nemodificirano metodo. Tudi PDI je bil višji za pMND izdelane po tej metodi, kar nakazuje na bolj nehomogeno populacijo delcev v vzorcu. Opazili smo, da koncentracija PVA v stopnji homogeniziranja (primarne) emulzije vpliva na velikost in stabilnost delcev v vzorcu. Pri manjši koncentraciji stabilizatorja se delci združujejo in tvorijo agregate, ki sedimentirajo na dno vsebnika.

Vpliv povečevanja volumna lipofilne faze smo preverili tudi pri vzorcih, ki smo jih izdelali z modificirano metodo odparevanja topila. Rezultati so prikazani v preglednici VIII. V nasprotju z osnovno emulzijsko metodo z odparevanjem topila smo pri

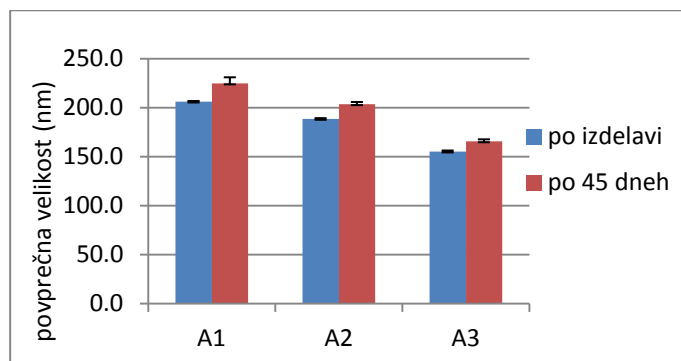
modificirani metodi ugotovili, da se s povečevanjem volumna lipofilne faze povprečna velikost delcev zmanjšuje; izjema je le vzorec, kjer smo dodali največji volumen lipofilne faze.

**Preglednica VIII: Vpliv volumna lipofilne faze na povprečno velikost, PDI, organoleptične lastnosti in fluorescenco MND, ki smo jih pripravili z modificirano emulzijsko metodo z odparevanjem topila.**

V <sub>(lipofilne faze)</sub> (μL)	d (nm)	PDI	Organoleptične lastnosti	Fluorescenca
75	332,6 ± 10,5	0,33 ± 0,04	Svetlo rjave disperzije, sedimentacija rjavih delcev.	Delci intenzivno fluorescirajo, ampak se držijo skupaj.
150	237,6 ± 1,0	0,22 ± 0,01	Rjave disperzije, sedimentacija rjavih delcev.	Intenzivno fluorescirajo, vidno je več delcev kot prej.
300	232,7 ± 1,6	0,19 ± 0,01	Rjava barva disperzije, sedimentacija rjavih delcev.	Delci intenzivno fluorescirajo, ampak se držijo skupaj.
450	207,8 ± 1,8	0,20 ± 0,02	Temno rjave disperzije, opazno je izpadanje delcev.	Delci intenzivno fluorescirajo, ampak se držijo skupaj.
600	242,5 ± 1,6	0,19 ± 0,01	Zelo temno rjave disperzije, vidni so zelo veliki delci, ki sedimentirajo.	Delci intenzivno fluorescirajo, ampak se držijo skupaj.

#### 4.1.4.4 Fizikalna stabilnost vzorcev pMND v daljšem časovnem obdobju

Vzorci pMND, ki so vsebovali 50 mg PLGA in 50 mg SPION-ov in smo jih izdelali z osnovno emulzijsko metodo z odparevanjem topila, smo vizualno pregledali po 45 dneh od dneva izdelave. Na dnu vsebnika je bil prisoten sediment, ki smo ga z rahlim stresanjem brez težave redispergirali in izmerili povprečno velikost delcev v vzorcu, kar prikazuje slika 37.



**Slika 37: Primerjava povprečne velikosti delcev v treh paralelnih vzorcih takoj po izdelavi in 45 dni po izdelavi.**

Ugotovili smo, da se povprečna velikost pMND ni bistveno spremenila (rahlo se je povečala tj. za ~ 20 nm), kar pa pomeni, da je stabilnost vzorcev zadovoljiva, saj se povprečna velikost ni povečala nad 250 nm, kar je tudi bil naš cilj.

#### 4.1.4.5 Izdelava vzorcev MND za poskuse na celicah

Za *in vitro* poskuse na celični liniji smo se odločili pripraviti sedem vzorcev pMND, ki so vsebovali 50 mg PLGA in 5 mg SPION-ov (preglednica IX). S takšnim razmerjem med PLGA in SPION-i smo dobili dobro odzivnost pMND na zunanje magnetno polje, hkrati pa je vgrajeno fluorescenčno barvilo (Nile rdeče) intenzivno fluoresciralo in pMND so bili dobro vidni pod fluorescenčnim mikroskopom. pMND so bili stabilni in se niso združevali v večje aglomerate. Priprava je potekala s 75  $\mu$ L lipofilne faze in 500  $\mu$ L vodne faze s 5 % (m/V) PVA.

Preglednica IX: Velikost in PDI MND v sedmih paralelnih vzorcih.

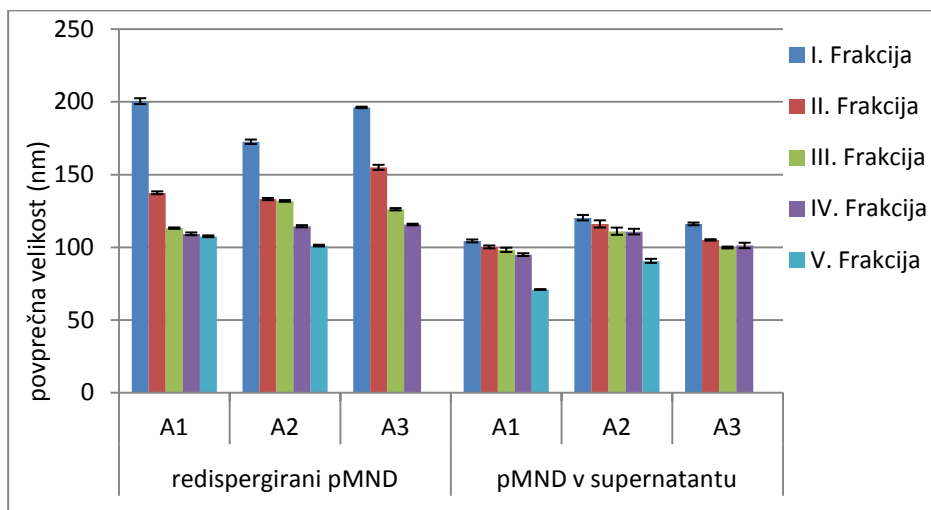
	d (nm)	PDI
Vzorec A <sub>1</sub>	193,0 $\pm$ 3,0	0,17 $\pm$ 0,02
Vzorec A <sub>2</sub>	185,1 $\pm$ 1,4	0,12 $\pm$ 0,01
Vzorec A <sub>3</sub>	182,2 $\pm$ 1,6	0,11 $\pm$ 0,01
Vzorec A <sub>4</sub>	185,8 $\pm$ 2,5	0,16 $\pm$ 0,02
Vzorec A <sub>5</sub>	182,9 $\pm$ 2,1	0,16 $\pm$ 0,02
Vzorec A <sub>6</sub>	200,1 $\pm$ 2,2	0,18 $\pm$ 0,02
Vzorec A <sub>7</sub>	206,0 $\pm$ 1,1	0,14 $\pm$ 0,01

Vse disperzije pMND so bile svetlo rjavo-oranžne barve, transparentne in stabilne. Povprečna velikost pMND vseh izdelanih vzorcev je bila 190,7  $\pm$  9,3 nm, povprečne velikosti delcev v posameznih vzorcih pa so bile med seboj primerljive. Podobno je bilo s porazdelitvijo velikosti. Povprečen PDI vseh vzorcev je bil 0,18  $\pm$  0,01. Kot kaže, je metoda izdelave ponovljiva in z njo lahko pripravimo pMND želene velikosti.

#### 4.1.5 Čiščenje disperzije pMND v magnetnem polju

S čiščenjem v magnetnem polju smo odstranili presežni stabilizator in se znebili nemagnetnih ND ter vzorec skoncentrirali. Postopek čiščenja smo spremljali z vmesnim merjenjem velikosti delcev v posameznih frakcijah čiščenja. Časovni interval čiščenja je bil 1 h. Magnet je iz disperzije pritegnil pMND, ki so se združili ob steni vsebnika v večje skupke, ki smo jih z uporabo ultrazvočne kadičke lahko redispergirali, kljub temu pa je

bila povprečna velikost v vseh redispergiranih frakcijah po čiščenju za ~ 50 nm večja kot povprečna velikost delcev pred čiščenjem. Povprečna velikost se v zaporednih frakcijah čiščenja zmanjšuje (slika 38), saj so najbolj odzivni na magnetno polje, ki ga ustvarimo z magnetom, največji pMND v disperziji. Tudi vsaka posamezna frakcija vsebuje večje pMND kot vzorec takoj po izdelavi. Prva frakcija je vsebovala največje delce, kar je tudi razumljivo. Magnet potegne najprej tiste delce, ki imajo več SPION-ov v svoji strukturi. PDI prve frakcije čiščenja je največji, torej je ta frakcija glede na velikost najmanj homogena, nato pa se z vsako naslednjo frakcijo PDI zmanjšuje, torej postajajo vzorci vse bolj monodisperzni. Spreminjanje velikosti delcev med čiščenjem vzorcev v magnetnem polju prikazuje slika 38. pMND smo pripravili iz 50 mg PLGA in 50 mg SPION-ov v treh paralelkah (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>).



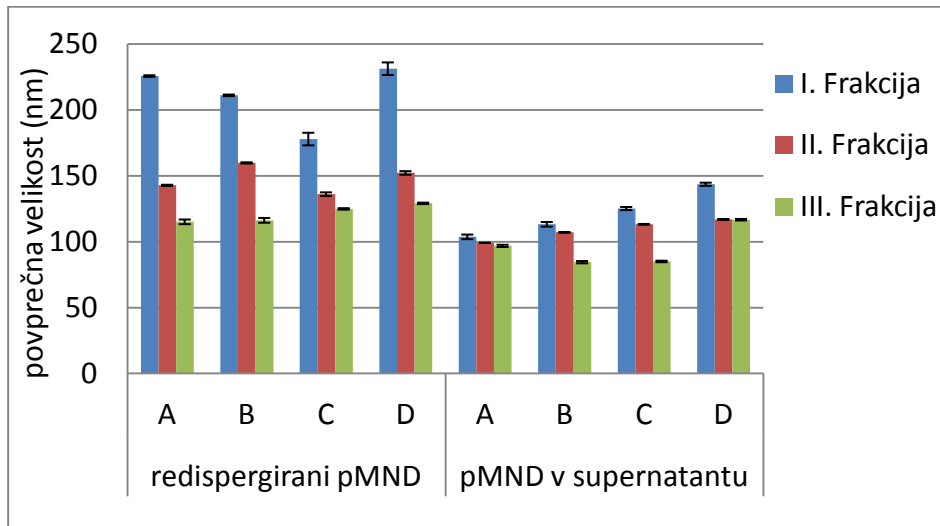
Slika 38: Poprečna velikost pMND po čiščenju v magnetnem polju in delcev v supernatantu. Sestava pMND: 50 mg PLGA in 50 mg SPION-ov. Čiščenje smo izvajali v 1 h intervalih.

#### 4.1.5.1 Vpliv vsebnosti SPION-ov na velikost pMND v posameznih frakcijah čiščenja

Preverili smo vpliv vsebnosti SPION-ov v pMND na čiščenje vzorca v magnetnem polju. Razmerja PLGA in SPION-ov v vzorcih so podana v preglednici X, povprečna velikost delcev v posameznih frakcijah pa na sliki 39.

Preglednica X: Sestava pMND in njihova velikost ter PDI pred čiščenjem.

	m <sub>(PLGA)</sub> (mg)	m <sub>(SPION-ov)</sub> (mg)	d(nm) pred čiščenjem	PDI pred čiščenjem
Vzorec A	50	50	191,0 ± 1,5	0,08 ± 0,01
Vzorec B	25	25	205,6 ± 0,5	0,09 ± 0,01
Vzorec C	35	15	173,4 ± 1,2	0,11 ± 0,02
Vzorec D	40	10	168,1 ± 0,7	0,16 ± 0,02

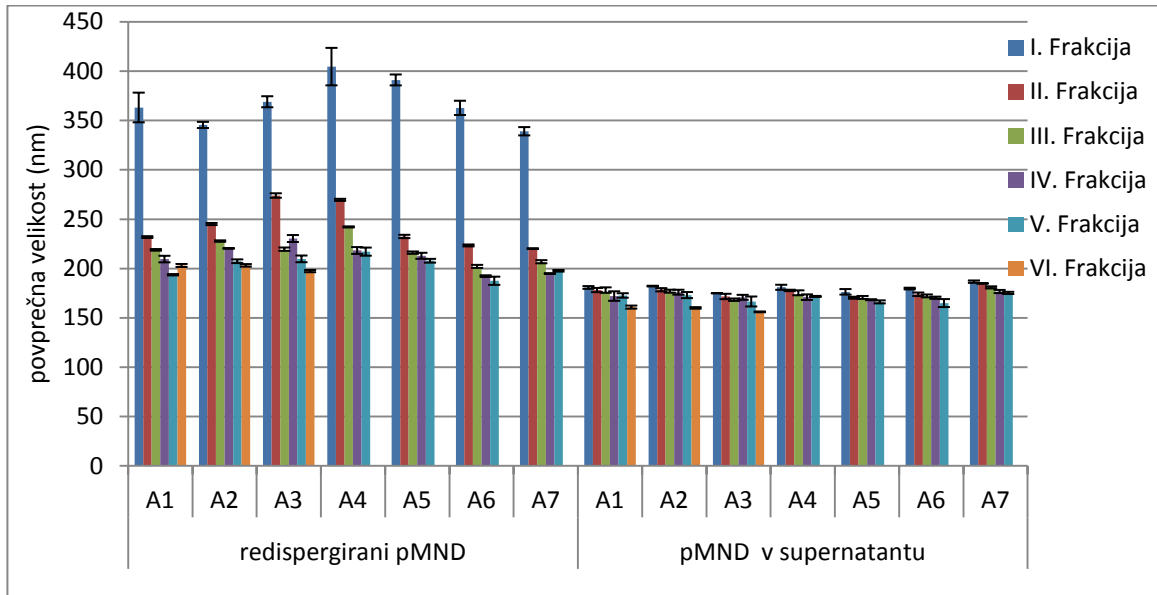


Slika 39: Povprečna velikost pMND v posameznih frakcijah čiščenja in v supernatantu vzorcev z različno sestavo pMND.

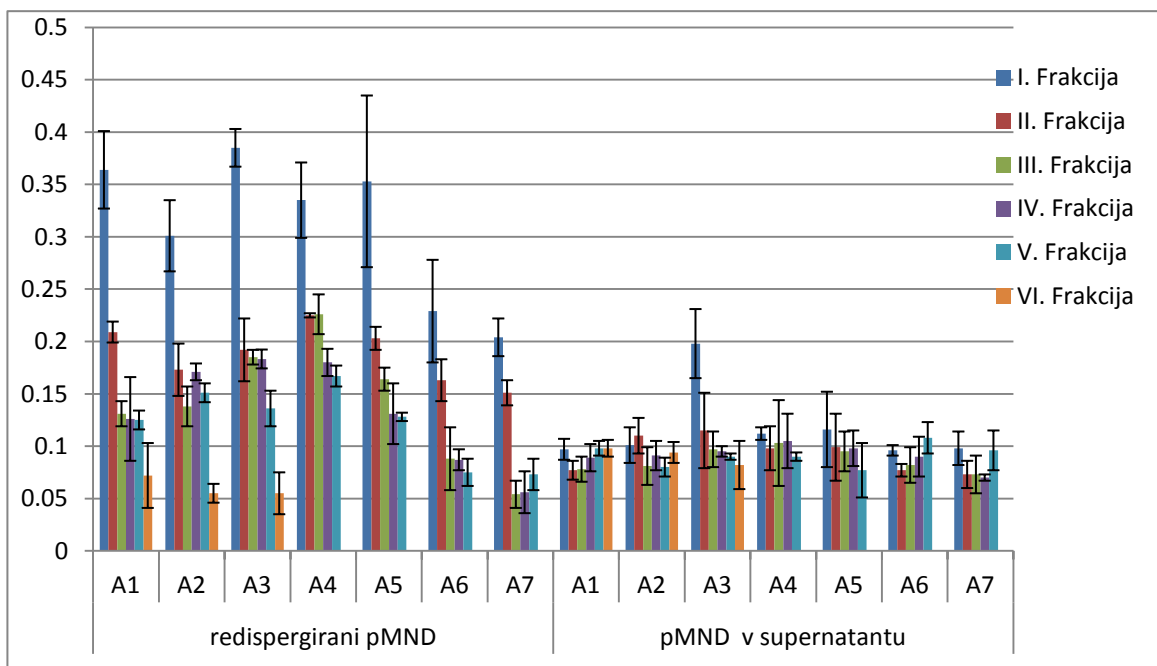
Ugotovili smo, da se povprečna velikost delcev tako v redispergiranih očiščenih frakcijah kot v supernatantu s časom čiščenja zmanjšuje, kar je bilo pričakovano (slika 39). V vseh vzorcih je v posameznih redispergiranih frakcijah velikost delcev večja od velikosti delcev, ki ostanejo v supernatantu. pMND, ki so bolj magnetni, prej pritegnemo z magnetom in se zato nahajajo v zgodnejših frakcijah čiščenja. Tako je povprečna velikost delcev, ki ostanejo v supernatantu v primeru pMND z večjo vsebnostjo SPION-ov manjša (vzorec A) kot povprečna velikost v primeru pMND z manjšo vsebnostjo SPION-ov (vzorec D) (slika 39). Tako lahko zaključimo, da vsebnost SPION-ov v pMND vpliva na čiščenje vzorca v magnetnem polju. Čim večja je vsebnost SPION-ov, bolj so delci magnetni in prej jih magnet pritegne.

#### 4.1.5.2 Čiščenje vzorcev pMND za poskuse na celicah

Na sliki 40 so prikazane velikosti pMND posameznih frakcij čiščenja; tako velikosti redispergiranih delcev kot tudi delcev, ki so ostali v supernatantu. Rezultati kažejo, da je postopek čiščenja vzorcev v magnetnem polju dobro ponovljiv. Velikost delcev v zaporednih frakcijah pada, hkrati pa med čiščenjem ne pride do nastanka ireverzibilnih agregatov. Iz slike 41, ki prikazuje spreminjanje PDI v postopku čiščenja, opazimo, da pri redispergiranih pMND PDI sledi trendu spreminjanja povprečne velikosti pMND, medtem ko za pMND v supernatantu tega ne moremo trditi.



Slika 40: Povprečna velikost MND v posameznih frakcijah čiščenja paralelnih vzorcev.



Slika 41: PDI pMND v posameznih frakcijah čiščenja paralelnih vzorcev.

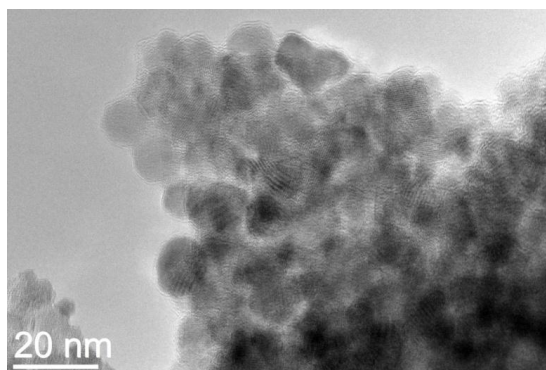
Enake frakcije posameznih vzorcev (npr. vse I. frakcije) smo združili in pomerili skupno povprečno velikost pMND v združenem vzorcu (rezultati so prikazani v preglednici XI).

**Preglednica XI: Povprečna velikost in PDI pMND v posameznih očiščenih frakcijah.**

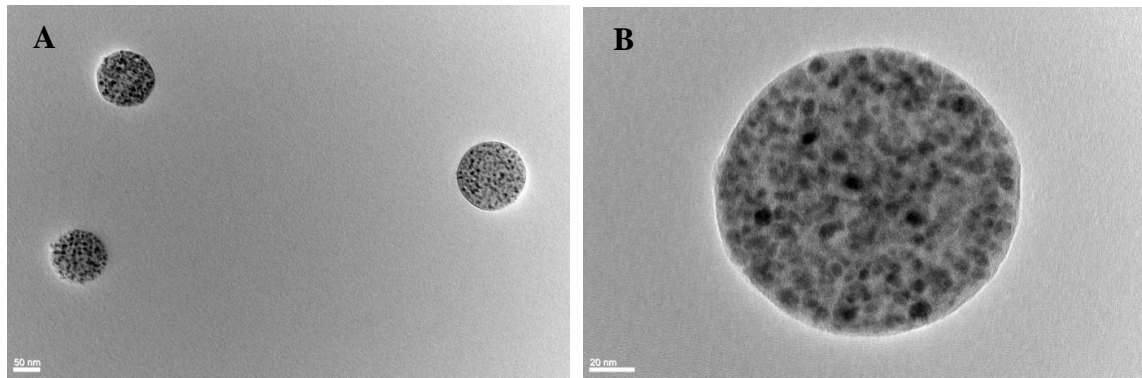
	<b>d (nm)</b>	<b>PDI</b>
I. Frakcija	339,3 ± 0,9	0,35 ± 0,03
II. Frakcija	228,4 ± 1,6	0,24 ± 0,03
III. Frakcija	208,2 ± 0,8	0,17 ± 0,01
IV. Frakcija	198,8 ± 3,5	0,18 ± 0,05
V. Frakcija	183,8 ± 2,9	0,10 ± 0,04
VI. Frakcija	185,5 ± 4,7	0,15 ± 0,05

#### **4.1.6 TEM mikroskopija SPION-ov in polimernih MND**

S presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) smo najprej vrednotili SPION-e obložene z ricinolejsko kislino in ugotovili, da je njihova povprečna velikost manjša od 10 nm (slika 42). Nato smo s TEM vrednotili še obliko in velikost izdelanih pMND ter porazdelitev SPION-ov znotraj polimernega ogrodja. TEM omogoča podroben vpogled v strukturo vzorca in vrednotenje uspešnosti vgrajevanja SPION-ov. Ugotovili smo, da imajo izdelani magnetni polimerni ND pravilno kroglasto obliko in velikost dokaj primerljivo s podatki meritev fotonske korelacijske spektroskopije (slika 43). Razlika med TEM analizo velikosti in PCS meritvijo je, da smo v primeru TEM mikroskopije ovrednotili le nekaj posameznih delcev, medtem ko PCS analiza temelji na meritvi povprečne velikosti populacije delcev v vzorcu. Notranjost MND je na videz zrnata zaradi bolj ali manj homogene porazdelitve SPION-ov znotraj polimernega ogrodja. Nevgrajenih SPION-ov v vzorcu v magnetnem polju očiščenih pMND nismo opazili.



**Slika 42: SPION-i obloženi z ricinolejsko kislino posneti s TEM mikroskopijo.**



**Slika 43:** V magnetnem polju očiščeni PLGA ND z vgrajenimi SPION-i (sestava vzorca: 50 mg PLGA + 5 mg SPION-ov) posneti s TEM mikroskopijo pri manjši (A) in večji (B) povečavi.

Prisotnost SPION-ov v polimernem ogrodju je ključna za magnetne lastnosti polimernih ND in za potencialno magnetno vodenje takšnih pMND v organizmu. Če med izdelavo nastanejo ND brez SPION-ov, se tak dostavni sistem ne bo odzival na zunanje magnetno polje in bo posledično po vnosu v organizem lahko vzrok za pojav neželenih stranskih učinkov. Učinkovitost zdravljenja bo torej manjša in verjeten bo pojav stranskih učinkov zaradi porazdeljevanja nemagnetnega nanodostavnega sistema v netarčnem tkivu. Odsotnost nevgrajenih SPION-ov dokazuje, da je bilo vgrajevanje SPION-ov v polimerne delce učinkovito. Prisotnost nevgrajenih SPION-ov v vzorcu lahko po vnosu v organizem povzroči neželene učinke. Zaradi hidrofobne površine pride po vnosu v organizem do opsonizacije prostih SPION-ov, nato do fagocitoze v fagocitne celice in razgradnje delcev železovega oksida do železovih ionov. Če je količina tako nastalih železovih ionov velika, lahko vodi v porušenje ravnovesja železovih ionov v organizmu (44).

#### **4.1.7 Oblaganje pMND s hitosanom**

PLGA ND z vgrajenimi SPION-i imajo po izdelavi negativen naboj na površini (preglednica XII), zato lahko na njihovo površino elektrostatsko vežemo hitosan, ki je polikation. Na ta način pMND obložimo s hitosanom. Oba vzorca, ki smo ju obložili s hitosanom, sta vsebovala 50 mg PLGA in 5 mg SPION-ov. Z oblaganjem pMND se velikost, PDI in zeta potencial delcev poveča (preglednica XII). Uspešnost oblaganja dokazuje sprememba naboja na površini pMND in povečanje absolutne vrednosti zeta potenciala delcev. Pozitivni naboj na površini pMND glede na literaturne podatke poveča interakcije s površino membran celic, ki je negativno nabita, in tako izboljša vstop pMND v celice.



**Preglednica XII: Velikost , PDI in zeta potencial pMND pred in po oblaganju s hitosanom.**

		Pred oblaganjem	Po oblaganju
Vzorec A <sub>1</sub>	d (nm)	170,5 ± 1,3	238,8 ± 6,8
	PDI	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,02
	ZP (mV)	-18,7 ± 0,1	44,7 ± 0,5
Vzorec A <sub>2</sub>	d (nm)	186,6 ± 1,3	229,5 ± 3,0
	PDI	0,17 ± 0,01	0,37 ± 0,03
	ZP (mV)	-17,9 ± 1,1	53,2 ± 1,7

#### 4.1.8 Liofilizacija disperzije pMND

Z liofilizacijo smo določali suho maso vzorca (posredno masno koncentracijo disperzije pMND) in hkrati ugotavljali, ali lahko liofilizirane pMND redispergiramo. Redispergiranje liofilizata je bilo neuspešno, saj so hidrofobni pMND kljub uporabi ultrazvočne kadičke v postopku dispergiranja ostali združeni v agregate. To smo potrdili tudi z merjenjem velikosti delcev s fotonsko korelacijsko mikroskopijo, kjer je bila povprečna velikost prve meritve ~ 4000 nm, nato pa je v nadaljnjih meritvah velikost padala, saj so večji delci sedimentirali na dno kivete. V postopku liofilizacije nismo uporabljali krio/lioprotektantov, kar je bil verjetno glavni razlog, da so nastali v postopku sušenja agregati. S postopkom liofilizacije pa smo dobili podatek o masi pMND v 1 mL vzorca posamezne frakcije, torej podatek o masni koncentraciji. Masno koncentracijo pMND vzorcev smo potrebovali za pripravo vzorcev za vrednotenje pMND na celični liniji. V preglednici XIII so prikazane masne koncentracije pMND v vsaki frakciji čiščenja, povprečne velikosti MND in PDI posameznih frakcij.

**Preglednica XIII: Povprečna velikost, PDI in masna koncentracija pMND v posameznih očiščenih frakcijah.**

	d (nm)	PDI	c (mg/mL)
I. Frakcija	339,3 ± 0,9	0,35 ± 0,03	0,82
II. Frakcija	228,4 ± 1,6	0,24 ± 0,03	0,57
III. Frakcija	208,2 ± 0,8	0,17 ± 0,01	0,64
IV. Frakcija	198,8 ± 3,5	0,18 ± 0,05	0,52
V. Frakcija	183,8 ± 2,9	0,10 ± 0,04	0,58
VI. Frakcija	185,5 ± 4,7	0,15 ± 0,05	1,36

Največji delci so bili najbolj odzivni na zunanje magnetno polje, zato jih je magnet najprej pritegnil iz disperzije in so se zbrali v I. frakciji. Zato je povprečna velikost delcev v tej frakciji največja, največja pa je tudi masna koncentracija te frakcije v primerjavi z ostalimi frakcijami, ki smo jih dobili v enournih časovnih intervalih čiščenja. V vsaki naslednji

frakciji so imeli zbrani pMND manjšo povprečno velikost in so bili hkrati bolj monodisperzni (manjši PDI). V VI. frakciji so zbrani pMND, ki so se zbrali na magnetu v daljšem časovnem intervalu (tj. čez noč). Ker je bil vzorec najdaljši čas izpostavljen magnetnemu polju, se je v tej frakciji zbrala največja masa pMND. Glede na fluorescenco so prve frakcije fluorescirale bolj intenzivno, pri čemer je bila I. frakcija najbolj vidna pod mikroskopom. Razlog je verjetno velikost delcev v frakcijah, ki se zmanjšuje in so zato le-ti manj vidni pod mikroskopom.

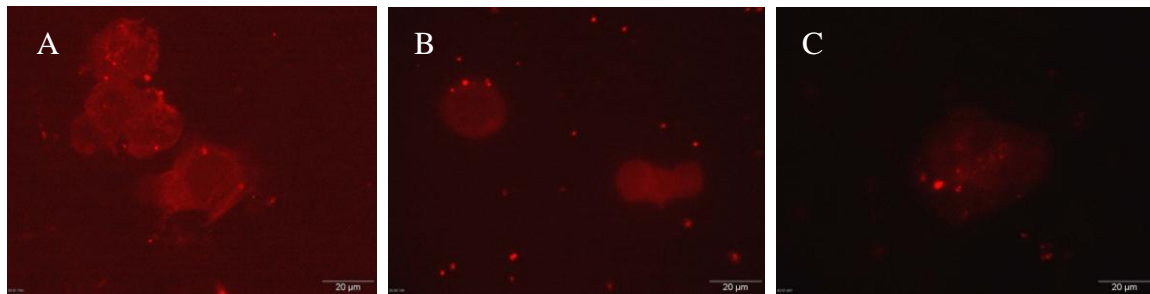
## **4.2 In vitro vrednotenje celičnega odziva**

Po izdelavi polimernih ND z vgrajenimi SPION-i smo le-te *in vitro* ovrednotiti na celični liniji. Ugotavljali smo, ali pMND vplivajo na metabolno aktivnost in morfologijo celic ali vstopajo v celice, kaj se po vstopu v celici zgodi tj. kam se pMND v celici nalagajo in ali povzročijo morfološke spremembe v sami celici. Za potencialno *in vivo* uporabo pMND je pomembno, da so pMND varni. Poleg vpliva samih pMND na celice, smo ugotavljali tudi njihov vpliv na celice v prisotnosti zunanjega magnetnega polja. Za ugotavljanje celičnega odziva izdelanih polimernih ND z vgrajenimi SPION-i smo uporabili celično linijo hormonsko odvisnega raka dojk, celice T-47D.

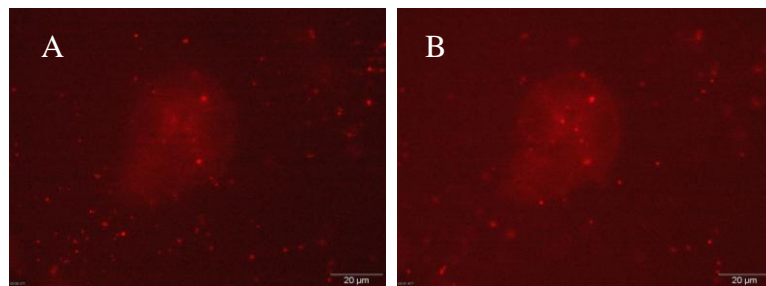
### **4.2.1 Spremljanje vstopa pMND v celice s fluorescenčno mikroskopijo**

Ugotavljali smo, ali PLGA nanodelci z vgrajenimi SPION-i prehajajo v celice T-47D. V ta namen smo pripravili pMND z vgrajenim fluorescenčnim barvilom Nile rdeče, saj smo le fluorescenčno označene pMND lahko spremljali pod fluorescenčnim mikroskopom. Za poskuse smo uporabljali pMND s povprečno velikostjo  $339,3 \pm 0,9$  in  $208,2 \pm 0,8$  v končni koncentraciji na celicah  $50 \mu\text{g/mL}$  ali  $100 \mu\text{g/mL}$ . Ugotovili smo, da pMND vstopajo v celice v prisotnosti in odsotnosti zunanjega magnetnega polja in da ni bilo opazne razlike med testiranimi vzorci. Vendar smo znotraj celic opazili le majhno število pMND. Pričakovali bi, da daljši ali krajši čas inkubiranja v prisotnosti zunanjega magnetnega polja znatno povečata obseg prehajanja pMND v celice, a na podlagi slik posnetih s fluorescenčnim mikroskopom tega ne moremo potrditi. Reprezentativne slike vstopa pMND v celice so prikazane na slikah 44 in 45. Vidimo, da po 2 h v odsotnosti in prisotnosti magnetnega polja ne moremo potrditi znotrajceličnega privzema pMND, je pa nekaj delcev vidnih na površini celic. Po 24 h inkubacije izven magnetnega polja pa vidimo, da je v celicah kar nekaj internaliziranih MND (slika 44, C in slika 45). Slika 45

jasno kaže adsorpcijo hidrofnobnih MND na podlago (steklo) (slika 45, A) in prisotnost MND znotraj celic (slika 45, B).



Slika 44: Celice T47-D, ki so bile izpostavljene pMND v koncentraciji 100 µg/mL: (A) 2 h izven magnetnega polja; (B) 2 h v magnetnem polju; (C) 24 h v inkubatorju.

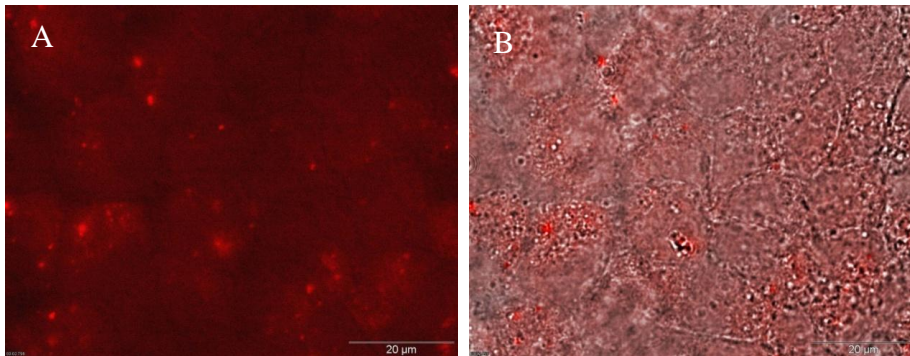


Slika 45: Celice T47-D, ki so bile izpostavljene MND 24 h v inkubatorju tj. brez prisotnosti magnetnega polja. Sliki A in B sta optični rezini celic, ki si sledita od podlage (A) navzgor (B).

Pri spremljanju vstopa pMND v celice s fluorescenčno mikroskopijo smo imeli težave z detekcijo. Pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni magnetnemu polju, smo opazili izrazito prisotnost pMND različnih velikosti (verjetno tudi agregati) zunaj celic. Magnet je pritegnil pMND iz medija na dno vdolbine polistirenske gojitvene plošče in, če pMND na poti niso naleteli na celice, so se adsorbirali na dno gojitvene plošče. Za razliko od teh vzorcev smo opazili pri vzorcih, ki smo jih inkubirali s pMND 2 h izven magnetnega polja, v mediju manj pMND, ki so bili na videz manjši. Na dno gojitvene vdolbine hitreje sedimentirajo večji delci, ki tudi slabše prehajajo skozi plazmalemo, manjši pa ostanejo dispergirani v rastnem mediju. V večini primerov so bili pMND v celicah slabo vidni, medtem ko so pMND zunaj celic močno fluorescirali. Čeprav smo v celicah opazili le majhno število pMND, ne moremo zaključiti, da pMND ne oz. slabo vstopajo v celice. Razlaga je lahko, da v celice vstopajo najprej manjši pMND, ki šibko fluorescirajo v primerjavi z večjimi pMND, zato jih v celicah vizualno ne zaznamo.

Na celični liniji smo ugotavljali tudi vpliv s hitosanom obloženih pMND (koncentracija 100 µg/mL), ki so imeli pozitiven naboj na površini (pozitivna vrednost zeta potenciala). Pričakovali smo, da bodo ti delci bolje vstopali v celice, zaradi elektrostatskih interakcij

med pozitivno nabitimi ND in negativno nabito površino celičnih membran. Vendar so bili rezultati podobni rezultatom vstopa neobloženih pMND. V celicah smo videli le majhno število pMND (slika 46). Spet je verjetno, da so v celice vstopili le manjši pMND, ki jih pri povečavi fluorescenčnega mikroskopa nismo zaznali.

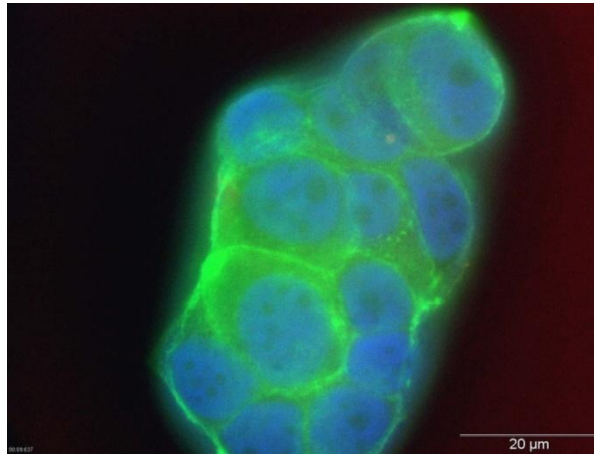


**Slika 46:** Celice T47-D, ki so bile izpostavljene MND v koncentraciji 100 µg/mL in smo jih inkubirali 24 h v inkubatorju in jih nato za 2 h izpostavili magnetnemu polju. (A) slika rdeče fluorescence (pMND); (B) združena slika rdeče fluorescence in transmisije.

Na podlagi rezultatov *in vitro* poskusov, ki smo jih opravili, lahko zaključimo, da je za vstop pMND v celice ugodno, če jih najprej 24 h inkubiramo v prisotnosti ND in nato za 2 h izpostavimo magnetnemu polju. V času 24 h inkubacije pMND v določenem obsegu že vstopijo v celice, ali pa vzpostavijo določen stik s celično membrano, ki igra pomembno vlogo pri internalizaciji ND. Opazili smo, da v preparatih, ki smo jih po dodatku pMND takoj izpostavili magnetnemu polju, ni izrazito povečanega vstopa pMND v celice v primerjavi s tistimi preparati, ki jih nismo izpostavili magnetnemu polju. Z magnetnim poljem, ki ga vzpostavimo z magnetom nameščenim neposredno pod gojitveno ploščo, pritegnemo pMND na spodnjo površino plošče, kjer so celice, ne pa tudi skozi plazmalemo v znotrajcelični prostor.

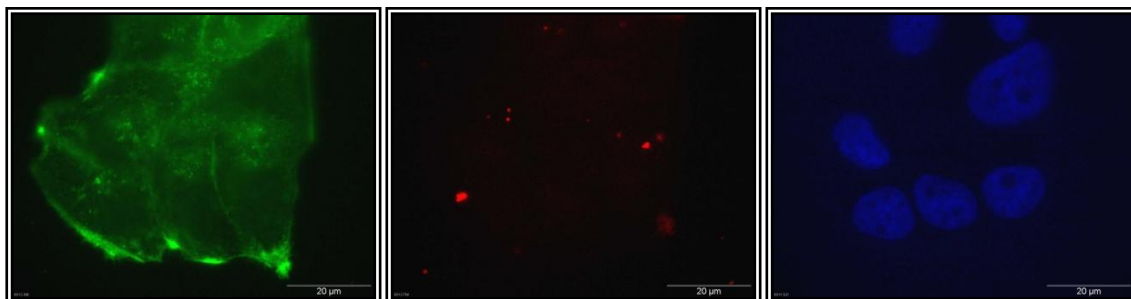
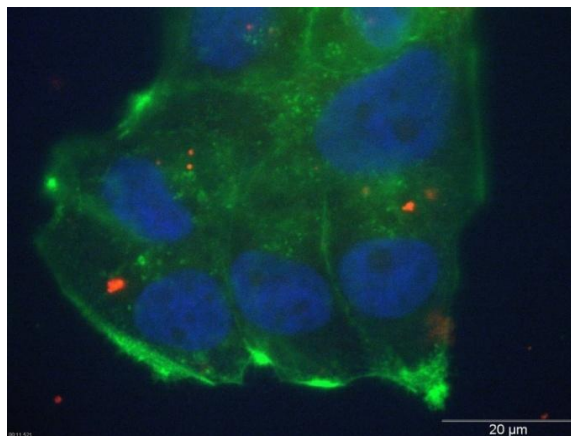
Na celičnih preparatih, kjer so fluorescirali le prisotni pMND, je bilo težko zanesljivo oceniti, ali se ND nahajajo v celicah in kje znotraj celic se nalagajo, zato smo pripravili preparate, kjer smo fluorescenčno obarvali tudi posamezne celične strukture (jedra in aktinske filamente). S fluorescenčnim barvanjem posameznih celičnih struktur smo omogočili boljši vpogled v znotrajcelični prostor. Slika 47 prikazuje kontrolo – to so celice T47-D, ki smo jih inkubirali pri normalnih pogojih brez pMND in izven magnetnega polja. Uporaba različnih fluorescenčnih barvil nam je omogočila jasno razlikovanje celičnih struktur: modro barvilo (Hoechst H33342) obarva jedra celic, zeleno

barvilo (Phalloidin-fluorescein) aktinske filamente in rdeče barvilo (Nile rdeče) PLGA ND.

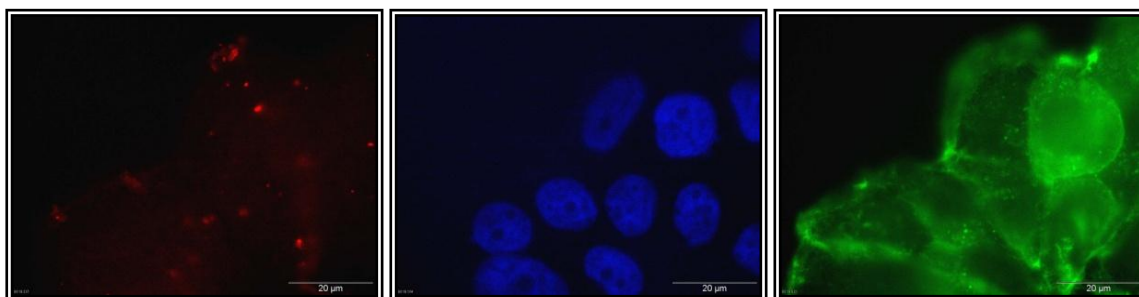
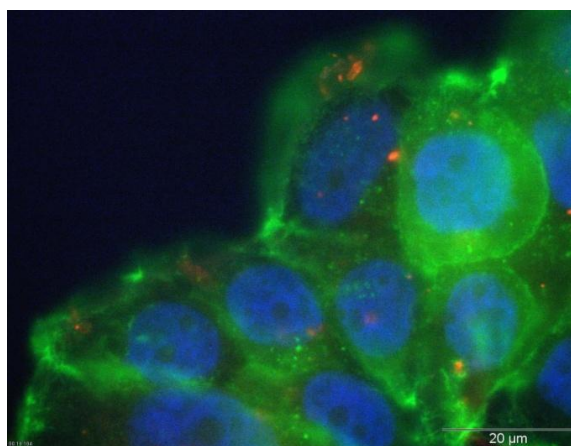


**Slika 47: Celice T47-D. Modro – jedra, zeleno-aktinski filamenti.**

Na sliki 48 je jasno vidno, da so polimerni MND vstopili v celice in se nahajajo na različnih mestih v znotrajceličnem prostoru (največ jih vidimo v citoplazmi, nekaj posameznih celo v jedru). Kljub vstopu pMND ni vidnih sprememb v morfologiji znotrajceličnih struktur. Videz jedra in aktinskih filamentov je primerljiv s kontrolnim vzorcem (slike 47, 48 in 49). PLGA MND so opazni tako v citosolu, kot tudi v jedru. Po pregledu vzorcev pMND pod mikroskopom nismo opazili agregatov. A vendar smo opazili, da so v celicah prisotni večji skupki pMND. Verjetno pride po vstopu pMND v celice do združevanja delcev in so zato znotraj celic vidni predvsem agregati pMND in ne posamezni delci. Podobnost lahko zasledimo pri makropinocitozi, kjer se delci združijo v agregate in se zlijejo s plazmalemo. V raziskavi na celicah pljučnega adenokarcinoma (celice A-549) so dokazali, da kationski MND v omenjene celice vstopajo z makropinocitozo (61). Za boljšo pojasnitev vstopa in znotrajcelične lokalizacije pMND, so potrebne še nadaljnje raziskave, npr. proučevanje vstopa pMND ob inhibiciji makropinocitoze ali ob inhibiciji receptorske endocitoze.



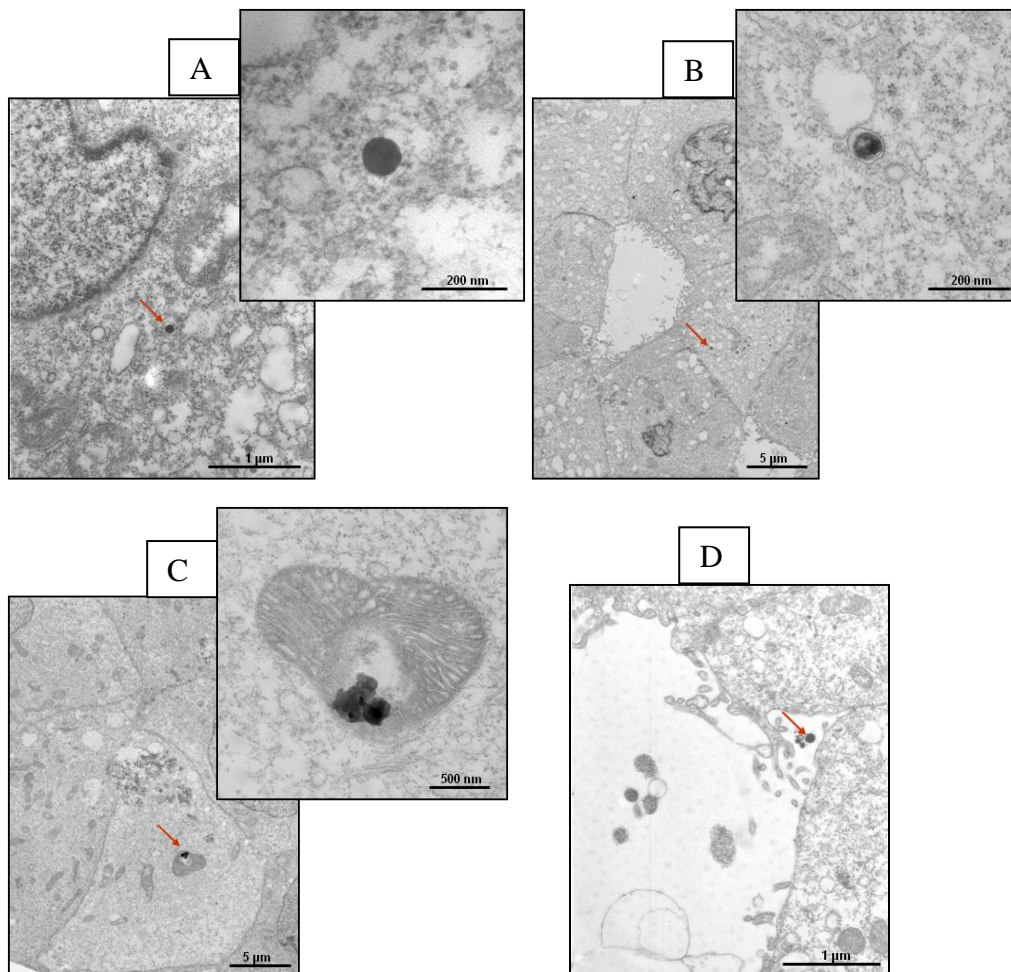
Slika 48: Celice T47-D, ki smo jih 24 h inkubirali v prisotnosti MND. Modro – jedra, rdeče – pMND in zeleno – aktin.



Slika 49: Celice T47-D, ki smo jih izpostavili 3 h magnetnemu polju v prisotnosti pMND. Modro – jedra, rdeče – pMND in zeleno – aktin.

### 4.2.3 Vrednotenje vstopa MND v celice s TEM in vpliv na morfologijo celic

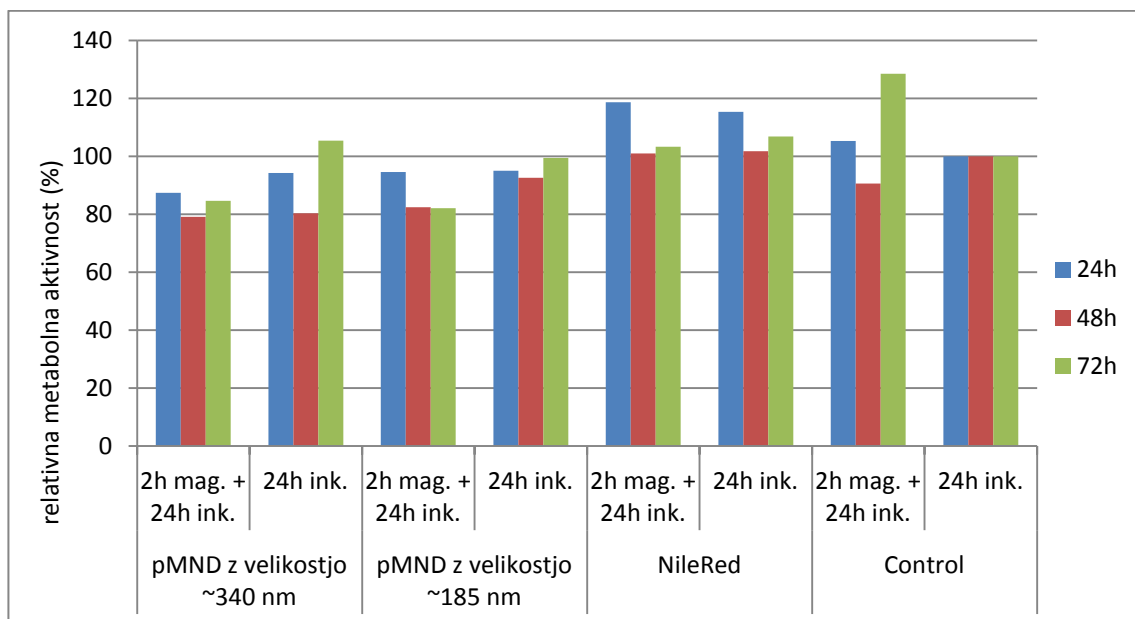
S TEM smo spremljali vstop pMND v celice T-47D. TEM omogoča vpogled v celice in s tem opazovanje mest kopičenja pMND v celicah. Pri pregledu preparatov celic T-47D smo potrdili znotrajcelični privzem pMND v celice, ki so bile izpostavljene pMND v prisotnosti ali odsotnosti magnetnega polja. Vendar je bilo opazno le malo število pMND znotraj celic. pMND smo zasledili tako v notranjosti membranskih veziklov (endosomov) kot tudi proste v citoplazmi (slika 50, A in B). V prisotnosti magnetnega polja pa smo opazili večje agregate pMND znotraj celic npr. v mitohondrijih (slika 50, C). Magnetno polje lahko povzroči nastajanje agregatov pMND in lokalizacijo pMND v znotrajceličnih strukturah, kjer jih nismo opazili brez vpliva zunanjega magnetnega polja. Ob vstopu v celice T-47D pMND niso povzročili signifikantnih sprememb v morfologiji celic, a vendar smo v preparatu opazili tudi nekaj apoptotičnih celic.



Slika 50: Notranja struktura celic T-47D izpostavljenih pMND; (A) prost pMND v citoplazmi pri manjši in večji povečavi; (B) pMND znotraj membranskega vezikla (endosoma); (C) večji agregat pMND v mitohondriju; (D) pMND zunaj celic.

#### 4.2.4 Vpliv pMND na metabolno aktivnost celic

Vpliv pMND na metabolno aktivnost celic smo ugotavljali z MTS testom. MTS reagent mitohondrijski encimi v metabolno aktivnih celicah reducirajo v rdeče obarvan produkt formazan, ki ga spektrofotometrično izmerimo. Količina nastalega produkta je sorazmerna številu živih celic v vzorcu. Ugotavljali smo vpliv samega fluorescenčnega barvila (Nile rdeče) v koncentraciji, ki je teoretično ekvivalentna koncentraciji barvila, ki ga v celično kulturo vnesemo s pMND ( $3,4 \times 10^{-5}$  mg/mL) ter vpliv pMND dveh različnih velikosti ( $339,3 \pm 0,9$  nm in  $185,5 \pm 4,7$  nm) pri koncentraciji 100 µg/mL. Metabolna aktivnost celic po izpostavitvi pMND je predstavljena na sliki 51. Podatki so prikazani relativno glede na metabolno aktivnost kontrolnih celic, ki niso bile izpostavljene pMND in ne magnetnemu polju.



Slika 51: Metabolna aktivnost celic po 24, 48 in 72 h inkubacije v prisotnosti/odsotnosti pMND.

Rezultati kažejo, da fluorescenčno barvilo, ki smo ga uporabili za označevanje pMND, Nile rdeče, ne vpliva negativno na metabolno aktivnost celic, saj je metabolna aktivnost v vseh časovnih točkah primerljiva ali celo večja od kontrole. Na podlagi tega lahko zaključimo, da Nile rdeče v koncentraciji, kot smo jo uporabili za izdelavo pMND, nima toksičnih učinkov na celice T47-D.

Po izpostavitvi celic vzorcem pMND smo ugotavljali tudi vpliv izpostavitve magnetnemu polju in časa inkubacije na metabolno aktivnost celic. Če primerjamo odziv vzorcev, ki so bili izpostavljeni magnetnemu polju, in vzorcev, ki niso bili izpostavljeni magnetnemu



polju, opazimo, da celice, ki so bile izpostavljene magnetnemu polju, izkazujejo nekoliko manjšo metabolno aktivnost in to v vseh testiranih časovnih točkah. Na podlagi tega lahko zaključimo, da je vpliv pMND na metabolno aktivnost celic večji, kadar jih usmerjamo z magnetnim poljem.

Primerjava relativne metabolne aktivnosti celic po 24 h izpostavitve pMND različnih velikosti kaže, da pri isti koncentraciji pMND večji pMND bolj vplivajo na metabolno aktivnost celic kot manjši. Po 48 in 72 h pa imajo pMND ne glede na velikost primerljiv učinek na metabolno aktivnost celic. Dobljen rezultat si lahko razložimo s poškodbo celične membrane, ki nastopi po izpostavitvi večjim delcem v primerjavi z manjšimi. Glede časa inkubacije, je zanimivo, da celice izpostavljene pMND po prvih 24 h izkazujejo določeno zmanjšanje metabolne aktivnosti, ki po 48 h še dodatno pade in nato spet naraste. Magnetno polje povzroči hitrejši stik pMND s celicami, zato celice, ki so bile izpostavljene pMND in magnetnemu polju izkazujejo po 48 h manjšo metabolno aktivnost kot celice, ki smo jih inkubirali s pMND brez magnetnega polja. Po 72 h metabolna aktivnost celic, ki so bile izpostavljene pMND, naraste, kar pomeni, da si celice v tem času »opomorejo« in v odsotnosti magnetnega polja spet vzpostavijo normalno metabolno aktivnost. Z izpostavitvijo celic pMND in magnetnemu polju celice obremenimo, vendar jih ne poškodujemo v takšni meri, da bi povzročili celično smrt. Celice si v določenem časovnem obdobju po izpostavitvi pMND opomorejo tako, da je metabolna aktivnost celic spet primerljiva ali celo večja kot pri kontroli. S tem smo dokazali, da je sam dostavni sistem varen oziroma, da je vpliv pMND na viabilnost celic majhen in reverzibilen. Brez magnetnega polja so pMND še manj vplivali na viabilnost celic, kar je ugodno pri uporabi *in vivo*, če pMND slučajno zaidejo v netarčna tkiva.

## 5 Sklep

Za izdelavo pMND z želenimi lastnostmi moramo izbrati ustrezno metodo izdelave. V našem raziskovalnem delu se je kot optimalna metoda za izdelavo pMND izkazala emulzijska metoda z odparevanjem topila. Ugotovili smo, da je optimalno razmerje med PLGA in SPION-i v pMND 10:1. S takšnim razmerjem smo dobili dobro odzivnost pMND na zunanje magnetno polje. pMND so bili stabilni in se niso združevali v večje agregate. Takšen delež SPION-ov v pMND ni vplival na fluorescenco vgrajenega fluorescenčnega barvila (Nile rdeče). Povprečna velikost optimizirane formulacije ND je bila  $190,7 \pm 2,0$  in PDI  $0,18 \pm 0,01$ . S TEM mikroskopijo smo potrdili, da so pMND glede na zgradbo nanosfere, kjer PLGA tvori ogrodje delcev v katerem so dispergirani SPION-i. Kot fluorescenčni označevalec smo vanje uspešno vgradili barvilo Nile rdeče s koncentracijo  $0,066 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Polimerni MND z vgrajenim barvilom Nile rdeče so pod elektronskim mikroskopom intenzivno rdeče fluorescirali.

Opazili smo, da na fluorescenco pMND vpliva vsebnost SPION-ov v pMND. Pri vzorcih z razmerjem PLGA:SPION-i = 1:1 je bila fluorescenca zelo šibka v primerjavi z vzorci z razmerjem PLGA:SPION-i = 1:10. Predvidevamo, da pride do interakcij med fluorescenčnim barvilom in SPION-i v delcih.

S čiščenjem vzorcev v magnetnem polju smo potrdili, da so vzorci z večjo vsebnostjo SPION-ov bolj odzivni na vplive zunanjega magnetnega polja. pMND, ki so imeli dovolj intenzivno fluorescenco (razmerje PLGA:SPION-i = 1:10), so vsebovali 9 % (m/m) SPION-ov, kar je dovolj za odzivnost delcev na vpliv zunanjega magnetnega polja.

Na celični liniji T-47D smo ugotavljali učinek pMND na celice. Ugotovili smo, da se MND znotraj celic nahajajo predvsem v obliki agregatov in ne kot posamezni pMND. Da bi vstop in znotrajcelično lokalizacijo MND lahko bolje pojasnili, so potrebne še nadaljnje raziskave.

Tudi s fluorescenčnim barvanjem celičnih struktur smo potrdili, da pMND vstopajo v celice, ob tem pa ne povzročajo bistvenih sprememb v morfologiji celic in znotrajceličnih struktur (jedra, aktinski filamentni).

Pričakovali smo večji vstop pMND v celice ob prisotnosti zunanjega magnetnega polja, saj magnet pritegne MND. Toda rezultati naših poskusov kažejo, da je za vstop pMND bolj ugodna daljša inkubacija izven magnetnega polja (24 h) kot kratkotrajna inkubacija v

magnetnem polju (2 h). Razlaga dobljenih rezultatov je, da v celice najprej vstopajo pMND, ki so manjši, ti pa hkrati tudi manj fluorescirajo, zato jih pod fluorescenčnim mikroskopom ne zaznamo. Torej, rezultat je slabša detekcija majhnih pMND v celicah zaradi močne fluorescence večjih pMND zunaj celic. Te poskuse bi bilo smiselno ponoviti s pMND, ki močneje fluorescirajo, ali med eksperimentom zagotoviti boljšo detekcijo pMND po vstopu v celice.

Pri pregledu preparatov celic T-47D s TEM smo potrdili znotrajcelični privzem pMND v celicah, ki so bile izpostavljene pMND v prisotnosti in odsotnosti magnetnega polja. Vendar je bilo znotraj celic opazno le malo število pMND. pMND smo zasledili tako v notranjosti membranskih veziklov (endosomov) kot tudi proste v citoplazmi, v prisotnosti magnetnega polja pa tudi npr. v mitohondrijih. Tudi s TEM smo opazili večje agregate pMND znotraj celic.

Nazadnje smo preverili, kako pMND vplivajo na metabolno aktivnost celic. Nile rdeče v koncentraciji, ki smo jo uporabili za izdelavo pMND ni izkazoval toksičnih učinkov na celice, kar potrjuje da je uporabljeno fluorescenčno barvilo *in vitro* varno. Metabolna aktivnost je bila manjša, če smo uporabili pMND z večjo povprečno velikostjo, kot pri uporabi pMND z manjšo povprečno velikostjo. Torej lahko zaključimo, da so za uporabo *in vivo* bolj primerni pMND z velikostjo pod 200 nm, ki manj vplivajo na metabolno aktivnost celic. Manjšo metabolno aktivnost smo prav tako opazili ob uporabi magnetnega polja. V odsotnosti magnetnega polja je bil vpliv pMND na metabolno aktivnost celic manjši. To je ugodno, saj pMND, ki zaidejo v netarčna tkiva, povzročajo manjšo škodo. Metabolna aktivnost, ki so jo izkazovale celice izpostavljene pMND, je po 24 h začela padati, po 48 h pa ponovno naraščati. Z izpostavitvijo pMND celice obremenimo, vendar je vpliv majhen in reverzibilen. Celice si opomorejo in ponovno vzpostavijo normalno metabolno aktivnost.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da so izdelani pMND obetaven dostavni sistem za nadaljnje raziskave in razvoj nanodostavnega sistema za ciljan vnos učinkovin pod vplivom zunanje magnetnega polja.

## 6 Literatura

1. Kreuter J. Nanoparticles--a historical perspective. *International journal of pharmaceutics*. 2007;331(1):1–10.
2. Kocbek P. Novosti na področju farmacevtske nanotehnologije. *Farmaceutski vestnik*. 2012;63:75–81.
3. Spletni vir: <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>.
4. Kristl J. Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil. *Farmaceutski vestnik*. 2012;63:67–73.
5. Cegnar M, Janez K. Nanozdravila. *Farmaceutski vestnik*. 2012;63(82-87).
6. Mirkovič B, Turn TL, Kos J, Kljub S. Nanotehnologija pri zdravljenju raka. 2010;:146–55.
7. Teskač K. Doktorska disertacija, Povezava med površinskimi lastnostmi nanodelcev, celičnim privzemom in biološkim odgovorom. 2011:
8. Matevž Č. Posebne lastnosti nanodelcev. 2007:
9. Plajnšek KT, Kocbek P, Kreft ME, Kristl J. Mehanizmi vstopa nanodelcev v celice in njihov vpliv na dostavljanje učinkovin and their effect on drug delivery. :225–35.
10. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2007;65(3):259–69.
11. Li Y, Wang J, Wientjes MG, Au JL-S. Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64(1):29–39.
12. W.G. Roberts GEP. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Research*. 57:765–72.
13. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;161(2):505–22.

14. Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2010;148(2):135–46.
15. Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, Kos J, Kristl J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2007;120(1-2):18–26.
16. Mahon E, Salvati A, Baldelli Bombelli F, Lynch I, Dawson K a. Designing the nanoparticle-biomolecule interface for “targeting and therapeutic delivery”. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2012;161(2):164–74.
17. Liechty WB, Peppas N a. Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft f ur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2012;80(2):241–6.
18. Janib SM, Moses AS, MacKay JA. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(11):1052–63.
19. Shubayev VI, Pisanic TR, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(6):467–77.
20. Plank C. Nanomedicine: Silence the target. *Nature nanotechnology*. 2009;4(9):544–5.
21. Mahmoudi M, Sant S, Wang B, Laurent S, Sen T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(1-2):24–46.
22. Hofmann-amtenbrink M, Hofmann H, Pully M, Pavillard CJ, Hospital E, Zurich VF. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. 2009:
23. Kubo T, Sugita T, Shimose S, Nitta Y, Ikuta Y, Murakami T. Targeted delivery of anticancer drugs with intravenously administered magnetic liposomes in osteosarcoma-bearing hamsters. *International journal of oncology*. 2000;17(2):309–15.
24. Mahmoudi M, Simchi a, Milani a S, Stroeve P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*. 2009;336(2):510–8.

25. Veiseh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(3):284–304.
26. Sun C, Lee JSH, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(11):1252–65.
27. Marjetka P. *Diplomska naloga, Izdelave in vrednotenje polimernih nanodelcev s superparamagnetnim železovim oksidom*. 2011:
28. Gyergyek Sašo. *Doktorska disertacija, Superparamagnetni nanokompoziti na osnovi nanodelcev superparamagnetnega železovega oksida in polimetil metakrilat*. 2010:
29. Uheida A, Salazar-Alvarez G, Björkman E, Yu Z, Muhammed M. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles for the adsorption of Co<sup>2+</sup> from aqueous solution. *Journal of colloid and interface science*. 2006;298(2):501–7.
30. Elias A, Tsourkas A. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2009;:720–6.
31. Cullity BD, Graham CD. *Introduction to Magnetic Materials (Google eBook)*. John Wiley & Sons. 2011: 568.
32. Suominen T, Raittila J, Salminen T, Schlesier K, Lindén J, Paturi P. Magnetic properties of fine SFMO particles: Superparamagnetism. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2007;309(2):278–84.
33. Yu F, Zhang L, Huang Y, Sun K, David AE, Yang VC. The magnetophoretic mobility and superparamagnetism of core-shell iron oxide nanoparticles with dual targeting and imaging functionality. *Biomaterials*. 2010;31(22):5842–8.
34. Desmarest C, Gadenne P, Nogue M, Sztern J, Naud C, Bontemps N, et al. Electromagnetic properties of superparamagnetic nanocomposites. 2000;279:177–80.
35. Xie J, Lee S, Chen X. Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(11):1064–79.
36. Mazzarino L, Travelet C, Ortega-Murillo S, Otsuka I, Pignot-Paintrand I, Lemos-Senna E, et al. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. *Journal of colloid and interface science*. 2012;370(1):58–66.

37. Acharya S, Sahoo SK. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(3):170–83.
38. Marjan V. Temelji imunologije. DZS, d.d. 2000:
39. K. Abbas A, H. Lichtman A. *Cellular and molekular immunology*. 2003:
40. Owens DE, Peppas N a. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2006;307(1):93–102.
41. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2008;69(1):1–9.
42. Wassel R a., Grady B, Kopke RD, Dormer KJ. Dispersion of super paramagnetic iron oxide nanoparticles in poly(d,l-lactide-co-glycolide) microparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007;292(2-3):125–30.
43. Vasir JK, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(8):718–28.
44. Soenen SJH, Himmelreich U, Nuytten N, De Cuyper M. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*. 2011;32(1):195–205.
45. Yu T, Hubbard D, Ray A, Ghandehari H. In vivo biodistribution and pharmacokinetics of silica nanoparticles as a function of geometry, porosity and surface characteristics. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;;1–9.
46. Botella P, Abasolo I, Fernández Y, Muniesa C, Miranda S, Quesada M, et al. Surface-modified silica nanoparticles for tumor-targeted delivery of camptothecin and its biological evaluation. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2011;156(2):246–57.
47. A.A. Burns, J. Vider, H. Ow, E. Herz, O. Penate-Medina, M. Baumgart, S.M. Larson, U. Wiesner MB. Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine. *Nano Lett.* 9. 2009;;442–8.
48. Silva AC, Oliveira TR, Mamani JB, Malheiros SMF, Malavolta L, Pavon LF, et al. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide

- nanoparticles in glioma treatment. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:591–603.
49. Christie M, Hassan NAP. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. 2000: 37–65.
  50. DeMerlis CC, Schoneker DR. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2003;41(3):319–26.
  51. Karjiban RA, Basri M, Rahman MBA, Salleh AB. Structural Properties of Nonionic Tween80 Micelle in Water Elucidated by Molecular Dynamics Simulation. *APCBEE Procedia*. 2012;3(May):287–97.
  52. Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. Chitin and chitosan : Chemistry , properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2004;63(January):20–31.
  53. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(1):3–11.
  54. Spletni vir: [http://www.coleparmer.com/Category/Ultrasonic\\_Processors/2244](http://www.coleparmer.com/Category/Ultrasonic_Processors/2244).
  55. Spletni vir: [http://www.ika.com/\\_appl-5.html](http://www.ika.com/_appl-5.html).
  56. Malvern Instruments Ltd. Zetasizer Nano Series User Manual. 2004;(1).
  57. Manuscript A. NIH Public Access. 2009;3(1):125–31.
  58. Pajk S, Pečar S. Synthesis of novel amphiphilic spin probes with the paramagnetic doxyl group in the polar region. *Tetrahedron*. 2009;65(3):659–65.
  59. PLGA ( Poly Lactic co-Glycolic Acid ) Uniform Dry Microspheres. 2012;1(800):18976.
  60. Manciulea A, Baker A, Lead JR. A fluorescence quenching study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with iron oxide nanoparticles. *Chemosphere*. 2009;76(8):1023–7.
  61. Cañete M, Soriano J, Villanueva A, Roca AG, Veintemillas S, Serna CJ, et al. The endocytic penetration mechanism of iron oxide magnetic nanoparticles with positively charged cover : A morphological approach. 2010;:533–9.