UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA IGLIČAR JAVORNIK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA IGLIČAR JAVORNIK

MODIFIKACIJA POVRŠINE SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV ŽELEZOVEGA OKSIDA Z METODO ADSORPCIJE POLIELEKTROLITOV

MODIFICATION OF IRON OXIDE NANOPARTICLE SURFACE WITH ADSORPTION OF POLYELECTROLYTES

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm. Vzorce SPION-ov so pripravili na Odseku za sintezo materialov Inštituta Jožef Stefan.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Petri Kocbek, mag. farm. za potrpežljivost, strokovne nasvete in vsestransko pomoč pri nastajanju magistrskega dela. Hvala tudi članom komisije za pregled magistrske naloge.

Najlepše se zahvaljujem tudi Anžetu, ki mi je vedno stal ob strani, me podpiral in vzpodbujal. Zahvaljujem se tudi prijateljem in družini, ker so verjeli vame.

Izjava

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

Petra Igličar Javornik

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Bogataj Član komisije: doc. dr. Jožko Cesar

VSEBINA

VSEBINA	ii
POVZETEK	Xv
ABSTRAC	Г vi
SEZNAM C	OKRAJŠAV vii
1. UVOD	1
1.1 Na	notehnologija in nanomedicina1
1.1.1	Nanodostavni sistemi in nanodelci1
1.1.2	Uporaba nanodostavnih sistemov2
1.2 Ma	ngnetni in superparamagnetni nanodelci
1.3 Suj	perparamagnetni nanodelci železovega oksida (SPION-i)5
1.3.1	Fizikalna stabilnost disperzij SPION-ov6
1.3.2	Fizikalne lastnosti SPION-ov7
1.3.3	Uporaba SPION-ov
1.3.4	Nanoteranostiki9
1.3.5	Obnašanje SPION-ov po vnosu v krvni obtok10
1.4 Mc	odifikacija površine SPION-ov z metodo plast za plastjo11
1.4.1	Osnovne značilnosti metode plast za plastjo11
1.4.2	Materiali in substrati primerni za oblaganje z LBL metodo13
1.4.3	Tehnološki parametri oblaganja13
1.4.4	Uporaba in prednosti LBL metode15
1.5 Vr	ednotenje velikosti in zeta potenciala koloidnih delcev16
1.5.1	Fotonska korelacijska spektroskopija16
1.5.2	Laserska doplerjeva elektroforeza16
2. NAME	N DELA

3.	MA	ATEI	RIALI IN METODE	19
3	8.1	Ma	teriali	19
3	8.2	Lab	ooratorijska oprema	22
3	8.3	ME	TODE	23
	3.3	.1	Priprava disperzije SPION-ov	23
	3.3	.2	Čiščenje disperzije SPION-ov v zunanjem magnetnem polju	23
	3.3	.3	Vpliv pH medija na velikost SPION-ov	24
	3.3	.4	Vpliv koncentracije soli na velikost SPION-ov	25
	3.3	.5	Adsorpcija PAA na površino SPION-ov	26
	3.3	.6	Adsorpcija hitosanijevega klorida na površino PAA-SPION-ov	26
	3.3	.7	Vpliv časa soniciranja na velikost SPION-ov po dodatku hitosanijevega klorida.	27
	3.3	.8	Optimizacija postopka: uporaba hitosana-NV in manjše koncentracije SPION-ov	v27
	3.3	.9	Postopek metode plast za plastjo (LBL)	28
	3.3	.10	Premreževanje s TPP po oblaganju s hitosanom-NV	30
	3.3	.11	Uporaba acetatnega pufra s pH 5	31
	3.3	.12	Vpliv ionske moči medija na fizikalno stabilnost disperzije obloženih SPION-ov	/ 31
3	8.4	Vre	ednotenje disperzije SPION-ov	32
	3.4	.1	Izgled disperzije	32
	3.4	.2	Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev	32
	3.4	.3	Naboj na površini delcev	33
4.	RE	ZUL	TATI IN RAZPRAVA	34
4	.1	Vpl	liv lastnosti medija na velikost SPION-ov v disperziji	34
4	.2	Obl	laganje SPION-ov po metodi plast za plastjo	37
	4.2	.1	1. plast: PAA	37
	4	4.2.1	.1 Vpliv koncentracije PAA	37

4.2.2	2. plast: hitosan
4.2.2	.1 Vpliv koncentracije hitosanijevega klorida
4.2.3	Vpliv časa soniciranja na velikost SPION-ov po dodatku 2. plasti tj. hitosanijevega
klorida	
4.2.4	Optimizacija postopka: uporaba hitosana-NV in bolj razredčenega vzorca SPION-
OV	
4.2.5	Vpliv nanašanja plasti PE na povprečno velikost, polidisperznost in ZP delcev42
4.2.6	Vpliv koncentracije hitosana-NV in način dodajanja 2. plasti PE na velikost
delcev.	
4.2.7	Vnliv redispergirania v kislem in v bazičnem mediju po posamezni fazi LBL
	· phi realspeignanja · kistem m · baztenem medija po posamezin tazi DDD
oblagaı	ija in vpliv časa inkubiranja na velikost delcev v disperziji
oblagan 4.2.8	nja in vpliv časa inkubiranja na velikost delcev v disperziji
oblagan 4.2.8 4.2.9	 vpliv redisperghanja v nistem in v oazienem medija po posanozim nazi 2022 nja in vpliv časa inkubiranja na velikost delcev v disperziji
oblagan 4.2.8 4.2.9 plastjo	 in vpliv ředisperghalja v histori in v odzielení medija po posanozní laží 2022 nja in vpliv časa inkubiranja na velikost delcev v disperziji
oblagan 4.2.8 4.2.9 plastjo SKLEF	 vpliv redisperghanja v nistem in v oazienem medija po posanozim nazi 2022 nja in vpliv časa inkubiranja na velikost delcev v disperziji

5.

6.

POVZETEK

Nanodelce z izraženimi magnetnimi lastnostmi na katere lahko vplivamo z magnetnim poljem tako, da jih spremljamo ali usmerjamo, imenujemo magnetni nanodelci. SPION-i so superparamagnetni nanodelci železovega oksida, ki so zelo zanimivi za uporabo v biomedicini tako za diagnostiko kot za ciljano dostavo zdravilnih učinkovin. Magnetni nanodelci za uporabo v biomedicini morajo biti karseda monodisperzni, netoksični in stabilni v fiziološkem okolju. V okviru magistrske naloge smo izbrali metodo plast za plastjo (angl. Layer By Layer, LBL) za modifikacijo površine SPION-ov. Le-ta je enostavna in z njo lahko ustvarimo ultra tanek sloj na površini delcev z natančno definirano debelino, sestavo in strukturo. Na površino delcev smo izmenično nanašali plasti anionskega (poliakrilna kislina) in kationskega (hitosan ali polialilamin) polielektrolita, ki sta se z elektrostatskimi interakcijami adsorbirala na površino delcev. Najprej smo izbrali pogoje za LBL oblaganje (koncentracija delcev, pH in ionska moč medija). Začetna povprečna velikost neobloženih SPION-ov v mediju s pH 4 je bila 197,3 \pm 2,6 nm, PI 0,126 \pm 0,009 in ZP 38,7 \pm 0,6 mV. Po vsakem koraku modifikacije površine delcev smo disperzijo SPION-ov organoleptično ocenili in s fotonsko korelacijsko spektroskopijo izmerili povprečno velikost in porazdelitev velikosti delcev ter z lasersko Dopplerjevo anemometrijo zeta potencial delcev. Metodo LBL oblaganja smo skušali optimizirati s spreminjanjem različnih parametrov kot so pH medija, čas inkubiranja pri nanosu plasti polielektrolita, koncentracija polielektrolita, čiščenje in redispergiranje med nanosom posameznih plasti, uporaba premreževalca natrijev tripolifosfat, uporaba druge vrste kationskega polielektrolita. Spremljali smo tudi vpliv soli na LBL oblaganje in časa soniciranja z UZ sondo. Ugotovili smo, da so SPION-i najbolj stabilni v mediju s pH 4. Z metodo LBL smo uspeli nanesti maksimalno 4 plasti obloge, pri čemer je bila najmanjša povprečna velikost delcev, ki smo jo dosegli po 4. plasti 405.7 ± 180.8 nm in polidisperzni indeks 0.553 ± 0.118 , kar kaže, da nam ni uspelo pripraviti homogenega in monodisperznega vzorca. Z meritvijo zeta potenciala smo dokazali, da se je 4. plast obloge uspešno adsorbirala. Zaključimo lahko, da je debelina LBL obloge močno odvisna od pH medija in izbire para kationskega in anionskega polielektrolita. Predpostavljamo, da povečanje debeline posamezne plasti nastopi zaradi prerazporeditve molekul polielektrolita in tvorbe polielektrolitnih kompleksov na površini delcev med samo adsorpcijo.

Ključne besede: magnetni nanodelci, SPION-i, polielektroliti, LBL metoda

ABSTRACT

Nanoparticles with expressed magnetic properties which can be monitored or guided by a magnetic field are called magnetic nanoparticles. Super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) show high potential in biomedical applications such as diagnostics and targeted drug delivery. Magnetic nanoparticles for biomedical applications should be monodisperse, non-toxic and stable in the physiological environment. In our research we have selected layer by layer (LBL) method for modification of SPION surface. It is easy to use and enable formation of ultrathin layers on the surface of nanoparticles with precisely defined thickness, composition and structure. On the surface of nanoparticles layers of anionic (polyacrylic acid) and cationic polyelectrolyte (chitosan or polyallylamine) have been sequentially adsorbed via electrostatic interactions. Firstly we have selected parameters of LBL coating (particle concentration, pH and ionic strength of the medium). Initial average size of uncoated SPIONs in medium with pH 4 was 197,3 \pm 2,6 nm, PI 0,126 \pm 0,009 and ZP 38,7 \pm 0,6 mV. After each step of surface modification dispersion of SPIONs was organoleptically evaluated, the average size and particle size distribution were measured with photon correlation spectroscopy and zeta potential was measured with laser Doppler anemometry. We have tried to optimize the LBL method with changes of various parameters such as pH of the medium, time of incubation during adsorption of polyelectrolyte layers, polyelectrolyte concentration, magnetic separation and rinsing between individual layer application, the addition of cross linker sodium tripolyphosphate and the use of different type of cationic polyelectrolyte. We monitored also the effect of salt on the LBL coating and sonication time with the ultrasound probe. SPIONs coated with LBL method were the most stable in medium with pH 4. We have successfully applied coating composed of 4 layers, where the minimum average particle size achieved was $405,7 \pm 180,8$ nm and polydisperse index 0.553 ± 0.118 . Results indicate that we did not manage to prepare a homogeneous and monodisperse sample. Zeta potential measurements have proven that the 4 layers coating was successfully adsorbed. It can be concluded that the thickness of coating strongly depends on the choice of the proper pH medium and a pair of cationic and anionic polyelectrolyte. We assume that the increase in thickness of the individual layers occurs due to rearrangement of polyelectrolyte molecules and formation of polyelectrolyte complexes on the surface of the particles during the adsorption.

Keywords: magnetic nanoparticles, SPIONs, polyelectrolytes, LBL method.

SEZNAM OKRAJŠAV

d povprečni premer delcev EPR učinek povečane prepustnosti in zadrževanja (angl. Enhanced Permeation and Retention effect) LBL plast za plastjo (angl. Layer By Layer) MND magnetni nanodelci MRI magnetno resonančno slikanje (angl. Magnetic Resonance Imaging) ND nanodelci PAA poliakrilna kislina PAH polialilamin klorid PCS fotonska korelacijska spektroskopija (angl. Photon Corellation Spectroscopy) PE polielektrolit PEG polietilenglikol PET pozitronska emisijska tomografija PI polidisperzni indeks RES retikuloendotelni sistem SEM vrstična elektronska mikroskopija SPION superparamagnetni nanodelec železovega oksida (angl. Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle) SSPIO standardni SPION-i SPECT enofotonska računalniška tomografija TEM transmisijska elektronska mikroskopija TPP natrijev tripolifosfat USPIO ultramajhni SPION-i UZ ultrazvok ZU zdravilna učinkovina ZP zeta potencial

1. UVOD

1.1 Nanotehnologija in nanomedicina

Nanotehnologija omogoča razvoj in uporabo sodobnih materialov, naprav in sistemov, ki imajo vsaj eno dimenzijo velikosti od 1 do 100 nm in posledično nove lastnosti, ki so odraz njihove nano velikosti (slika 1) (1). Nanomedicina pa predstavlja uporabo nanotehnologije na področju diagnosticiranja, zdravljenja in preprečevanja bolezni. Cilj nanomedicine je spremljanje, nadzorovanje, varovanje, izboljševanje in popravljanje bioloških sistemov na molekularnem nivoju z uporabo nanosistemov oz. nanozdravil z namenom, da bi dosegli željen klinični izid (1). Nanozdravila so torej vsa tista zdravila, ki so izdelana s pomočjo nanotehnoloških pristopov oz. temeljijo na uporabi nanodostavnih sistemov. Rezultat napredka na področju nanotehnologije in molekularne biologije je razvoj nanodostavnih sistemov s posebnimi funkcionalnimi lastnostmi, ki odpravljajo pomanjkljivosti klasičnih diagnostikov in terapevtikov za odkrivanje in zdravljenje bolezni. Na področju uporabe nanodelcev se razvija tehnologija tkivnega slikanja, ki omogoča vizualizacijo in diagnosticiranje določenih bolezni v najzgodnejših fazah; v nekaterih primerih celo pred klinični mastopom bolezni (2).



Slika 1: Primerjava velikosti nekaterih organskih molekul, bioloških makromolekul, organizmov ter predmetov z nanodostavnimi sistemi (prirejeno po (3)).

1.1.1 Nanodostavni sistemi in nanodelci

Nanodostavni sistemi so vsi tisti sistemi, ki jih v farmaciji uporabljamo za vnos zdravilnih učinkovin (ZU) in/ali diagnostikov in po velikosti sodijo v nanometrsko območje. Medtem ko so

nanodelci trdni delci nanometrske velikosti, ki se med seboj razlikujejo po materialu iz katerega so izdelani in področju uporabe. V najožjem pomenu so nanodelci le tisti delci, ki so manjši od 10-20 nm, saj so v tem velikostnem območju fizikalne lastnosti trdnih delcev najbolj spremenjene oz. pogojene z njihovo nanometrsko velikostjo (4). Največkrat uporabljamo definicijo po kateri med nanodelce uvrščamo delce velikosti od 1-100 nm, v širšem pomenu pa med nanodelce prištevamo vse delce velikosti od 1 nm do 1 µm (4). V farmaciji so nanodelci v ožjem pomenu dostavni sistemi ogrodnega tipa in koloidne velikosti, kar pomeni, da spadajo med nanodostavne sisteme. Nanodelci imajo svojevrstne fizikalno-kemijske lastnosti (izredna majhnost, velika specifična površina, visoka reaktivnost), elektronske, magnetne in optične lastnosti, zaradi česar so tudi njihove farmakokinetske lastnosti bistveno drugačne v primerjavi s sistemi iste sestave na makro in mikro nivoju (5, 6). Glede na kemijsko sestavo jih delimo na anorganske nanodelce, kot so npr. nanodelci železa, zlata, silicija, TiO₂, ZnO in organske nanodelce, kot so npr. polimerni nanodelci in trdni lipidni nanodelci (7). Nanodelci običajno niso monodisperzni okrogli delci nano velikosti, ampak je njihova oblika zelo različna. Pojavljajo se npr. v paličasti, trikotni, diskasti, igličasti, školjkasti obliki; vsaka od teh morfologij pa se odraža na specifičnih lastnostih samih delcev (6).

1.1.2 Uporaba nanodostavnih sistemov

Z uporabo nanodostavnih sistemov lahko dosežemo nadzorovano sproščanje ZU in ciljano dostavo učinkovin ali diagnostikov na težko dostopna mesta v organizmu. Nanodostavni sistemi, ki jih uporabljamo v biomedicini so npr. nanosuspenzije, liposomi, polimerni miceli, dendrimeri, anorganski, trdni lipidni in polimerni nanodelci, nanovlakna, kvantne pike in ogljikove nanocevke (1, 8). Med seboj se razlikujejo po zgradbi, lastnostih in namenu uporabe (9). Z uporabo nanodostavnih sistemov lahko dosežemo večjo topnost in biološko uporabnost učinkovin ter zmanjšanje stranskih učinkov, kar vodi v boljši klinični izid zdravljenja (5). Z zmanjševanjem velikosti delcev ZU se poveča površina stika z medijem in posledično se pospeši hitrost raztapljanja ZU in poveča njena topnost, če je velikost delcev dovolj majhna (< 100 nm). Tako lahko z uporabo nanodostavnih sistemov dosežemo enak ali celo večji terapevtski učinek z manjšim odmerkom zdravila. Z vključevanjem ZU v ogrodje nanodelca dosežemo nadzorovano sproščanje, kar lahko podaljša čas zadrževanja ZU v organizmu in tako potrebujemo manjše število odmerkov, saj je nanodelce bistveno večji v primerjavi s samo molekulo učinkovine in se zato iz organizma počasneje izloča (5, 8).

Zaradi majhne velikosti in velike sposobnosti prodiranja ter ciljanja težko dostopnih tarčnih mest so zanimivi za uporabo na različnih področjih v biomedicini kot so diagnostični testi za zgodnje odkrivanje bolezni, kot orodje za neinvazivno slikanje, v razvoju naprednih zdravil za ciljno dostavo, kar vodi v zmanjšanje sistemskih stranskih učinkov (5, 8). Zvezni žilni endotelij predstavlja primarno bariero za prehajanje nanodostavnih sistemov iz krvnega obtoka v okoliška tkiva. Prehajanje nanodostavnih sistemov skozi žilno steno je mogoče le v primeru povečane prepustnosti žilnega endotelija, ki je značilen za določena patološka stanja kot so vnetja in rakave spremembe tkiva (5). Raka spremlja pospešena angiogeneza tj. tvorba novega ožilja, ki ima nezvezen, fenestriran endotelij z velikostjo por med 380-780 nm. Skozi te vrzeli v žilni steni lahko prehajajo nanodostavni sistemi iz krvnega obtoka in se v tkivu kopičijo. Tak način ciljanja v tumorsko tkivo, ki temelji na izkoriščanju učinka povečane prepustnosti in zadrževanja (EPR učinek, angl. Enhanced Permeability and Retention effect) imenujemo pasivno ciljanje. Pri aktivnem ciljanju pa izkoriščamo specifične interakcije med ligandom, ki je vezan na površino nanodostavnega sistema, in receptorjem na tarčnem mestu (organ, tkivo, celica) (5). Po vezavi na receptor sledi bodisi sproščanje ZU v zunajcelični prostor ali pa privzem nanodostavnega sistema v celico in sproščanje ZU znotraj celice. Naboj in hidrofobnost/hidrofilnost nanodostavnega sistema bistveno vplivajo na porazdelitev nanodostavnega sistema v organizmu, tako da vplivajo na interakcije med ligandom in receptorjem. Površina nanodostavnega sistema mora biti hidrofilna in dostavni sistem mora ostati v krvnem obtoku dovolj časa, da doseže tarčno mesto in se tam zadrži toliko časa, da se izrazi farmakološki učinek. Hidrofobni in nabiti nanodostavni sistemi imajo kratek čas zadrževanja v krvnem obtoku zaradi adsorpcije plazemskih proteinov (opsonizacije), kar privede do prepoznavanja s strani retikuloendotelijskega sistema (RES), čemur sledi odstranitev iz krvnega obtoka (2, 10).

1.2 Magnetni in superparamagnetni nanodelci

Nanodelce z izraženimi magnetnimi lastnostmi, na katere lahko vplivamo z magnetnim poljem, imenujemo magnetni nanodelci (MND) (11). Magnetne lastnosti nanodelcev omogočajo, da jih spremljamo ali usmerjamo z uporabo zunanjega magnetnega polja. Uporabimo jih lahko v separacijskih procesih, v diagnostiki ali terapiji. Za uporabo v biomedicini pa morajo biti MND netoksični in imeti izražene specifične površinske lastnosti. Za medicinske namene običajno uporabljamo suspenzije MND v fiziološko sprejemljivem disperznem mediju na vodni osnovi, v katerem morajo ostati MND dispergirani. Najpogosteje uporabljamo nanodelce maghemita (γ - Fe₂O₃), ki je nestrupen, njegova površina pa je inertna. Za pripravo koloidnih suspenzij nanodelcev v nepolarnih organskih medijih, kar običajno uporabljamo v postopkih modifikacije površine s kovalentno vezavo različnih molekul, moramo površino MND prekriti s plastjo, ki bo omogočila učinkovito dispergiranje delcev v takšnem mediju (11, 12).

Superparamagnetizem je vrsta magnetizma, ki se pojavlja v primeru, ko so delci feromagnetnih ali ferimagnetnih materialov dovolj majhni (13). Skupni magnetni moment takšnega delca lahko predstavimo kot skupek magnetnih momentov posameznih atomov, ki delec sestavljajo. V superparamagnetnem delcu magnetni moment celotnega delca v odsotnosti zunanjega magnetnega polja prosto rotira pod vplivom termične energije. Če takšne delce izpostavimo magnetnemu polju, se spini znotraj materiala uredijo v smeri silnic magnetnega polja. Če jakost polja zmanjšujemo, spini ne ostanejo urejeni v skladu z magnetnim poljem, zato skupna magnetizacija pade, kar pomeni, da imajo delci izražene magnetne lastnosti le v zunanjega magnetnega polja. Feromagnetni materiali prisotnosti v nasprotju S superparamagnetnimi ohranijo magnetne lastnosti tudi v odsotnosti magnetnega polja (slika 2) (8).



Slika 2: Obnašanje feromagnetnih delcev in superparamagnetnih nanodelcev v prisotnosti in odsotnosti magnetnega polja (prirejeno po (13)).

Zunaj magnetnega polja superparamagnetni nanodelci ne kažejo spontane magnetne polarizacije in med njimi ni magnetnih interakcij, ki bi povzročale magnetno aglomeracijo (11). Superparamagnetni nanodelci velikosti od 60-150 nm se lahko pod določenimi pogoji združijo oz. agregirajo kadar so izpostavljeni zunanjemu magnetnemu polju (13). Superparamagnetni nanodelci s hidrodinamskim premerom manj kot ~50 nm so dovolj majhni, da zaradi Brownovega gibanja ostanejo v disperziji suspendirani. Ti delci se v prisotnosti magnetnega polja ne ločijo od disperznega medija, temveč se celotna disperzija odziva na prisotnost magnetnega polja. Takšno disperzijo imenujemo magnetna tekočina ali ferofluid (13). Superparamagnetni nanodelci so zelo zanimivi za uporabo v biomedicini, saj v disperziji niso podvrženi magnetnim interakcijam in so zato fizikalno stabilni (14).

Če magnetne domene izpostavimo izmeničnemu zunanjemu magnetnemu polju, se magnetni dipolni momenti odvisno od frekvence in jakosti magnetnega polja, velikosti delcev in temperature okolja zelo hitro preusmerjajo, kar vodi v lokalno segrevanje okolice, npr. tkiva, kar imenujemo magnetna hipertermija, ki jo lahko izkoriščamo pri zdravljenju raka (8).

1.3 Superparamagnetni nanodelci železovega oksida (SPION-i)

SPION-i (angl. *SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) so superparamagnetni nanodelci železovega oksida največkrat magnetita (Fe₃O₄), meghemita (γ -Fe₂O₃) ali hematita (α -Fe₂O₃) (15). Spadajo v skupino anorganskih nanodelcev in imajo jedro iz železovega oksida, ki je običajno prekrito bodisi s slojem anorganskega materiala (npr. silicijev dioksid, zlato) ali organskimi materiali (npr. fosfolipidi, maščobne kisline, polisaharidi, peptidi, površinsko aktivne snovi, polimeri) (8).

V literaturi SPION-e glede na njihovo hidrodinamsko velikost delimo v tri skupine:

- SPION-i z velikostjo 300 nm 3,5 μm,
- "standardni" SPION-i (SSPIO) z velikostjo 50 150 nm in
- ultra majhni SPION-i (USPIO), ki so manjši od 50 nm (15).

Za izdelavo SPION-ov uporabljamo različne metode, kot so koprecipitacija, mikroemulzijska metoda in metoda termičnega razkroja. Vsaka od naštetih metod ima svoje prednosti in slabosti (16). Pri koprecipitaciji uporabljamo železovo sol v prisotnosti fosforjevega nitrata in fosforjevega hidroksida. Rast kristalov za izdelavo željene velikosti SPION-ov mora biti nadzorovana. V procesu obarjanja delcev iz raztopine morata biti nukleacija in rast kristalov nadzorovana, da dobimo trdne delce želene velikosti. Najbolj pogosta metoda izdelave SPION-ov temelji na uporabi prebitka baze, ki jo dodamo k raztopini zmesi enakih količin železovih

ionov v fero (Fe^{2+}) in feri (Fe^{3+}) obliki v atmosferi brez kisika (17). Nanodelcem železovega oksida lahko modificiramo površino *in situ* med izdelavo ali po končani izdelavi tako, da dodamo v disperzijo ustrezno koncentracijo biokompatibilnih molekul, ki prekrijejo površino delcev (15).

Glede na lastnosti površine ločimo dve skupini SPION-ov:

(i) SPION-i z nespremenjeno površino,

(ii) SPION-i s fizikalno ali kemijsko modificirano površino, kot npr. kompleksiranje z dekstranom, molekulami s prostimi karboksilnimi ali amino skupinami, ki omogočajo nadaljnjo funkcionalizacijo površine delcev (18).

Pomembni parametri, ki jih moramo upoštevati pri načrtovanju in izdelavi SPION-ov, so magnetne lastnosti in hidrodinamski premer delcev, ki vpliva na vrednost magnetizacije, topnost in stabilnost delcev (15). SPION-i so v ustreznem odmerku za organizem varni (v koncentraciji < 100 μ g/ml), saj se razgradijo na železove ione, ki se v organizmu skladiščijo in uporabijo pri sintezi hemoglobina in na kisikove spojine (9,15).

1.3.1 Fizikalna stabilnost disperzij SPION-ov

Površina SPION-ov je relativno inertna, delci pa so v vodnem mediju praktično netopni. Obarjanje delcev iz disperzije lahko nastopi zaradi delovanja gravitacijske sile, če delci niso dovolj majhni. Na fizikalno stabilnost SPION-ov v suspenziji vplivajo hidrofobne, magnetne in van der Waalsove interakcije (17). SPION-i zaradi velike medfazne površine težijo v suspenziji k združevanju v skupke (klastre) mikronskih velikosti. Mikrometrski skupki nadalje agregirajo zaradi magnetnih interakcij dipol - dipol med klastri in postanejo namagneteni zaradi učinka sosednjih skupkov. V prisotnosti zunanjega magnetnega polja lahko pride do dodatne magnetizacije teh skupkov, kar še poveča težnjo po združevanju. V splošnem nanometrski delci v suspenzijah agregirajo zaradi delovanja privlačnih van der Waalsovih sil, saj tako zmanjšajo celokupno površinsko in medfazno energijo, kar je z vidika stabilnosti sistema ugodno (17). MND morajo biti karseda monodisperzni, saj je tak sistem fizikalno stabilnejši, poleg tega pa omogoča nadzorovano porazdelitev, eliminacijo in kontrastni učinek v organizmu (14). Združevanje delcev v skupke lahko ovira učinkovitost SPION-ov, zato je stabilizacija disperzij SPION-ov z načrtovano spremembo njihove površine pomemben tehnološki izziv (17). Snovi, ki se uporabljajo za stabilizacijo SPION-ov za uporabo v biomedicini, morajo biti biokompatibilne in biorazgradljive (17). Površinsko aktivne snovi zaščitijo delce s steričnim in/ali elektrostatskim učinkom (14, 17, 8). Elektrostatsko stabilizacijo dosežemo z adsorpcijo nabitih molekul na površino delcev. Sterično stabilizacijo pa dosežemo z adsorpcijo polimerov na površino delcev (slika 3) (7). Za večjo učinkovitost in za izboljšanje biokompatibilnosti in porazdelitve v organizmu lahko SPION-om spremenimo površino tako, da na delce vežemo specifične ligande kot so npr. protitelesa, peptidi, hormoni ali ZU (15).



Slika 3: Shematski prikaz stabilizacije SPION-ov: (a) elektrostatska in (b) sterična stabilizacija (prirejeno po (14)).

Površine SPION-ov lahko modificiramo tudi z drugimi polimeri, silicijevim dioksidom, kovinami (npr. zlato, kadmij, selen) in drugimi organskimi molekulami. Tako spremenjena površina SPION-ov zaščiti jedro delca pred oksidacijo in običajno zmanjša magnetne lastnosti delcev. S silicijevim dioksidom obloženi SPION-i imajo na površini proste hidroksilne skupine (silanolne skupine -Si-OH), ki omogočajo nadaljnjo kovalentno funkcionalizacijo takšnih delcev (17). Naboj na površini delcev ima pomembno vlogo pri zagotavljanju stabilnosti koloidne disperzije. Kvantitativno ga lahko izmerimo kot zeta potencial (ZP), ki predstavlja razliko med potencialom na površini delca močno vezane plasti ionov in elektronevtralnim območjem v raztopini (17). V splošnem velja, da so stabilne elektrostatsko stabilizirane disperzije z absolutno vrednostjo ZP nad 30 mV, kar velja tudi za disperzije SPION-ov (7, 18).

1.3.2 Fizikalne lastnosti SPION-ov

SPION-i, ki so izpostavljeni stalnemu magnetnemu polju so namagneteni do nasičene magnetizacije. Vsak delec je tako samostojni magnet, ki vpliva na lokalno magnetno polje. To povzroči pojav magnetnih dipol-dipol interakcij med delci in posledično se delci poravnajo v

smeri silnic stalnega zunanjega magnetnega polja. Pravokotno na poravnane magnetizirane delce delujejo odbojne sile (8).

Poleg magnetnih lastnosti so zelo pomembne tudi koloidne lastnosti SPION-ov, še posebej, če so delci namenjeni uporabi v biomedicini. Med delci so vedno prisotne privlačne van der Waalsove sile, ki so konstantne vrednosti, medtem ko so odbojne sile, kot so elektrostatske ali sterične odbojne sile, močno odvisne od ionske moči in pH medija ter od konformacije na površini SPION-ov adsorbiranih molekul polimerov ali bioloških molekul (8). Disperzija SPION-ov je stabilna le, če odbojne sile med delci prevladajo nad privlačnimi silami.

1.3.3 Uporaba SPION-ov

SPION-i so edini nanodelci kovinskega oksida, ki so danes odobreni za klinično uporabo. Imajo izjemen potencial za uporabo na različnih področjih biomedicine, kot so magnetno resonančno slikanje (MRI), ciljna dostava zdravilnih učinkovin, tkivno inženirstvo, ciljano zdravljenje tumorjev, magnetna transfekcija, detekcija železa, hipertermija in radioterapija (18). Superparamagnetizem je lastnost SPION-ov, ki je osrednjega pomena za njihovo uporabo v zgoraj omenjenih tehnoloških in biomedicinskih aplikacijah (15).

MRI je neinvazivna metoda, ki temelji na uporabi kontrastnih sredstev in se v medicini uporablja za vizualizacijo notranjih struktur (predvsem mehkih tkiv). SPION-i s povprečno velikostjo < 50-160 nm, ki so prekriti z organskimi molekulami so že v klinični uporabi ali kliničnih preskušanjih kot kontrastna sredstva za MRI. Uporabljamo jih za odkrivanje tumorjev na jetrih ali za diagnostiko metastaz na bezgavkah, saj so netoksični in biorazgradljivi (8, 19). V jetrih, vranici, kostnemu mozgu in bezgavkah jih lahko detektiramo, ker jih po vnosu iz krvnega obtoka odstranijo celice retikuloendotelijskega sistema (RES). V primeru, ko so tako majhni, da se izločajo skozi ledvice, jih lahko detektiramo tudi v urinu (18). Učinkovitost SPION-ov kot kontrastnega sredstva za MRI različnih tkiv je odvisna od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti, kot so velikost, naboj, narava in debelina obloge. Le-ta se lahko poveča z vezavo različnih bioloških ligandov kot so npr. protitelesa, ligandi receptorjev, polisaharidi, proteini (18).

V dostavnem sistemu imajo lahko SPION-i dvojno vlogo tj. so nosilci ZU in hkrati služijo kot kontrastno sredstvo. Na tak način lahko z MRI proučujemo kinetiko ZU v organizmu. Z uporabo zunanjega magnetnega polja lahko vplivamo na porazdelitev delcev v telesu in SPION-e s funkcionalizirano površino in vezano ZU dostavimo na specifično tarčno mesto v organizmu (18). Na učinkovitost ciljane dostave z uporabo zunanjega magnetnega polja, ki penetrira le

nekaj milimetrov v globino tkiva, vplivajo način vnosa MND v organizem, fizikalne lastnosti MND, fiziološki parametri bolnika in trajanje izpostavitve zunanjemu magnetnemu polju (18). Hipertermija z magnetnimi tekočinami: Superparamagnetni delci, ki so izpostavljeni izmeničnemu magnetnemu polju, povzročijo lokalno segrevanje tkiva. Zaradi nihanja magnetnih momentov znotraj delcev se sprošča energija v obliki toplote, ki povzroči lokalno segrevanje na temperaturo 41 - 46 °C. Izkoriščanje lokalne hipertermije je metoda zelo primerna za zdravljenje raka, saj so celice tumorjev zelo občutljive na povišano temperaturo. Če tumorske celice segrejemo na 41 - 45 °C, so poškodbe, ki jih povzroča hipertermija, za tumorske celice ireverzibilne za normalne tj. zdrave celice pa reverzibilne (18).

1.3.4 Nanoteranostiki

Intenzivne raziskave, ki potekajo na področju boja proti raku v upanju izboljšanja učinkovitosti zdravljenja in zmanjševanja stranskih učinkov, so pripeljale do novih naprednih dostavnih sistemov, ki omogočajo sočasno diagnostiko in zdravljenje tj. teranostikov. oz. v primeru, da je tak sistem nanometrske velikosti, govorimo o nanoteranostiku. Izraz opredeljuje integriran sistem, ki omogoča diagnosticiranje, zdravljenje in spremljanje odziva na samo zdravljenje (20). V razvoju nanoteranostikov imajo zelo pomembno vlogo tudi SPION-i, ki so lahko diagnostična in/ali terapevtska komponenta takšnega integriranega sistema (slika 4).

Vsak teranostik je sestavljen iz:

- <u>Diagnostične komponente</u> med katerimi se najbolj pogosto uporabljajo kovinski ali magnetni nanodelci, fluorescenčne spojine ali radioizotopi. Detektiramo jih lahko z magnetno resonanco (MRI), optičnim slikanjem, pozitronsko emisijsko tomografijo (PET) in enofotonsko računalniško tomografijo (SPECT).
- **Dostavnega sistema ali obloge**, ki diagnostično komponento obdaja in zagotavlja stabilnost koloidne disperzije.
- <u>ZU</u>, ki je kovalentno ali nekovalentno vezana na dostavni sistem ali pa je fizikalno ujeta v ogrodje nanodostavnega sistema (10).



Slika 4: Shema uporabe nanoteranostika pri zdravljenju raka (prirejeno po (21)).

Tak pristop z uporabo diagnostično-terapevtskega sistema bo v prihodnosti izboljšal učinkovitost odkrivanja in zdravljenja bolezni ter zmanjšal stroške zdravljenja (20).

1.3.5 Obnašanje SPION-ov po vnosu v krvni obtok

Po intravenskem vnosu preidejo SPION-i v kri, heterogeno tekočino z visoko ionsko močjo, ki lahko povzroči agregiranje SPION-ov in jim spremeni magnetne lastnosti (2). Optimalna velikost za intravensko dajanje SPION-ov je 10 - 100 nm. Delce večje od 200 nm odstranijo po opsonizaciji celice RES. V primeru, da so delci manjši od 10 nm, pa se izločijo skozi ledvice (15). RES je primarni fiziološki mehanizem, ki skrbi za odstranjevanje nanodelcev iz krvnega obtoka. Po vnosu nanodelcev v krvni obtok se na njihovo površino adsorbirajo proteini, ki jih imenujemo opsonini. Takšne delce celice RES prepoznajo kot tujke in jih s fagocitozo odstranijo iz krvnega obtoka (22).

Nanodelci lahko prehajajo endoteljno steno le v primeru povečane prepustnosti žilnega endotelija, kar pa se zgodi pri patoloških stanjih, kot je vnetje ali tumorsko tkivo. Čas zadrževanja SPION-ov v krvnem obtoku je tako odvisen od velikosti in površinskih lastnosti delcev (5). Suspenzije nanodelcev za uporabo v terapiji ali diagnostiki morajo biti hidrofilne s pH blizu 7,4. Delci se morajo iz organizma izločiti nespremenjeni ali se morajo v organizmu razgraditi in izločiti iz sistema brez toksičnih učinkov, sicer se lahko v telesu kopičijo (22). Po vnosu v telo se morajo SPION-i v obtoku zadržati dovolj dolgo, da dosežejo tarčno mesto v

organizmu. Ostati morajo dispergirani, da ne povzročijo embolij (17). Z modifikacijo površin SPION-ov z oblogami, ki jih celice RES ne prepoznajo, lahko podaljšamo čas zadrževanja SPION-ov v krvnem obtoku dovolj dolgo, da dosežejo željeno mesto. Hidrofilna obloga iz polietilenglikola (PEG) zagotavlja sterično bariero, ki preprečuje opsonizacijo in prevzem nanodelcev v makrofage (7). Do sedaj so modifikacijo površine SPION-ov s PEG uporabljali predvsem za MND s hidrodinamskim premerom od 10-100 nm, nedavne raziskave na večjih PEGiliranih MND (hidrodinamski premer 170 nm), pa so na podganah pokazale, da imajo takšni delci razpolovni čas v krvnem obtoku skoraj 12 h in so z MRI vidni v tumorjih do 24 ur (22).

Na privzem SPION-ov v celice z endocitozo ima pomemben vpliv tudi naboj na površini delcev. Ugotovili so, da zaradi negativnega naboja celičnih membran poteka privzem negativno nabitih delcev počasneje/slabše kot pri pozitivno nabitih ali nenabitih delcih. Privzem s fagocitozo je hitrejši pri močno nabitih delcih kot pri delcih z nizkim nabojem. Večji kot je naboj na površini delcev, krajši je čas zadrževanja SPION-ov v sistemu (7, 22).

1.4 Modifikacija površine SPION-ov z metodo plast za plastjo

1.4.1 Osnovne značilnosti metode plast za plastjo

Postopek modifikacije površine delcev z metodo plast za plastjo (angl. *Layer By Layer*, LBL) je enostaven in ga lahko uporabimo tudi za spreminjanje površinskih lastnosti nanodelcev (23). Z LBL metodo lahko na površini delcev ustvarimo ultra tanek sloj z natančno definirano debelino, sestavo in strukturo. Metoda se veliko uporablja za pripravo visoko selektivnih membran in tankih filmov za različne namene, vključno z uporabo na področju biosenzorjev, katalizatorjev, separacije in optike (24, 25). Slojevita struktura nastane zaradi kompetitivnih interakcij med polielektroliti (PE), površino substrata in topilom. Pri tem izkoriščamo elektrostatske interakcije, vodikove vezi, hidrofobne in van der Walsove interakcije ter tako vplivamo na stabilnost, morfologijo, permeabilnost in debelino (23). V običajnem LBL postopku substrat izmenično potapljamo v raztopine anionskih in kationskih snovi, ki se preko elektrostatskih interakcij adsorbirajo na površino delcev (24). Prvi korak adsorpcije na substrat je hitra reakcija prvega reda, ki traja nekaj sekund in temelji na elektrostatskih interakcijah med PE in površino substrata. Naslednji počasnejši proces lahko traja nekaj minut in obsega prerazporeditev molekul PE, ki so se adsorbirale v prvem koraku. S prerazporeditvijo se molekule PE na površini delcev zvijejo v konformacijo krtače, ki zagotavlja sterično stabilizacijo delcev. Proces je difuzijsko nadzorovan in poteka do zasedbe prostih mest na površini substrata (tj. do nasičenja površine). Izmenično nalaganje plasti nasprotno nabitih linearnih ali razvejanih PE na površini delcev je preprosto in omogoča nastanek 5-500 nm debele obloge zgrajene iz monoslojev različnih snovi, ki se adsorbirajo v vnaprej določenem zaporedju. Debelina posamezne plasti je približno 1 nm (26). Za proučevanje zgradbe slojev v oblogi se najpogosteje uporabljata spektroskopska in strukturna analiza (23).

LBL metoda oblaganja poteka po naslednjem postopku (slika 5):

- 1. Delce oz. material, ki ga oblagamo, z nabito površino potopimo v raztopino nasprotno nabitega PE. Tako se na površino delcev absorbira prva plast.
- 2. Spiranje s katerim odstranimo nevezane molekule PE.
- Delce potopimo v raztopino nasprotno nabitega PE tako, da se na površino delcev adsorbira naslednja plast.
- 4. Spiranje s katerim odstranimo nevezane molekule PE.
- 5. Postopek 1-4 ponavljamo.



Slika 5: Shematski prikaz poteka oblaganja z metodo plast za plastjo (LBL). (A) nanos plasti polikationa, (B, D) postopek spiranja, (C) nanos plasti polianiona, (E) shema obloge, ki je sestavljena iz različnih plasti (prirejeno po (23)).

Z LBL oblaganjem lahko nanodelce (ND) obložimo z izmenjujočim oblaganjem z anionskimi in kationskimi PE skupno do nanosa 10 ali več plasti (6, 27).

1.4.2 Materiali in substrati primerni za oblaganje z LBL metodo

Nanodelci so ustrezni za oblaganje z LBL metodo, če so v disperziji stabilni. Glede na naravo so ti delci lahko anorganski (npr. silicijev dioksid, kovinski oksidi) ali organski (npr. polimerni delci, delci ZU) (23, 28).

Za oblaganje uporabljamo PE. To so visoko molekularne spojine, ki imajo v svoji strukturi del molekule, ki je relativno slabo topen v mediju in/ali ima veliko težnjo po adsorpciji na površino delcev, in del, ki je dobro topen in se izteza v medij. Glede na naravo so te molekule lahko tako sterični kot elektrostatski stabilizatorji. Pri dodajanju PE se na površini delcev zaradi elektrostatskih interakcij med nasprotno nabitimi molekulami PE tvorijo posamezne plasti (23). Glede na naravo delimo PE v dve skupini:

- Sintezni PE npr. polistirensulfonat (PSS), polidimetildialilamonijev klorid (PDDA), polietilenamin (PEI), poli-N-isopropilakrilamid (PNIPAM), poliakrilna kislina (PAA), polimetakrilna kislina (PMA), polivinil sulfat (PVS) in polialilamin (PAH) (23).
- Naravni PE, kot so nukleinske kisline, proteini in polisaharidi. Med njimi se pogosto uporabljajo naslednji: alginska kislina, hondroitinsulfat, DNA, heparin, hitosan, celulozni sulfati, sulfati dekstrana in karboksimetilceluloza (23).

Učinkovitost LBL metode pri tvorbi večplastne obloge zavisi od izbire para polianion-polikation, ki ga uporabimo za oblaganje (29).

1.4.3 Tehnološki parametri oblaganja

Za uspešen nanos posameznih plasti so pri LBL metodi zelo pomembni parametri pri katerih oblaganje izvajamo. Lastnosti obloge, ki jo dobimo z nalaganjem posameznih plasti, so odvisne od lastnosti gradnikov in njihove organizacije in povezovanja pravokotno na površino delca, ki ga oblagamo. Za vsak sistem lahko LBL oblogo optimiziramo s spreminjanjem izbora PE in pogojev oblaganja (26).

<u>Medij</u>: Številne raziskave so dokazale, da ima polarnost medija v katerem izvajamo oblaganje velik vpliv na uspešnost nanašanja posameznih plasti. Medij mora zagotoviti ustrezno ionizacijo funkcionalnih skupin PE, saj oblaganje temelji na elektrostatskih interakcijah med površino, ki jo oblagamo in molekulami PE. V nepolarnih topilih se pojavijo disperzijske sile ali vodikove vezi, kar pa pomeni da PE morda ne ionizira ali pa ionizira le pod ostrimi pogoji (23).

Koncentracija PE: Za uspešno adsorpcijo PE in preprečevanje odstranjevanja le-tega (angl. *colloid depletion*) mora biti koncentracija raztopine PE med dodajanjem posameznih slojev

dovolj visoka, da zagotovi uspešen nanos posamezne plasti in ustrezen naboj za vsak adsorbiran sloj. Koncentracijski prag, ki ga moramo doseči, je odvisen od topnosti PE in gostote naboja koloida, ki ga oblagamo (23).

Ionska moč in pH medija: Ioni soli vplivajo na naboj med sloji in posledično tudi na debelino slojev. S spremembo pH medija se spremeni ionizacija PE in funkcionalnih skupin na površini delcev, ki jih oblagamo, kar posledično spremeni potek adsorpcije. Debelina sloja lahko raste linearno ali eksponentno v vsakem koraku. Linearno narašča takrat, ko PE v raztopini vstopa v interakcije izključno z zunanjim slojem večslojne obloge. Pri difuziji in interakcijah PE z notranjimi plastmi obloge pa se debelina sloja povečuje eksponentno (23).

Spiranje: Substrat oz. delce na površino katerih smo nanesli plast PE speremo z dobrim topilom za dani PE, da odstranimo nevezane molekule PE in preprečimo kontaminacijo raztopine nasprotno nabitega PE, ki jo v naslednjem koraku uporabimo za oblaganje. Spiranje na močno vezane PE (z visoko gostoto naboja) nima velikega vpliva, saj je vezava med sloji močna, medtem ko se lahko pri spiranju šibko vezanih PE (nizka gostota naboja) plast PE spere (23).

<u>Sušenje</u>: Med nanosom posameznih slojev PE moramo paziti, da se površina delcev, ki jih oblagamo, ne posuši, saj s sušenjem nastopi prerazporeditev molekul PE v zgornji plasti obloge, kar lahko neugodno vpliva na nanos naslednjih plasti. Vlažno okolje, v katerem poteka oblaganje, zagotavlja fleksibilnost verig molekul PE in ustrezno ionizacijo funkcionalnih skupin ter tako bistveno vpliva na uspešnost LBL oblaganja (23).

Debelino in naravo LBL obloge lahko ovrednotimo z različnimi metodami. Mikroelektroforeza kvalitativno pokaže spremembo naboja na površini delcev po vsakem koraku tj. po nanosu posamezne plasti PE. Spremembo naboja na površini delcev lahko spremljamo tudi z merjenjem ZP delcev. Merjenje povprečne velikosti delcev z metodo fotonske korelacijske spektroskopije kvantitativno pokaže povečanje premera delcev zaradi adsorpcije sloja PE, transmisijska elektronsko mikroskopijo (TEM) in vrstična elektronska mikroskopija (SEM) prav tako pokažeta morfološke spremembe in spremembe v velikosti posameznih delcev po nanosu PE. Kadar uporabljamo PE, ki je fluorescenčno označen, lahko za vrednotenje LBL obloge uporabimo fluorescenčno spektroskopijo (28).

1.4.4 Uporaba in prednosti LBL metode

Od leta 2000 naprej se LBL metoda v povezavi s sodobnimi dostavnimi sistemi hitro razvija. Robustna narava procesa, ki temelji na »samonastajanju« obloge, visoka učinkovitost vgrajevanja učinkovin, možnost ciljanja in biokompatibilnost dostavnih sistemov, ki jih obložimo z uporabo LBL metode, so prednosti metode, ki ima velik potencial na področju razvoja sistemov z nadzorovanim in ciljanim sproščanja ZU in genov (26). Velik izziv pri dostavi učinkovin je izdelava dostavnih sistemov z nadzorovanim sproščanjem, bodisi podaljšanim ali sproščanjem pod vplivom različnih dejavnikov. Priprava polimernih večplastnih oblog z LBL metodo odpira nove možnosti na področju priprave večnamenskih nosilcev ZU z nadzorovanimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (25). S spreminjanjem razmerja med debelino obloge in premerom jedra oz. delca, ki ga oblagamo, lahko dosežemo natančno nadzorovano sproščanje ZU ter tako konstantno koncentracijo ZU v organizmu nekaj ur ali celo nekaj dni (26). Poleg nadzorovanega sproščanja ZU, ki ga lahko dosežemo z uporabo LBL metode, so nedavne raziskave pokazale, da lahko z LBL metodo odpravimo tudi težave povezane z nestabilnostjo disperzij nanodelcev, ki so stabilizirane z uporabo klasičnih stabilizatorjev. Obloga na površini delca, ki nastane z LBL metodo, se ne odstrani lahko s površine in ohrani celovitost tudi po redčenju vzorca ali spremembah sestave disperznega medija (26). Poleg tega notranja plast LBL obloge zmanjša površinsko prosto energijo majhnih osnovnih delcev, s čimer preprečimo kristalizacijo in združevanje nanodelcev. Na drugi strani zunanje plasti LBL obloge zaradi njihove visoke hidrofilnosti in velikega površinskega naboja povečajo stabilnost koloidne disperzije. Vmesne plasti v LBL oblogi so lahko zasnovane tako, da omogočajo spreminjanje in nadzor nad sproščanje ZU iz nanodelcev (26).

Glavne prednosti LBL metode pred konvencionalnimi metodami za spreminjanje površinskih lastnosti delcev so:

- Enostavna izvedba postopka in enostavna oprema
- Metoda je ustrezna za oblaganje večine površin, različnih oblik in velikosti nanodelcev
- Lahka dostopnost mnogih naravnih in sinteznih koloidov za oblaganje
- Stabilnost nanešenih plasti obloge
- Možnost kontrole nad debelino nanešene obloge
- Možnost označevanja površine z ligandi za ciljanje (23, 26).

1.5 Vrednotenje velikosti in zeta potenciala koloidnih delcev

1.5.1 Fotonska korelacijska spektroskopija

Povprečni premer delcev izmerjen z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (*angl. Photon corellation Spectroscopy, PCS*) nam pove povprečno hidrodinamsko velikost delcev v disperziji. Fotonska korelacijska spektroskopija temelji na meritvah nihanja intenzitete sipane laserske svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev. To je naključno gibanje kot posledica trkov delcev z molekulami disperznega medija. Pri tem je hitrost gibanja delcev obratno sorazmerna z velikostjo delcev. Povprečna velikost delcev in širina porazdelitve velikosti delcev se izračuna s Stokes Einsteinovo enačbo (*enačba 1*) (7, 9).

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_{\rm h}}$$

(enačba 1)

kjer je:

- D translacijski difuzijski koificient
- k Boltzmanova konstanta
- T temperatura
- η viskoznost medija
- d_h hidrodinamski premer delca

PI je merilo širine porazdelitve velikosti delcev v vzorcu. Njegove vrednosti so med 0 in 1; pri čemer PI = 0 pomeni popolnoma monodisperzno distribucijo (vsi delci v vzorcu so enake velikosti), medtem ko z naraščanjem vrednosti PI distribucija postaja vse bolj polidisperzna. Vrednosti PI < 0, 1 kažejo na dobro homogenost vzorca in ozko porazdelitev velikosti delcev, vrednosti PI > 0, 3 pa kažejo na večjo heterogenost (7, 9).

1.5.2 Laserska doplerjeva elektroforeza

Gostoto naboja na površini SPION-ov določamo z merjenjem ZP delcev z lasersko Dopplerjevo elektroforezo. ZP je definiran kot razlika med potencialom na površini delca močno vezane plasti ionov (Sternova plast) in elektronevtralnim območjem v raztopini (7). Meritev temelji na merjenju hitrosti gibanja nabitih delcev skozi tekočino pod vplivom električnega polja. Zaradi

gibanja delcev se s časom spreminja intenziteta sipanja svetlobe laserskega žarka, kar je osnova za izračun naboja delcev. Vrednost ZP je povezana s stabilnostjo koloidnih disperzij. Za disperzije, ki so elektrostatsko stabilizirane in imajo visok ZP z absolutno vrednostjo nad 30 mV velja, da so fizikalno stabilne, medtem ko koloidi z nizkimi ZP po navadi koagulirajo ali flokulirajo (7, 18).

2. NAMEN DELA

Namen našega raziskovalnega dela je pripraviti fizikalno stabilno disperzijo magnetnih nanodelcev, ki bi se potencialno lahko uporabljala v diagnostiki ali kot dostavni sistem za vnos zdravilnih učinkovin. Superparamagnetnim nanodelcem železovega oksida (SPION-om) bomo z adsorpcijo PE z uporabo metode plast za plastjo modificirali površino, da bi povečali fizikalno stabilnost koloidne disperzije.

Najprej bomo ovrednotili vpliv parametrov disperznega medija (pH, prisotnost soli) na stabilnost osnovne disperzije SPION-ov. Na podlagi teh rezultatov bomo izbrali ustrezno koncentracijo SPION-ov in medij, v katerem bomo izvajali LBL oblaganje. Za oblaganje bomo uporabili izmenično raztopine anionskega (PAA) in kationskega (hitosan ali PAH) PE. Ker je površina SPION-ov pozitivno nabita, bomo oblaganje delcev pričeli z nanosom anionskega PE tj. poliakrilna kislina (PAA). Optimizirali bomo proces dodajanja prvega sloja PAA (koncentracija PAA, čas inkubiranja). Nadaljevali bomo z nanosom kationskega PE, katerega nanašanje bomo prav tako skušali optimizirati (koncentracija hitosana, čas inkubiranja, postopek dodajanja PE). Preverili bomo vpliv časa soniciranja in uporabo premreževalca TPP pri dodajanju hitosana na velikost delcev in stabilnost disperzije. Izmenično nanašanje plasti PE bomo ponavljali dokler ne bomo opazili združevanja delcev v agregate. Zaradi potencialne uporabe SPION-ov *in vivo* nas bo zanimal tudi vpliv ionske moči tj. soli na stabilnost disperzije SPION-ov, obloženih s PAA in hitosanom. S fotonsko korelacijsko spektroskopijo in lasersko Dopplerjeve anemometrijo bomo ugotavljali vpliv modifikacije površine na povprečno velikost in polidisperznost delcev ter njihov ZP.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

SPION-i: Uporabili smo vodno disperzijo SPION-ov prekritih s slojem silicijevega dioksida s koncentracijo 4 mg/ml (MDR-Si/H2O, datum priprave: 16. 5. 2013), ki so jih pripravili na Odseku za sintezo materialov na Inštitutu Jožef Štefan, Ljubljana, Slovenija. Disperzija SPIONO-ov je bila rjavkaste barve (slika 6).



Slika 6: Razredčena disperzija SPION-ov.

Poliakrilna kislina (PAA): Raztopina PAA proizvajalca Sigma Aldrich, Nemčija; povprečna molska masa M_w ~100.000; 35 m/v % v vodi.

PAA je sintezni visokomolekularni polimer akrilne kisline (slika 7). V vodni raztopini pri nevtralnem pH je PAA anionski polimer, saj so stranske karboksilne skupine deprotonirane in zato negativno nabite. PAA je biokompatibilen PE s pKa vrednostjo 4,5. Zaradi ionizacije karboksilnih skupin je gostota naboja PAA verig močno odvisna od pH. Zaradi odzivnosti na pH in ionsko moč uporabljamo PAA pri izdelavi polimernih ogrodij ali oblog, ki se odzivajo na te dražljaje. Z adsorpcijo na površino delcev poveča njihovo stabilnost in biokompatibilnost ter pomaga pri njihovi bioadheziji (17).



Slika 7: Kemijska struktura poliakrilne kisline (PAA).

<u>Hitosan</u>: Hitosanijev klorid (Protasan), Novamatrix, Norveška in hitosan iz oklepov rakov z nizko viskoznostjo (NV), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija.

Za lažje razlikovanje med obema vrstama hitosana, ki smo ju uporabljali v raziskavi, je hitosan v obliki soli označen kot hitosanijev klorid, medtem ko je hitosan z nizko viskoznostjo označen kot hitosan-NV.

Hitosan je biokompatibilen in biorazgradljiv polisaharid, ki ga pridobivamo z decetiliranjem hitina (19). Hitin je v naravi prisoten v lupinah rakov, kozic in jastogov, planktonu, najdemo ga tudi v koralah in meduzah (28). Poleg hidroksilnih skupin ima tudi aminske funkcionalne skupine, ki povečajo možnosti modifikacije polimera in njegove uporabe (slika 8). Hitosan kelira kovinske ione, kar preko koordinacijskih vezi izboljša interakcije med verigo polimera in površino SPION-ov (19). Da pa dosežemo raztapljanje polimera v vodi, morajo biti aminske skupine protonirane, kar se zgodi v mediju s kislim pH. Tak pH pa za mnoge biološke sisteme ni sprejemljiv (19). Nanodelci obdani s hitosanom so stabilni v vodi in imajo pozitivni naboj na površini. Raziskave so pokazale, da ima obloga iz hitosana tudi protibakterijsko delovanje (19, 30). Hitosan je topen v šibkih vodnih kislinah kot je ocetna kislina ali mlečna kislina. pKa hitosana je 6,3 (31).

$$H_{HO} \rightarrow H_{2} \rightarrow H_{$$

Slika 8: Kemijska struktura hitosana.

Natrijev tripolifosfat (TPP): TPP (pentabazični) 90-95 %, proizvajalca Sigma-Aldrich Chemie GmBH, Nemčija.

TPP je anorganska spojina z molekulsko formulo $Na_5P_3O_{10}$. Je polianion, ki se uporablja za premreževanje hitosanskih verig (slika 9). S premreževanjem hitosana dosežemo večjo stabilnost delcev (30).



Slika 9: Prikaz premreževanja hitosana s TPP (prirejeno po (30)).

Polialilaminijev klorid (PAH): Proizvajalca Sigma Aldrich, Nemčija, povprečna molska masa M_w ~58.000.

PAH je kationski PE, ki ga pripravimo s polimerizacijo alilamina in spada med šibke polikatione. pKa PAH je 8,5 (27, 32, 33).



Slika 10: Kemijska struktura PAH.

Bidestilirana voda, Fakulteta za farmacijo

Ocetna kislina, Merck, Nemčija

Natrijev klorid, Merck, Nemčija

Natrijev hidroksid, Merck, Nemčija

Klorovodikova kislina, Merck, Nemčija

Na-acetat, Merck, Nemčija

Kalijev klorid, Merck, Nemčija

Dinatrijev hidrogen fosfat dodekahidrat (Na2HPO4 x 12 H2O), Merck, Nemčija

Kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄,), Merck, Nemčija

3.2 Laboratorijska oprema

Analitska tehtnica Mettler Toledo AG245, Mettler Toledo, Nemčija Avtomatske pipete (10-100, 100-1000 in 1000-5000µL), Biohit, Helsinki, Finska Mikrocentrefugirke, Eppendorf, Hamburg, Nemčija Kivete za merjenje ZP, DTS1060, Malvern, Velika Britanija Magnetno mešalo, IKA Nastavki za pipete, Biohit, Helsinki, Finska pH lističi v območju 0-14 in 5-10, Merck, Nemčija pH meter, Mettler Toledo, Nemčija Polistirenska kiveta, Sarstedt Numbrecht, Nemčija Ultrazvočna kadička, Iskra Sonis 4, Iskra, Slovenija Ultrazvočna sonda Ultrasonic processor, Illinois, ZDA Vortex EV-202, Tehtnica Železniki, Slovenija Zetasizer Nanos ZS, Malvern instruments, Malvern, Velika Britanija

3.3 METODE

3.3.1 Priprava disperzije SPION-ov

V raziskavah smo uporabili razredčeno disperzijo SPION-ov z začetno koncentracijo $c_{1Z} = 0,2$ mg/ml ali $c_{2Z} = 0,02$ mg/ml, ki smo jo pripravili tako, da smo osnovno disperzijo SPION-ov s koncentracijo c = 4 mg/ml razredčili s prečiščeno vodo ali medijem s pH 4 in vzorce dobro premešali s pomočjo vorteksiranja. Končna koncentracija vzorca SPION-ov je bila pri višji koncentraciji $c_{1K} = 10 \ \mu\text{g/ml}$ in pri nižji koncentraciji $c_{2K} = 1 \ \mu\text{g/ml}$. Vse poskuse smo izvajali v 1500 μ l mikrocentrefugirkah. SPION-i prekriti s silicijevim dioksidom, ki smo jih uporabili v naši raziskavi imajo izoelektrično točko pri pH 6 (slika 11).



Slika 11: Odvisnost ZP SPION-ov, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, od pH disperznega medija (meritev izvedena na Odseku za sintezo materialov, Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana).

3.3.2 Čiščenje disperzije SPION-ov v zunanjem magnetnem polju

S pomočjo zunanjega magnetnega polja, ki smo ga ustvarili s pomočjo permanentnega magneta, smo SPION-e očistili tj. ločili od disperznega medija v katerem so bili dispergirani (slika 12). S tem smo vzorce SPION-ov skoncentrirali in odstranili presežek PE, ki se ni adsorbiral na površino SPION-ov. Magnet smo postavili ob steno mikrocentrefugirke z vzorcem SPION-ov in počakali določen čas (5 min), da so se delci zbrali ob steni mikrocentrefugirke. Nato smo disperzni medij (supernatant) odpipetirali in ga zavrgli ter v mikrocentrefugirko s SPION-i dodali 1500 µl medija v katerem smo delce s pomočjo vorteksiranja redispergirali. Pri tem smo pazili, da smo medij dodali takoj po odstranitvi supernatanta, da se SPION-i, ki so se zbrali na steni mikrocentrefugirke, niso posušili. Nato smo izmerili povprečno velikost, polidisperzni indeks (PI) in ZP delcev. Disperzijo smo nato ponovno postavili ob magnet in ponovili postopek.



Slika 12: Postopek čiščenja SPION-ov v magnetnem polju.

3.3.3 Vpliv pH medija na velikost SPION-ov

Ker je debelina adsorbiranega sloja PE in fizikalna stabilnost disperzije SPION-ov močno odvisna od pH medija, smo na magnetu očiščene vzorce SPION-ov s koncentracijo $c_{1K} = 10 \mu g/ml$ redispergirali v mediju z različnimi pH vrednostmi in jim nato izmerili povprečno velikost delcev in PI. Opazovali smo tudi izgled vzorcev po dispergiranju (npr. morebitna prisotnost vidnih delcev, kosmičenje).

Postopek priprava medijev v katerih smo redispergirali SPION-e:

Disperzni medij s pH 4: Vodno raztopino s pH 4 smo pripravili tako, da smo k prečiščeni vodi dodali nekaj kapljic 0,1 M HCl. Pri tem smo ves čas merili pH raztopine dokler le-ta ni dosegla pH 4.

Disperzni medij s pH ~5: Kot disperzni medij s pH ~5 smo uporabili kar prečiščeno vodo pripravljeno na Fakulteti za farmacijo, katere pH je ~5.

Disperzni medij s pH 7,4: Fosfatni pufer s pH 7,4 (PBS) smo pripravili tako, da smo raztopili 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na₂HPO₄ x 12 H2O in 0,24 g KH₂PO₄ v 800 ml destilirane vode, uravnali pH s HCl in dopolnitvijo do 1 l s prečiščeno vodo.

Disperzni medij s pH 10: Vodno raztopino s pH 10 smo pripravili tako, da smo k prečiščeni vodi dodali nekaj kapljic pripravljene 0,1 M raztopine NaOH. Pri tem smo ves čas merili pH raztopine dokler le-ta ni dosegla pH 10.

Ker smo ugotovili, da so delci najbolj fizikalno stabilni v mediju s pH 4, smo osnovni vzorec SPION-ov s koncentracijo $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ nadalje pripravljali v tem mediju.

3.3.4 Vpliv koncentracije soli na velikost SPION-ov

Opazovali smo vpliv ionske moči disperznega medija na velikost in fizikalno stabilnost disperzije SPION-ov. Ker so SPION-i namenjeni potencialni uporabi *in vivo*, morajo biti stabilni v fizioloških pogojih, kjer koncentracija elektrolitov ustreza koncentraciji NaCl 0,154 mol/l (0,9% oz. 9 g/l).

Vzorcu SPION-ov smo dodali različne koncentracije soli kot je prikazano v preglednici I. Volumen vzorca s koncentracijo SPION-ov $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ je bil 1500 μ l.

Osnovno raztopino NaCl, ki smo jo dodajali, smo pripravili tako, da smo 584,1 mg NaCl raztopili v 50 ml medija s pH 4. Dobljene vzorce smo dobro premešali in jim izmerili povprečno velikost delcev in PI.

Preglednica I: Sestava vzorcev SPION-ov z različnimi koncentracijami dodanega NaCl. Končna koncentracija SPION-ov v vzorcu po dodatku soli je bila $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$.

c _{NaCl} (mol/l)*	$V_{NaCl}\left(\mu l ight)$	V c _{1K} (μl)	$V_{pH 4} (\mu l)$
0,20	1425,0	75	0
0,15	1069,0	75	356,0
0,10	712,5	75	712,5
0,05	356,2	75	1068,8
0,01	71,3	75	1353,7

^{*}Končna koncentracija soli v vzorcu.

Nadalje smo vzorce s koncentracijo soli 0,2 mol/l, 0,15 mol/l in 0,01 mol/l očistili v magnetnem polju, odpipetirali supernatant in SPION-e redispergirali v mediju s pH 4 ter vzorce organoleptično ocenili takoj ter po 24 urah. Po 24 h smo pri vzorcu s koncentracijo soli 0,01 mol/l uporabili za redispergiranje tudi ultrazvočno sondo (5 s, amplituda 30 %), da bi agregate razbili na posamezne delce. Ultrazvočna (UZ) sonda deluje na principu visokofrekvenčnega zvoka, ki vnaša v vzorec energijo, zato nastajajo parni mehurčki, ki implodirajo z dovolj veliko silo, da večje delce ali kapljice razbije v manjše delce oz. kapljice (9). Vrat UZ sonde je bil ves čas potopljen v vzorec.

3.3.5 Adsorpcija PAA na površino SPION-ov

Za nanos prvega sloja smo uporabili anionski PE PAA z osnovno koncentracijo $c_{PAA} = 10,0$ mg/ml. V začetni fazi smo preverjali vpliv koncentracije PAA na velikost in stabilnost SPIONov. Vzorec smo pripravili po naslednjem postopku: vzorcu SPION-ov s koncentracijo $c_{1K} = 10$ µg/ml smo dodali različne koncentracije PAA in medij pH 4 do skupnega volumna 1500 µl (preglednica II). Meritve povprečne velikosti delcev in PI smo izvedli po 20 min. Vse vzorce smo pred meritvijo dobro premešali s pomočjo vorteksiranja. V tej fazi raziskav vzorcev nismo čistili v magnetnem polju.

c _{PAA} (µg/ml) *	V _{PAA} (µl)	$\mathbf{V}\mathbf{c}_{1\mathrm{K}}$ (µl)	$V_{pH4}(\mu l)$
400	57	75	1368
200	28	75	1397
100	14	75	1411
50	7	75	1418

Preglednica II: Sestava vzorcev SPION-ov z različnimi koncentracijami dodanega PE (PAA). Končna koncentracija SPION-ov v vzorcu po dodatku PAA je bila $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$.

*Končna koncentracija PAA v vzorcu.

Vzorce smo organoleptično ocenili takoj in po 24 h. Po 24 h smo vzorce očistili v magnetnem polju, jih redispergirali v 1500 µl prečiščene vode in jim izmerili povprečno velikost ter PI.

3.3.6 Adsorpcija hitosanijevega klorida na površino PAA-SPION-ov

Uporabili smo raztopino hitosanijevega klorida z osnovno koncentracijo $c_{HIT-CI} = 10$ mg/ml. Ugotavljali smo vpliv koncentracije hitosanijevega klorida na velikost in stabilnost s PAA obloženih SPION-ov. Vzorce SPION-ov, ki smo jih predhodno obložili s plastjo PAA s končno koncentracijo v vzorcu $c_{PAA} = 50 \ \mu$ g/ml smo očistili v magnetnem polju in jih redispergirali v raztopinah z različno koncentracijo hitosanijevega klorida (preglednica III). Nato smo te vzorce očistili v magnetnem polju in jih dopolnili do skupnega volumna 1500 μ l s prečiščeno vodo, jih z vorteksiranjem dobro premešali in takoj izmerili povprečne velikosti delcev in PI.

C _{HIT-Cl} (µg/ml)*	V _{HIT-CI} (µl)	V _{H2O} (μl)
400	60	1440
200	30	1470
100	15	1485
50	7,5	1492,5

Preglednica III: Sestava vzorcev SPION-ov z različnimi koncentracijami PE (hitosanijev klorid). Končna koncentracija SPION-ov v vzorcu po dodatku hitosana je bila $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$.

*Končna koncentracija hitosanijevega klorida v vzorcu.

Pri vzorcu s končno koncentracijo hitosanijevega klorida $c_{HIT-Cl} = 50 \ \mu g/ml$ smo hitosan pripravili v mediju s pH 4, ga dodali vzorcu SPION-ov, ki smo jih predhodno obložili s plastjo PAA, dobro pomešali z vorteksiranjem in izmerili povprečno velikost delcev in PI.

Vzorec smo nato sonicirali z uporabo UZ sonde (5 s, amplituda 30 %) in izmerili povprečno velikost delcev in PI ter vzorec organoleptično ovrednotili. Postopek smo ponovili po 24 h.

3.3.7 Vpliv časa soniciranja na velikost SPION-ov po dodatku hitosanijevega klorida

Vzorec SPION-ov s koncentracijo $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ pripravljenem v mediju s pH 4, ki smo ga obložili s prvo plastjo anionskega PE PAA s koncentracijo $C_{PAA} = 50 \ \mu g/ml$, smo očistili v magnetnem polju in dodali drugo plast PE tj. 1500 μ l raztopine hitosanijevega klorida s koncentracijo $c_{HIT-CI} = 50 \ \mu g/ml$ Za primerjavo smo pripravili vzorec z dodatkom 1500 μ l raztopine hitosanijevega klorida s koncentracijo $c_{HIT-CI} = 100 \ \mu g/ml$. Tako pripravljena vzorca smo pulzno sonicirali z uporabo UZ sonde (5 s, amplituda 30 %) tako, da smo skupno dosegli 5 pulzov oz. skupni čas soniciranja 25 s. Po vsakem pulzu soniciranja smo takoj izmerili povprečno velikost delcev in PI. Vzorca s koncentracijo $c_{HIT-CI} = 50 \ \mu g/ml z najdaljšim celokupnim časom soniciranja (25 s) smo po 24 h očistili v magnetnem polju in ju redispergirali v prečiščeni vodi (pH ~5) ter izmerili povprečno velikost delcev, PI in ZP delcev.$

3.3.8 Optimizacija postopka: uporaba hitosana-NV in manjše koncentracije SPIONov

Da bi optimirali postopek oblaganja z nanašanjem plasti PE, smo izvedli poskus z bolj razredčenim vzorcem SPION-ov s končno koncentracijo $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$. Vzorec smo pripravili v mediju s pH 4.

Poleg tega smo postopek oblaganja izvedli z uporabo raztopine nizkomolekularnega hitosana-NV v 3 % (m/v) ocetni kislini. Raztopino ocetne kisline smo pripravili tako, da smo k 25 ml prečiščeni vodi dodali 1,5 ml led-ocetne kisline v 50 ml merilno bučko in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Uporabili smo raztopino hitosana-NV s končno koncentracijo v vzorcu C_{HIT-NV} = 50 µg/ml, ki smo jo pripravili s 3 % (m/v) raztopino ocetne kisline.

Postopek LBL oblaganja SPION-ov:

<u>1. plast PAA:</u> Vzorcu SPION-ov s koncentracijo $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$ smo dodali 7 μl raztopine anionskega PE (PAA) v mediju s pH 4 ter dopolnili z medijem tako, da je bila končna koncentracija PAA $c_{PAA} = 50 \ \mu g/ml$. Vzorec smo inkubirali 30 min, ga očistili v magnetnem polju in ga takoj pripravili za nanos naslednjega sloja PE.

Po čiščenju smo izvedli tudi redispergiranje vzorca v mediju s pH 4 ($V_{pH4} = 1500 \mu l$). Povprečno velikost delcev, PI in ZP delcev smo izmerili pred magnetnim ločevanjem in po magnetnem ločevanju in redispergiranju.

<u>2. plast hitosan-NV:</u> Po nanosu 1. plasti tj. PAA smo nanesli 2. plast kationskega PE tj. hitosan-NV tako, da smo k delcem, ki so se zbrali na magnetu, dodali 1500 μ l raztopine hitosana-NV, s koncentracijo c_{HIT-NV} = 50 μ g/ml ter pustili inkubirati 30 min. Vzorec smo očistili v magnetnem polju in ga takoj pripravili za nanos naslednjega sloja.

V tem delu smo delce po ločevanju v magnetnem polju redispergirali v prečiščeni vodi ($V_{H2O} = 1500 \mu$ l) in izmerili povprečno velikost delcev, PI in ZP pred in po čiščenju v magnetnem polju.

Kot kationski PE smo poleg hitosana-NV uporabili tudi PAH s končno koncentracijo v vzorcu $c_{PAH} = 50 \ \mu g/ml$. Postopek nanašanja PAH je bil enak kot v primeru uporabe hitosana-NV. Tudi tako obloženemu delcem smo izmerili povprečno velikost delcev in PI.

3.3.9 Postopek metode plast za plastjo (LBL)

Obloga na delcih je sestavljena iz več plasti nasprotno nabitih molekul PE. Maksimalno število plasti, ki smo jih nanesli na površino delcev SPION-ov, je bilo štiri, kar pomeni, da smo nanesli dve oblogi polikationa (hitosan ali PAH) in dve oblogi polianiona (PAA).

<u>1. plast PAA:</u> Vzorcu SPION-ov s končno koncentracijo $c_{2K}=1 \ \mu g/ml$ smo dodali 7 μl raztopne anionskega PE (PAA) v mediju s pH 4 tako, da smo dobili končno koncentracijo PAA $c_{PAA} = 50 \ \mu g/ml$ in pustili inkubirati 15 min. Vzorcu smo nato izmerili povprečno velikost delcev, PI in ZP. Nato smo ga očistili v magnetnem polju (5 min) in ga tako pripravili za nanos naslednjega sloja.

<u>2. plast hitosan-NV:</u> Vzorcu smo po nanosu PAA dodali 1500 μ l raztopine hitosana-NV v 3 % (m/v) ocetni kislini s končno koncentracijo v vzorcu c_{HIT-NV} = 50 μ g/ml ter pustili inkubirati 15 min. Vzorcu smo nato izmerili povprečno velikost delcev, PI in ZP. Nato smo ga očistili v magnetnem polju (5 min) in ga tako pripravili za nanos naslednjega sloja.

<u>**3. plast PAA:**</u> Zgoraj opisani 2. plasti smo dodali 1500 μ l raztopine anionskega PE (PAA) s končno koncentracijo PAA c_{PAA} = 50 μ g/ml, ki smo jo pripravili v mediju s pH 4 ter pustili inkubirati 15 min.

Vzorcu smo nato izmerili povprečno velikost delcev, PI in ZP. Nato smo ga očistili na magnetu (5 min) in ga tako pripravili za nanos naslednjega sloja.

<u>4. plast hitosan-NV:</u> Postopek je bil enak kot pri nanosu 2. plasti tj. nanosu hitosana-NV.

Postopek izmeničnega dodajanja anionskega PE (PAA) in kationskega PE (hitosana) smo ponavljali, dokler v vzorcu nismo opazili s prostim očesom vidnih agregatov. Čas inkubiranja po nanosu posameznega sloja se je tekom optimizacije postopka LBL oblaganja spreminjal.

Osnovni postopek LBL oblaganja smo tekom raziskav sproti optimizirali in spremljali vpliv različnih parametrov in sicer:

Uporabili smo spremenjen način nanosa <u>2. plasti hitosana-NV</u>: po čiščenju v magnetnem polju (5 min) smo vzorec z adsorbiranim slojem PAA najprej dispergirali v mediju s pH 4 (V_{pH4} = 500 μl) nato pa k le-temu dodali 1000 μl raztopine hitosana-NV v 3 % (m/v) ocetni kislini tako, da je bila končna koncentracija v vzorcu kot je prikazano v preglednici IV. Tako pripravljen vzorec smo poimenovali VZOREC 2, da bi ga ločili od VZORCA 1, ki smo ga pripravili po ustaljenem postopku dodajanja 2. plasti hitosana-NV.

Preglednica IV: Sestava vzorcev SPION-ov z različnimi koncentracijami PE (hitosana-NV). Končna koncentracija SPION-ov v vzorcu po dodatku raztopine hitosana je bila $c_{1K} = 1 \ \mu g/ml$.

	VZOREC 1		VZOREC 2		
c _{HIT-NV} (µg/ml)*	V _{HIT-NV} (µl)	$V_{pH4}(\mu l)$	V _{HIT-NV} (µl)	$V_{pH4}(\mu l)$	V _{OCET} (µl)
24,6	18,5	1481,5	/	/	/
50,0	37,5	1462,5	37,5	500	962,5
100,0	75,0	1425,0	75,0	500	925,0

*Končna koncentracija hitosana-NV v VZORCU 1 in v VZORCU 2. Končni volumen je 1500 μl.

- Po nanosu <u>1. plasti PAA</u> in <u>2. plasti hitosan-NV</u> smo ugotavljali vpliv redispergiranja v mediju s pH 4 in vpliv časa inkubiranja po dodatku 1. in 2. plasti na povprečno velikost delcev, PI in ZP. Meritve smo izvedli v predhodno določenih časovnih točkah: takoj po pripravi (t = 0 h) in po 1 h, 2 h in 96 h. Nato smo vzorec očistili v magnetnem polju (5 min) in redispergirali v mediju s pH 4. Delce smo takoj po izdelavi in po 1 h 5 min sonicirali v ultrazvočni kadički z namenom, da bi dosegli redispergiranje morebiti prisotnih agregatov pred meritvijo velikosti in PI.
- Po nanosu <u>1. plasti PAA</u> smo spremljali vpliv redispergiranja v mediju s pH 8 na povprečno velikost delcev, PI in ZP. Meritve smo izvedli za vzorce z obema proučevanima koncentracijama SPION-ov tj. $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ in $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$. In sicer smo naredili dva različna poskusa: (i) po nanosu 1. plasti PAA smo vzorec očistili v magnetnem polju (5 min) in redispergirali v 1500 μ l medija s pH 8; (ii) vzorec, ki smo ga dobili po postopku (i) smo ponovno očistili v magnetnem polju (5 min), redispergirali v mediju s pH 8 ter izmerili velikost delcev. Čas adsorpcije 1. plasti PAA je bil bodisi 30 min ali 60 min. Primerjalno smo vzorce po istem postopku redispergirali tudi v mediju s pH 4.

3.3.10 Premreževanje s TPP po oblaganju s hitosanom-NV

Pri nanosu drugega sloja nanoobloge tj. sloja hitosana-NV smo uporabili premreževalec TPP v naslednjih masnih razmerjih:

Hitosan-NV : TPP 4:1 (50 μg/ml : 12,5 μg/ml) Hitosan-NV : TPP 5:1 (50 μg/m l: 10,0 μg/ml) Hitosan-NV : TPP 6:1 (50 μg/ml : 8,3 μg/ml)

Postopek priprave:

Vzorcu SPION-ov (75 µl) s končno koncentracijo $c_{2K} = 1 \mu g/ml v mediju s pH 4 smo dodali 7 µl raztopine PAA, da smo dobili končno koncentracijo PAA v vzorcu <math>c_{PAA} = 50 \mu g/ml$ in inkubirali 30 min. Nato smo vzorec očistili v magnetnem polju (5 min) in ga redispergirali v mediju s pH 4 ($V_{pH4} = 500 \mu$ l) nato pa k temu dodali 2. plast tj. hitosan-NV. Dodali smo 1000 µl raztopine hitosana v 3 % (m/v) ocetni kislini, da je bila končna koncentracija hitosana v vzorcu 50 µg/ml. Vzorec smo inkubirali 30 min, nato pa 500 µl tega vzorca združili s 500 µl predhodno pripravljene raztopine TPP (končna koncentracija 12,5 µg/ml, 10,0 µg/ml in 8,3 µg/ml). Raztopine TPP smo pripravili v mediju s pH 4. Vzorcem smo izmerili povprečno velikost delcev,

PI in ZP takoj po izdelavi in po 24 h. Ko smo končali meritve po 24 h smo vzorec očistili v magnetnem polju (5 min) in ga redispergirali v mediju s pH 4, ter ponovno izmerili povprečno velikost delcev, PI in ZP.

V kasnejših poskusih smo uporabljali razmerje hitosan-NV : TPP je 4:1 oz. koncentracijo TPP v končnem vzorcu $c_{TPP} = 12,5 \ \mu g/ml$.

3.3.11 Uporaba acetatnega pufra s pH 5

V nalogi smo uporabili tudi acetatni pufer s pH 5 z namenom, da bi dosegli ionizacijo obeh PE tj. PAA in hitosana. Poleg tega z uporabo pufra dosežemo, da se pH medija med dodajanjem PE ne spreminja. Acetatni pufer smo pripravili tako, da smo k 9 ml 0,1 M ocetne kisline dodali 16 ml 0,1 M natrijevega acetata ter dopolnili do končnega volumna 50 ml s prečiščeno vodo. Pufer smo uravnali na pH 5.

Vzorcu SPION-ov s končno koncentracijo $c_{2K} = 1,0 \ \mu g/ml$, ki smo ga pripravili v acetatnem pufru s pH 5, smo dodali 7 μ l raztopine PAA, da smo dobili končno koncentracijo PAA $c_{PAA} = 50 \ \mu g/ml$ in pustili inkubirati 30 min. Vzorec smo očistili v magnetnem polju (5 min) in ga redispergirali v 500 μ l medija s pH 5. Nato smo dodali 1000 μ l raztopine hitosana-NV v acetatnem pufru s pH 5, da smo dobili končno koncentracijo hitosana v vzorcu 50 μ g/ml. Vzorec smo inkubirali 30 min in nato 500 μ l tega vzorca združili z raztopino premreževalca TPP tako, da je bila končna koncentracija TPP v vzorcu $c_{TPP}= 12,5 \ \mu g/ml$. Izmerili smo povprečno velikost delcev, PI in ZP.

3.3.12 Vpliv ionske moči medija na fizikalno stabilnost disperzije obloženih SPIONov

Vpliv ionske moči medija na SPION-e obložene s slojem PAA

Spremljali smo vpliv različnih koncentracij soli po dodatku 1. plasti PAA. Vzorcu SPION-ov s končno koncentracijo $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$, ki smo ga pripravili v mediju s pH 4, smo dodali 7 μl raztopine PAA, da je bila koncentracija PAA $c_{PAA} = 50 \ \mu g/ml$, in pustili inkubirati 15 min. SPION-e smo ločili od medija v magnetnem polju (5 min) in jih redispergirali v 1500 μ l medija s pH 4 in dodanimi različnimi koncentracijami soli.

Pripravili smo vzorce z naslednjimi končnimi koncentracijami NaCl: 0,20 mol/l, 0,15 mol/l, 0,10 mol/l, 0,05 mol/l, 0,01 mol/l. Vzorcem smo izmerili povprečno velikost delcev, PI in ZP.

Vpliv ionske moči na SPION-e obložene s slojem PAA in hitosana-NV

Vzorcu SPION-ov s končno koncentracijo $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml v mediju s pH 4 smo dodali 7 \ \mu l raztopine PAA, daje bila koncentracija PAA <math>c_{PAA} = 50 \ \mu g/ml$, in pustili inkubirati 15 min. SPION-e smo ločili od medija v magnetnem polju (5 min), jim dodali 1500 μl raztopine hitosana-NV v 3 % (m/v) ocetni kislini in z dodatkom različnih koncentraciji NaCl ter inkubirali 15 min. Končna koncentracija hitosana v vzorcu je bila 50 $\mu g/ml$. 500 μl tega vzorca smo združili s 500 μl raztopine TPP v mediju s pH 4 in enako koncentracijo soli ter inkubirali 15 min. Delce smo nato ločili od medija v magnetnem polju (5 min) ter redispergirali v 1500 μl medija s pH 4 in enako koncentracijo soli. Vzorcem smo nato izmerili povprečno velikost delcev, PI in ZP.

Pripravili smo vzorce z naslednjimi koncentracijami NaCl: 0,20 mol/l, 0,15 mol/l, 0,10 mol/l, 0,05 mol/l, 0,01 mol/l.

3.4 Vrednotenje disperzije SPION-ov

Po vsakem nanosu sloja PE ali spremembe medija smo disperzijo SPION-ov ovrednotili glede na spodaj navedene parametre:

3.4.1 Izgled disperzije

Vzorce disperzij SPION-ov smo organoleptično vrednotili po vsaki spremembi tekom celotne raziskave. S tem smo lahko enostavno, hitro, a grobo ocenili lastnosti vsakega vzorca preden smo opravili meritve. Opazovali smo disperzije razredčenih SPION-ov, disperzije razredčenih SPION-ov v medijih z različnimi pH-ji, disperzije razredčenih SPION-ov ob dodatku različnih koncentracij soli in disperzije SPION-ov po vsakem koraku LBL metode.

3.4.2 Povprečna velikost in porazdelitev velikosti delcev

Povprečni premer delcev (d) in PI smo merili z metodo fotonske korelacijske spektroskopije z napravo Zetasizer Nano ZS. Vzorec disperzije SPION-ov (~1 ml) smo odpipetirali v kiveto za merjenje velikosti in izmerili povprečno velikost delcev in PI. Za vsak vzorec smo izvedli tri meritve, rezultate pa podali kot povprečno vrednost. Meritve so potekale pri naslednjih pogojih: temperatura 25 °C, kot merjenja 173°, viskoznost medija 0,8872 mPas, lomni količnik medija 1,330 in valovna dolžina laserske svetlobe 633 nm.

3.4.3 Naboj na površini delcev

Gostoto naboja na površini SPION-ov smo določili z merjenjem ZP delcev z lasersko Dopplerjevo elektroforezo z napravo Zetasizer Nano ZS. Vzorec disperzije SPION-ov (~1 ml) smo napolnili v elektroforezno celico za merjenje ZP in izmerili ZP pri enakih pogojih kot pri merjenju povprečne velikosti delcev in PI.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Povprečna velikost delcev v disperziji SPION-ov s koncentracijo $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$, ki smo jo pripravili z redčenjem osnovnega vzorca, je bila 197,3 ± 2,6 nm in PI 0,126 ± 0,009. Povprečna velikost delcev v 10-krat bolj razredčenem vzorcu ($c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$) pa je bila 198,0 ± 5,5 nm in PI 0,196 ± 0,008. Rezultati kažejo, da je izmerjena povprečna velikost delcev pri obeh koncentracijah primerljiva.

Osnovna disperzija SPION-ov je bila svetlo rjave barve brez opazne sedimentacije delcev. Izmerjena povprečna velikost delcev obeh vzorcev SPION-ov je bila naša referenca tekom celotnega raziskovalnega dela, saj smo kasnejše meritve primerjali z osnovno vrednostjo in tako detektirali morebitne spremembe.

4.1 Vpliv lastnosti medija na velikost SPION-ov v disperziji

Ugotavljali smo vpliv pH in ionske moči disperznega medija na velikost SPION-ov v disperziji. Rezultati so prikazani v preglednici V. Rezultati kažejo, da se povprečna velikost delcev s povečevanjem pH disperznega medija povečuje. Delci v mediju s pH 7,4 (fiziološki pH) so bili najmanj stabilni in so že takoj ob pripravi tvorili črne agregate, ki so bili vidni s prostim očesom, zato vzorec ni bil primeren za meritev s PCS Povprečna velikost delcev je bila najmanjša v mediju s pH 4 in disperzija je bila stabilna tudi po čiščenju v magnetnem polju, zato smo ta disperzni medij uporabili v vseh nadaljnjih poskusih. Vzorcu SPION-ov, ki smo ga pripravili v mediju s pH 4 smo s pH lističem izmerili pH in opazili, da se je le-ta zvišal na 5,0 kar kaže, da dodatek disperzije SPION-ov poveča pH vrednost medija s katerim smo redčili vzorec.

Preolednica	V· Vnl	iv nH med	ija na veliko	st in PLSPIO	N-ov v disne	erziii
1 iogicamea	· · · p	i pri mea	iju nu vonko	St III I DI IOI	i or rampe	

pH medija v katerem smo pripravili disperzijo SPION-ov	4	5	5	5	7,4	10
Čiščenje v magnetnem poljuPo čiščenju smo izmerili velikost delcev v supernatantu.Prip vzor vzor očiš delcev v mag		Pripravljen vzorec ni bil očiščen v magnetnem polju.	Po čiščenju smo izmerili velikost delcev v supernatantu.	Po čiščenju smo izmerili velikost delcev v sedimentu.	Po čiščenju smo izmerili velikost delcev v supernatantu.	Po čiščenju smo izmerili velikost delcev v supernatantu.
d (nm)	197,3 ± 2,6	191,8 ± 0,4	523,0 ± 41,9	381,6 ± 8,8	/	483,4 ± 36,8
PI	0,126 ± 0,009	0,061 ± 0,015	$0,528 \pm 0,026$	$0,340 \pm 0,035$	/	0,291 ± 0,030
Organolepti čne lastnosti (ob pripravi)	Svetlo rjava disperzija, ni opazne sedimentacije.	Svetlo rjava disperzija, ni opazne sedimentacije.	rjava Svetlo rjava Svetlo rjava zija, ni disperzija, ni disperzija, ni e opazne opazne entacije. sedimentacije. sedimentacij		Svetlo rjava disperzija s prostim očesom vidni črni agregati.	Svetlo rjava disperzija, opazno agregiranje delcev.
Organolepti čne lastnosti (po 24 h)	rganolepti ne lastnosti no 24 h) Svetlo rjava disperzija, ni na oko vidnih delcev. / /		/	Svetlo rjava disperzija, sedimentacija, agregati na dnu.	Svetlo rjava disperzija, s prostim očesom vidni delci, opazna sedimentacija.	

Ker je izoelektrična točka proučevanih SPION-ov pri pH 6 (slika 11), so SPION-i najmanj stabilni v okolici te pH vrednosti medija, saj so pri tem pH medija celokupno brez naboja. Največja stabilnost je tako pričakovana v kislem (pH \sim 3,5) in bazičnem (pH > 8). Naši rezultati so pokazali večjo stabilnost delcev v mediju s kislim pH. Priprava pri fiziološkem pH stabilne disperzije SPION-ov pa je bil cilj oblaganja delcev z LBL metodo.

C _{NaCl}			
(mol/l)	d (nm)	PI	Organoleptične lastnosti
/	176,6 ± 1,2	$0,114 \pm 0,042$	Svetlo rjava disperzija.
0,01	$239,0 \pm 7,9$	$0,295 \pm 0,029$	Svetlo rjava disperzija.
0,05	$2626,0 \pm 100,9$	$0,515 \pm 0,079$	Svetlo rjava disperzija.
0,10	/	/	Svetlo rjava disperzija, s prostim očesom vidni delci.
			Svetlo rjava disperzija, s prostim očesom vidni delci,
0,15	/	/	ki jih s stresanjem ni mogoče redispergirati.
			Svetlo rjava disperzija s prostim očesom vidni delci,
0,2	/	/	ki jih s stresanjem ni mogoče redispergirati.

Preglednica VI: Vpliv ionske moči disperznega medija na velikost delcev.

Iz preglednice VI vidimo, da se z večanjem koncentracije soli v vzorcu tj. večanjem ionske moči disperznega medija veča tudi velikost delcev, dokler ne pridemo v območje nastajanja agregatov. Z večanjem koncentracije soli v disperznem mediju se tanjša debelina difuznega sloja na površini delcev, kar zmanjša stabilnost disperzije in pri določeni koncentraciji (v našem primeru $c_{NaCl} \ge 0,10 \text{ mol/l}$) pripelje do združevanja delcev v agregate (23).

Pri koncentraciji NaCl večji od 0,10 mol/l smo v disperziji opazili s prostim očesom vidne delce, zato ti vzorci niso bili primerni za PCS analizo. Organoleptično smo te vzorce ocenili tudi po 24 urah in ponovno opazili s prostim očesom vidne delce. Osmolarnost telesnih tekočin tj. fiziološkega okolja je 320 mOsm/l, kar ustreza koncentraciji NaCl 0,154 mol/l (0,9% oz. 9 g/l). Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da SPION-i po vnosu v okolje s fiziološko koncentracijo soli niso stabilni, zato bi nastopilo združevanje delcev v agregate, ki bi sedimentirali.

Vzorec s končno koncentracijo NaCl 0,01 mol/l smo po 24 urah skušali redispergirati z uporabo UZ (5 s). Po vizualnem pregledu vzorca smo ugotovili, da tudi po soniciranju vzorec vsebujejo s prostim očesom vidne delce, kar kaže da je nastopila ireverzibilna agregacija delcev. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da dodatek soli močno vpliva na fizikalno stabilnost disperzije SPION-ov, zato mora biti v postopku modifikacije površine SPION-ov koncentracija soli dovolj nizka, da zagotovimo stabilnost disperzije.

4.2 Oblaganje SPION-ov po metodi plast za plastjo

SPION-e smo izmenično oblagali z raztopino PE tj. polianiona in polikationa. Ker je bil površinski naboj (ZP) osnovnega vzorca SPION-ov pozitiven in je znašal $38,7 \pm 0,6$ mV, smo oblaganje pričeli z nanosom PAA, ki je polianion. Za drugi sloj smo uporabili polikation; bodisi hitosan ali PAH. Tako so se na površini delcev zaradi elektrostatskih interakcij med nasprotno nabitimi molekulami PE tvorile posamezne plasti obloge. Med nanosi posameznih plasti smo vzorec vedno očistili v magnetnem polju. Postopek smo izmenično ponavljali, dokler nismo opazili združevanja delcev v agregate. Naš cilj je bil nanesti čim več plasti s tem, da delci v disperziji ostanejo stabilni. Stabilnost disperzije smo spremljali organoleptično, z meritvami povprečne velikost delcev, PI in ZP.

4.2.1 1. plast: PAA

4.2.1.1 Vpliv koncentracije PAA

V tem delu raziskave smo želeli ugotoviti katera koncentracija PAA je za nadaljnji postopek oblaganja SPION-ov po metodi LBL najbolj optimalna, zato smo merili povprečno velikost delcev in PI v vzorcih z različno koncentracijo PAA (slika 13, preglednica VII).



Slika 13: Vpliv koncentracije PAA na povprečno velikost SPION-ov v disperziji.

D 1. 1	T. X71!	1			1'14' CD		1
Prediednica VI	\mathbf{r} v nuv	Koncentracije	PAA na	norazdentev	Venkosti NP	\mathbf{U} \mathbf{U} \mathbf{N} - \mathbf{O} \mathbf{V} \mathbf{V} \mathbf{O}	119ner7111
I ICZICUIIICA VI	\mathbf{I}	Koncentracije	/ I / I / I IIU		vennosu or.		

c _{PAA} (µg/ml)	PI (takoj po pripravi)	PI (po petih dneh)
50	$0,130 \pm 0,001$	$0,248 \pm 0,083$
100	$0,104 \pm 0,020$	$0,329 \pm 0,051$
200	$0,341 \pm 0,030$	/
400	$0,312 \pm 0,009$	/

Začetna velikost delcev po nanosu 1. plasti PAA pri končni koncentraciji PAA v vzorcu 50 μ g/ml (povprečna velikost delcev: 193,9 ± 1,4 nm) ali c_{PAA} = 100 μ g/ml (povprečna velikost delcev: 195,8 ± 2,3 nm) se v primerjavi z vzorcem brez nanosa PAA (povprečna velikost delcev: 197,3 \pm 2,6 nm) ni bistveno spremenila. PI za vzorec s končno koncentracijo PAA c_{PAA} = 50 μ g/ml znaša 0,130 \pm 0,001 in za vzorec s koncentracijo PAA c_{PAA} = 100 μ g/ml 0,104 \pm 0,020 kar kaže, da je v obeh vzorcih homogena porazdelitev velikosti delcev, le-ta pa je primerljiva tudi s PI izhodne disperzije SPION-ov $(0,126 \pm 0,009)$. Po petih dneh pa se povprečna velikost in PI povečata, kar kaže, da vzorec SPION-ov s PAA dolgoročno ni stabilen. Velikost delcev v obeh vzorcih z višjo koncentracijo PAA tj. $c_{PAA} = 200 \ \mu g/ml$ in $c_{PAA} = 400 \ \mu g/ml$ se je po petih dneh močno povečala, kar je privedlo do opazne sedimentacije delcev, zato ti vzorci niso ustrezali zahtevam za PCS meritev. PI vzorcev že takoj ob pripravi narašča z naraščajočo koncentracijo PAA kar nakazuje na večjo heterogenost porazdelitve velikosti delcev v vzorcu. PI se poveča od vrednosti $0,130 \pm 0,001$ takoj ob pripravi na vrednost > 0,3, kar pa za nadaljnje oblaganje delcev ni ugodno, saj je porazdelitev velikosti delcev v takem vzorcu preveč heterogena. Za oblaganje si želimo karseda homogeno populacijo velikosti delcev (čim manjši PI). Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili, da je za oblaganje najoptimalnejša koncentracija PAA v končnem vzorcu 50 µg/ml, ki smo jo uporabljali v nadaljnjih korakih LBL oblaganja.

4.2.2 2. plast: hitosan

4.2.2.1 Vpliv koncentracije hitosanijevega klorida

Po nanosu 1. plasti anionskega PE PAA ($c_{PAA} = 50 \ \mu g/ml \ v mediju \ s \ pH \ 4$) smo začeli z nanosom 2. plasti, ki jo je predstavljal kationski PE hitosanijev klorid. Pri vseh uporabljenih koncentracijah hitosanijevega klorida v vodnem mediju s pH 5 smo takoj po pripravi opazili s prostim očesom vidne delce. Takšni delci s časom tvorijo večje agregate in niso primerni za nadaljnje oblaganje z LBL metodo. Poskus smo v naslednji fazi izvedli tako, da smo raztopino hitosanijevega klorida s končno koncentracijo $c_{HIT-CI} = 50 \ \mu g/ml \ v \ vzorcu \ pripravili \ v \ vodnem$ mediju s pH 4, da bi dosegli večji obseg ionizacije aminskih skupin hitosana. Povprečno velikostdelcev v tako pripravljenem vzorcu je znašala 1712,0 ± 630,4 nm in PI 0,972 ± 0,049, kar kaže,da je tudi v takšnem vzorcu prišlo do agregiranja delcev. Zato smo vzorec sonicirali z uporaboultrazvočne sonde (5 s) in ponovno izmeril velikost. Le-ta je znašala 472,1 ± 12,8 nm in PI 0,362± 0,043, kar kaže na znatno zmanjšanje povprečne velikosti delcev zaradi vnosa energije s soniciranjem, ki je povzročila razbitje prisotnih agregatov na manjše delce. Preverili smo tudi izgled vzorca po 24 h in opazili nekaj oborine. Vzorec smo ponovno sonicirali 5 s in izmerili velikost, ki je bila primerljiva tisti pred 24 h tj. 491,5 \pm 68,2 nm in PI 0,447 \pm 0,064. Dokazali smo, da lahko z uporabo soniciranja zmanjšamo velikost delcev na velikost, ki smo jo izmerili takoj po nanosu 2. plasti in soniciranju, a velikost delcev je še vedno približno 2-krat večja kot začetna velikost SPION-ov v disperziji, ki je znašala 193,9 \pm 1,4 nm.

4.2.3 Vpliv časa soniciranja na velikost SPION-ov po dodatku 2. plasti tj. hitosanijevega klorida

Nadalje nas je zanimal vpliv časa soniciranja na velikost SPION-ov po dodatku 2. plasti, ki jo je predstavljal hitosanijev klorid. Najprej smo vzorcema s končno koncentracijo hitosanijevega klorida $c_{HIT-CI} = 50 \ \mu g/ml$ in $c_{HIT-CI} = 100 \ \mu g/ml$ izmerili velikost delcev, ki je znašala pri koncentraciji $c_{HIT-CI} = 50 \ \mu g/ml$ 3949 ± 899,1 nm, pri koncentraciji $c_{HIT-CI} = 100 \ \mu g/ml$ pa 2581 ± 211,6 nm. Ker so bili delci preveliki in so agregirali, smo poskušali zmanjšati njihovo velikost z UZ sondo in sicer smo spremljali vpliv časa delovanja UZ sonde na velikost delcev (slika 14, preglednica VIII).



Slika 14: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od časa soniciranja za vzorce z različno koncentracijo hitosanijevega klorida. Začetna velikost delcev pred soniciranjem je bila 3949 ± 899 nm ($c_{HIT-CI} = 50 \ \mu g/ml$) in 2581 ± 211,6 nm ($c_{HIT-CI} = 100 \ \mu g/ml$).

t _{UZ sonde}	d (nm)		d (nm)	
(s)	$\mathbf{c}_{\mathrm{HIT-Cl}} = 50 \ \mathrm{\mu g/ml}$	PI	$\mathbf{c}_{\mathrm{HIT-Cl}} = 100 \ \mathrm{\mu g/ml}$	PI
0	3949 ± 899	$0,900 \pm 0,173$	2581 ± 212	$0,961 \pm 0,068$
5	$352,2 \pm 1,6$	$0,265\pm 0,018$	$475,0 \pm 7,2$	$0,290 \pm 0,071$
10	$286,7 \pm 2,9$	$0,263 \pm 0,027$	$400,7 \pm 4,2$	$0,270 \pm 0,025$
15	$262,9 \pm 7,6$	$0,208 \pm 0,036$	$369,5 \pm 8,0$	$0,270 \pm 0,014$
20	$281,1 \pm 5,3$	$0,273 \pm 0,048$	$360,2 \pm 2,6$	$0,258 \pm 0,013$
25	$491,5 \pm 68,2$	$0,\!447 \pm 0,\!064$	$552,6 \pm 20,7$	$0,436 \pm 0,013$

Preglednica VIII: Vpliv časa soniciranja na povprečno velikost in porazdelitev velikosti SPIONov v disperziji pri dodatku različnih koncentracij hitosanijevega klorida.

Rezultati kažejo, da je optimalni čas soniciranja 15 s, saj v tem času dosežemo najmanjšo povprečno velikost delcev v vzorcu, s podaljševanjem časa soniciranja pa se velikost delcev in PI vzorca povečata (slika14, preglednica VIII). Velikost delcev v disperziji smo preverili tudi po 24 h in sicer za vzorec s končno koncentracijo hitosana $c_{HIT-CI} = 50 \ \mu g/ml$ (čas soniciranja 25 s) in ugotovili, da se velikost delcev ni bistveno spremenila in je znašala 543,3 ± 5,2 nm. ZP delcev v tem vzorcu je bil - 10,7 ± 0,4 mV. S tem smo dokazali, da je vzorec fizikalno stabilen vsaj en dan. Glede na vrednost ZP pa lahko sklepamo, da ta vzorec ne bo stabilen skozi daljše časovno obdobje, saj velja, da mora biti zeta potencial vsaj ± 30 mV, da je elektrostatsko stabilizirana koloidna disperzija stabilna (7).

Po končanem soniciranju (25 s) smo vzorec očistili v magnetnem polju in redispergirali v prečiščeni vodi. Ugotovili smo, da so delci agregirali kar kaže, da vzorec ni stabilen, ko odstranimo prebitek PE.

4.2.4 Optimizacija postopka: uporaba hitosana-NV in bolj razredčenega vzorca SPION-ov

Zaradi znatnega povečanja povprečne velikosti delcev in PI po nanosu slojev PE smo se odločili, da bomo LBL metodo izvedli v bolj razredčenem vzorcu. Tako smo disperzijo SPION-ov s koncentracijo SPION-ov v vzorcu $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ 10-krat razredčili z medijem s pH 4 in dobili vzorec s koncentracijo SPION-ov $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$. Ko smo nanesli 1. plast PAA s končno koncentracijo PAA $c_{PAA} = 50 \ \mu g/ml$ v vzorcu je bila povprečna velikost delcev 168,2 ± 2,0 nm in PI 0,113 ± 0,013. Tudi, ko smo vzorec očistili v magnetnem polju in redispergirali v mediju s pH 4 smo dobili povprečno velikost delcev 200,9 ± 4,7 nm, PI 0,258 ± 0,010 in ZP -17,5 ± 0,2 mV, kar pomeni da se je 1. plast PE PAA adsorbirala na delce in jo s spiranjem nismo odstranili iz površine.

Ker smo po nanosu 2. plasti hitosanijevega klorida za vzorec s koncentracijo $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$ opazilina oko vidne delce, ki bi s časom agregirali smo namesto hitosana kot 2. plast uporabili kationski PE PAH in dobili naslednje rezultate: povprečna velikost delcev 9489 ± 2039 nm in PI 0.919 ± 0.140 . Kot kažejo rezultati so delci agregirali in vzorec je posledično zelo polidisperzen, zato smo zaključili, da kationski PE PAH za naše oblaganje ni ustrezen. Literatura navaja, da s prilagajanjem pH vrednosti disperznega medija lahko vplivamo na naboj PE in s tem na gostoto verig PE na površini delcev, ki jih oblagamo, ter posledično na njihovo konformacijo in medsebojne interakcije (34). PAA je popolnoma ionizirana pri pH 6,5, PAH pa je 95 %-100 % ioniziran pri pH 2 (34, 35). Medij v katerem smo pripravili raztopini obeh PE v naših raziskavah je imel pH 4. Kar pomeni, da imamo bolj ionizirano plast PAH v primerjavi s PAA, ki je pri tem pH manj ionizirana. Dokazano je da debelina plasti PE PAH narašča z naraščajočim pH medija, medtem ko debelina PAA pada z naraščajočim pH medija. Spremembe v debelini adsorbirane plasti PE lahko prepisujemo povečani gostoti naboja verig PAA. Debelina nanešene 1. plasti (PAA) je tanjša zaradi zmanjšanja deleža zvite konformacije verig na površini, saj le-te zaradi odboja med nabitimi segmenti zavzamejo bolj linearno iztegnjeno konformacijo. Povečanje debeline 2. plasti (PAH) pa lahko tudi pripisujemo povečani gostoti naboja adsorbirane 1. plasti PAA. Več nasprotno nabitega PE PAH je potrebno za nevtralizacijo naboja ioniziranih verig PE PAA (35). Vzorcu z že naneseno 1. plastjo PAA (c_{PAA} = 50 µg/ml) smo nanesli 2. plast (hitosan-NV) ter izmerili povprečno velikost delcev 218,6 \pm 2,7 nm, PI 0,300 \pm 0,037 in ZP 40,1 \pm 0,6 mV. Rezultat kaže, da se je velikost delcev po nanosu 2. plasti povečala za ~50 nm, saj je bila velikost pred nanosom plasti hitosana-NV 168,2 ± 2,0 nm in PI 0,113 ± 0,013. Vzorec smo očistili v magnetnem polju, da bi odstranili nevezane molekule PE in ga redispergirali v prečiščeni vodi. Dobili smo naslednje rezultate: povprečna velikost delcev 1156 ± 306 nm, PI 0.841 ± 0.157 in ZP 9.7 ± 0.2 mV. Velikost delcev se je po čiščenju v magnetnem polju močno povečala, kar lahko razložimo s tem, da smo s prečiščeno vodo sprali s površine delcev tudi šibko vezan sloj hitosana (zato se ZP delcev po čiščenju zmanjša) in posledično so se delci začeli združevati, kar nam nakazuje tudi povečanje PI (23).

Z merjenjem ZP smo sicer potrdili pozitiven naboj na delcih, kar pomeni, da se je sloj hitosana absorbiral na površino delcev, vendar je vrednost ZP nizka kar kaže na fizikalno nestabilnost disperzije.

4.2.5 Vpliv nanašanja plasti PE na povprečno velikost, polidisperznost in ZP delcev

Z meritvami povprečne velikosti delcev, PI in ZP smo spremljali, koliko posamezna plast PE doprinese k povprečni velikosti delcev in, ali je vezava PE na površino delcev uspešna (vpliv na ZP).



Slika 15: Povprečna velikost delcev in ZP delcev v disperziji v postopku LBL oblaganja.

Nanos posameznih plasti	PI
1. plast: PAA	$0,284 \pm 0,002$
2. plast: hitosan-NV	$0,494 \pm 0,138$
3. plast: PAA	$0,734 \pm 0,066$
4. plast: hitosan-NV	$0,553 \pm 0,118$

Preglednica IX: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji v postopku LBL oblaganja.

Iz slike 15 in preglednice IX je razvidno, da se povprečna velikost delcev z nanašanjem slojev PE povečuje, kar je tudi pričakovano. Povečanje velikosti delcev pa je večje od pričakovanj, saj bi se naj z nanosom enega sloja debelina obloge povečala za okoli ~1 nm (25, 34). V našem primeru se je velikost povečala za ~210 nm. Prav tako se povečuje PI, kar nakazuje, da je po dodatku vsakega novega sloja distribucija velikosti delcev vse bolj polidisperzna oz. heterogena. To za naš vzorec SPION-ov ni ugodno, saj smo želeli pripraviti čim bolj homogeno disperzijo z

ozko porazdelitvijo velikosti delcev. Z merjenjem ZP smo dokazali, da se je na delce uspešno izmenično adsorbiral sloj anionskega in kationskega PE, saj se vrednost ZP izmenično spreminja iz negativne v pozitivno (slika 15). Po nanosu sloja PAA je ZP negativen in po nanosu sloja hitosana-NV je ZP delcev pozitiven. V splošnem velja, da so stabilne koloidne disperzije z absolutno vrednostjo ZP nad 30 mV (7). Rezultati kažejo, da je po nanosu 1. plasti (PAA) ZP - 30,6 mV in po nanosu 2. plasti (hitosan-NV) ZP +53,3 mV. Po nanosu 3. plasti (PAA) je ZP le - 15,7 mV in se po nanosu 4. plasti (hitosana-NV) ponovno poveča na +27,9 mV. Manjša sprememba ZP po nanosu 3. In 4. sloja je lahko posledica prisotnosti nespranih molekul PE, ki se adsorbirajo na površino delcev in zmanjšajo celokupni naboj.

Razlika v debelini obloge je lahko posledica delno ionizirane PAA v plasti pri pH vrednosti 4 (25). PAA je popolnoma ionizirana pri pH 6,5 (33). V primeru popolne ionizacije se PAA adsorbira v iztegnjeni konformaciji medtem, ko se v delno ioniziranem stanju neionizirani deli adsorbirajo kot zanke in spirale kar pa poveča debelino plasti (25).

Neenakomerna rast debeline LBL obloge zaradi majhnega obsega ionizacije in posledično šibke vezave pa je lahko tudi posledica spiranja/redispergiranja z medijem pred dodajanjem novega sloja PE ali v postopku nanašanja naslednjega sloja PE obloge. To lahko razložimo s preureditvijo strukture obloge PE in nastankom PE kompleksov (34).

4.2.6 Vpliv koncentracije hitosana-NV in način dodajanja 2. plasti PE na velikost delcev

Ker so bili delci po nanosu sloja hitosana-NV po prvotnem postopku preveliki, smo v naslednjem poskusu želeli preveriti kako način dodajanja hitosan-NV in njegova koncentracija vplivata na velikost delcev v disperziji.



Slika 16: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od koncentracije in načina dodajanja 2. plasti (hitosana-NV).

Preglednica X: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji pri različnih koncentracijah hitosana-NV.

c _{HIT-NV} (µg/ml)	Vzorec	PI
24,6	VZOREC 1	$0,972 \pm 0,043$
50,0	VZOREC 1	0,857±0,153
100,0	VZOREC 1	$0,409 \pm 0,262$
24,6	VZOREC 2	/
50,0	VZOREC 2	0,382 ± 0,010
100,0	VZOREC 2	$0,369 \pm 0,101$

Najprej smo nanesli sloj PAA in nato še plast hitosana-NV na površino SPION-ov. Primerjali smo povprečno velikost delcev in PI v vzorcih, ki smo jih pripravili z različno koncentracijo hitosana-NV, ki smo ga pripravili v raztopini ocetne kisline in ga dodali bodisi k v magnetnem polju očiščenim SPION-om (VZOREC 1) ali pa smo po čiščenju SPION-e najprej dispergirali v mediju s pH 4 in nato dodali raztopino hitosana-NV v raztopini ocetne kisline (VZOREC 2). Kot kažejo rezultati (slika 16, preglednica X) je optimalna koncentracija hitosana $c_{HIT-NV} = 50 \mu g/ml$, saj je povprečna velikost delcev pri VZORCU 2 373,6 ± 23,2 nm in PI 0,382 ± 0,010. Povprečna velikost delcev je bila manjša, če smo SPION-e pred nanosom 2. plasti redispergirali v mediju s pH 4. Na koncu smo za VZOREC 2 izmerili še ZP, ki znaša 52,3 ± 1,9 mV, kar pomeni, da se je

hitosan-NV adsorbiral na površino delcev, saj je površina delcev pozitivno nabita. Hitosan s pKa 6,3 je polikation in raztopljen v kislem mediju ima ionizirane -NH⁺₃ skupine (31). Glede na velik ZP delcev v disperziji, lahko sklepamo, da bo takšna disperzija delcev fizikalno stabilna.

Oblaganje SPION-ov z LBL metodo smo ponovili s tem, da smo upoštevali predhodne ugotovitve ob dodajanju hitosana. Rezultati kažejo, da smo z optimizacijo postopka oblaganja uspeli pripraviti povprečno manjše delce razen po nanosu 4. plasti, ko se je velikost delcev znatno povečala (slika 17, preglednica XI). Bolj debelo plast je mogoče pripisati prisotnosti šibko vezane PAA v plasti pri dodajanju drugega sloja hitosana, kar omogoča difuzijo hitosana v plast PAA in s tem se tvori bolj debel adsorbiran sloj (36). Z merjenjem zeta potenciala pa smo se prepričali, da se je površinski naboj delcev po nanosu vsakega sloja ustrezno spremenil.



Slika 17: Povprečna velikost delcev in ZP pri oblaganju z LBL metodo.

Preglednica XI: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji pri oblaganju z LBL metodo.

Dodajanje posameznih	
plasti	РІ
1. plast: PAA	$0,148 \pm 0,053$
2. plast: hitosan-NV	$0,317 \pm 0,025$
3. plast: PAA	$0,600 \pm 0,089$
4. plast: hitosan-NV	0,866 ± 0,118

4.2.7 Vpliv redispergiranja v kislem in v bazičnem mediju po posamezni fazi LBL oblaganja in vpliv časa inkubiranja na velikost delcev v disperziji

Po tem, ko smo vzorec po vsakem dodanem sloju očistili v magnetnem polju, smo sediment redispergirali v vodni raztopini s pH 4 in šele nato dodali naslednji sloj obloge. Z redispergiranjem v mediju s pH 4 smo odstranili prebitek molekul polianiona v našem vzorcu. Da je spiranje z namenom, da se znebimo nevezanih PE in preprečimo kontaminacijo raztopin pri dodajanju nadaljnjih slojev PE, priporočljivo, so dokazali že v predhodnih raziskavah (23).



Slika 18: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od časa inkubiranja med nanosom posamezne plasti PE. Vzorce smo po inkubiranju očistili v magnetnem polju in redispergirali v mediju s pH

4.

Preglednica XII: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji pri različnih časih inkubiranja med nanosom posamezne plasti PE. Vzorce smo po inkubiranju očistili v magnetnem polju in redispergirali v mediju s pH 4.

Čas (h)	0	1	2	96
Dodajanje posameznih plasti	PI			
1. plast: PAA	0,318 ± 0,008	0,256 ± 0,029	0,223 ± 0,096	0,272 ± 0,011
2. plast: hitosan-NV	0,895 ± 0,181	0,793 ± 0,187	0,886 ± 0,198	/
2. plast: hitosan-NV + UZ kadička	0,772 ± 0,296	0,635 ± 0,232	/	/

Rezultati kažejo, da se velikost delcev po nanosu 1. plasti (PAA) pri različnih časih inkubiranja vzorca po dodatku PAA bistveno ne spremeni (slika 18, preglednica XII). Prav tako vrednost PI po nanosu 1. plasti (PAA) kaže na sorazmerno homogenost vzorca, če le-tega inkubiramo vsaj 1 h. Delci so se znatno povečali po nanosu 2. plasti (hitosan-NV), čiščenju v magnetnem polju in redispergiranju v mediju s pH 4. Takšno obnašanje lahko razložimo s preureditvijo strukture plasti PE in nastankom polielektrolitskih kompleksov hitosan-PAA na površini delcev. Takšni kompleksi so bili šibko vezani na površino delcev in se lahko odstranijo med redispergiranjem v mediju s pH 4. Do podobnih ugotovitev so prišli v raziskavi, kjer so proučevali debelino LBL obloge pri nanašanju PE PAA/PAH (34). Opazili smo, da čas inkubiranja po dodatku raztopine hitosana-NV vpliva na velikost in polidisperznost vzorca bolj kot čas inkubiranja v fazi nanašanja 1. plasti (PAA) LBL obloge. Povprečna velikost delcev po nanosu plasti hitosana je bila ne glede na čas inkubiranja v mikrometrskem območju in tako prevelika za uspešno nadaljevanje postopka LBL oblaganja, zato smo po nanosu 2. plasti (hitosan-NV) vzorec 5 min sonicirali v ultrazvočni kadički. Povprečna velikost delcev se je s soniciranjem zmanjšala in sicer pri vzorcu, ki smo ga inkubirali 1 h med nanosom 2. plasti (hitosan-NV), skoraj za polovico tj. iz 1532 ± 1234 nm na 716,8 $\pm 308,3$ nm. Delcem v tem vzorcu smo izmerili tudi ZP, ki je znašal +14,0 ± 2,8 mV. Ker je vrednost ZP manjša od 30 mV, lahko sklepamo, da tak vzorec dolgoročno ne bo fizikalno stabilen. Ultrazvočna kadička deluje na principu kavitacije, ki razbije prisotne agregate delcev v vzorcu na manjše enote (37). Poskus smo ponovili tudi z vzorcem, ki smo ga inkubirali 15 min med nanosom plasti hitosana-NV. Delce smo po nanosu 2. plasti (hitosan-NV) očistili in redispergirali v mediju s pH 4 ter izmerili povprečno velikost delcev 4861 ± 3719 nm. Organoleptični pregled vzorca pred meritvijo ni pokazal prisotnosti vidnih delcev, medtem ko smo po končani meritvi v vzorcu opazili vidne delce, kar pomeni, da so delci agregirali med samo meritvijo.

Po nanosu 1. plasti (PAA) in čiščenju v magnetem polju (5 min) smo vzorce redispergirali v mediju s pH 8 izmerili povprečno velikost delcev in PI. Nato smo vzorce ponovno očistili v magnetnem polju ter redispergirali v mediju s pH 8 in ponovno izmerili povprečno velikost delcev in PI. Proučili smo vzorce SPION-ov z višjo ($c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$) in nižjo ($c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$) koncentracijo v končnem vzorcu, ki smo jih inkubirali v fazi oblaganja s PAA različno dolgo. Ker je anionski PE PAA močno nabit tj. popolnoma ioniziran v bazičnem mediju, smo

pričakovali, da se bo po večkratnem čiščenju v magnetnem polju in redispergiranju v mediju s pH 8 velikost delcev ohranila nespremenjena.



Slika 19: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od časa inkubiranja v fazi oblaganja s PAA in vpliv ponavljajočega čiščenja v magnetnem polju in redispergiranja v mediju s pH 8 za vzorec s končno koncentracijo SPION-ov v vzorcu $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ in $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$.

Preglednica XIII: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji v odvisnosti od časa inkubiranja v fazi oblaganja s PAA in vpliv ponavljajočega čiščenja v magnetnem polju in redispergiranja v mediju s pH 8 za vzorec s končno koncentracijo SPION-ov v vzorcu $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ in $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$.

t (min)		30	60
Redispergiranje vzorca v mediju	c_{vz} (µg/ml)		
s pH 8		PI	
1. redispergiranje	1	$0,232 \pm 0,013$	$0,321 \pm 0,031$
2. redispergiranje		$0,370 \pm 0,063$	$0,470 \pm 0,073$
1. redispergiranje	10	$0,399 \pm 0,021$	$0,350 \pm 0,075$
2. redispergiranje		$0,322 \pm 0,045$	$0,174 \pm 0,010$

Rezultati kažejo (slika 19, preglednica XIII), da čas inkubiranja in prvo redispergiranje v mediju s pH 8 v fazi oblaganja s PAA ne vpliva bistveno na velikost delcev za vzorec SPION-ov z nižjo

končno koncentracijo ($c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$) saj je le-ta po 30 in 60 min podobna in primerljiva. Povprečna velikost delcev pri času inkubiranja 30 min je tako $215 \pm 4,6$ nm (PI 0,232 $\pm 0,013$) in pri času inkubiranja 60 min 241,2 \pm 19,2 nm (PI 0,321 \pm 0,031). Spremembo velikosti smo zaznali po drugem redispergiranju, tako za vzorec s končno nižjo ($c_{2K} = 1 \mu g/ml$) kot za vzorec s končno višjo ($c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$) koncentracijo SPION-ov. Povprečna velikost delcev se je pri nižji končni koncentraciji SPION-ov ($c_{1K} = 1 \mu g/ml$) po 30 min inkubiranja in drugem redispergiranju tako povečala za~105 nm, po 60 min inkubiranja in drugem redispergiranju pa se je povečala za~ 193 nm. Povprečna velikost delcev je bila pri višji končni koncentraciji SPION-ov ($c_{1K} = 10$ μ g/ml) po 30 min inkubiranja in prvem redispergiranju 671,9 ± 11,2 nm (PI 0,399 ± 0,021) in se je pri drugem redispergiranju le malo povečala (712,1 \pm 32,3 nm, PI 0,322 \pm 0,045). Povečanje velikosti delcev z večkratnim redispergiranjem v mediju s pH 8 si lahko razlagamo kot, da z redispergiranjem odstranimo s površine delcev tudi nekaj polielektrolita, zato delci niso več stabilizirani in agregirajo, posledično se poveča povprečna velikost delcev in PI, kar nakazujejo tudi rezultati. Povprečna velikost delcev v disperziji pa je bila v obeh primerih znatno večja od začetne velikosti delcev, ki smo jih obložili s PAA in takoj po dodatku PE izmerili velikost delcev, ki je znašala 193 ± 1.4 nm in PI 0.130 ± 0.001 . Naše ugotovitve so v skladu z rezultati, ki jih je objavil Cranford s sodelavci (34).

Rezultate smo primerjali še z redispergiranjem delcev v mediju s pH 4, kjer smo vzorce prav tako dvakrat čistili v magnetnem polju in jih vsakič redispergirali v mediju s pH 4 (slika 20, preglednica XIV). Rezultati kažejo, da je velikost delcev po prvem in drugem čiščenju v magnetnem polju za vzorec z nižjo končno koncentracijo SPION-ov ($c_{2K} = 1 \mu g/ml$) primerljiva tako po redispergiranju v mediju s pH 4 kot po redispergiranju v mediju s pH 8, kar pa ne velja za vzorec z višjo končno koncentracijo SPION-ov ($c_{1K} = 10 \mu g/ml$), kjer smo po prvem in drugem redispergiranju v mediju s pH 4 opazili s prostim očesom vidne delce in zato tak vzorec ni bil primeren za PCS analizo. Medtem ko je povprečna velikost delcev v mediju s pH 8 po prvem 558,7 ± 33,6 nm in 472,7 ± 4,6 nm po drugem redispergiranju. Povečanje delcev pri višji začetni koncentraciji SPION-ov lahko razložimo z vplivom ponavljajočega izpostavljanja delcev magnetnemu polju, kar lahko sproži združevanje delcev zaradi delovanja magnetnih sil na delce. Magnetne sile tako prevladajo nad odbojnimi elektrostatskimi interakcijami, kar vodi v združevanje delcev v agregate. Učinek magnetnih sil je večji, kadar je površinski naboj delcev manjši; torej v primeru višjega pH disperznega medija. Vzrok manjše velikosti delcev po drugem redispergiranju v mediju s pH 8 je verjetno vpliv večje stopnje ionizacije PAA v mediju s pH 8. Obloga iz PAA je močneje elektrostatsko vezana na površino delcev in jo je zato težje odstraniti z delcev (34). Skoraj popolnoma ionizirana PAA v mediju s pH 8 pa zavzame tudi bolj iztegnjeno konformacijo na površini delcev in posledično je adsorbirana plast tanjša (35). Pri drugem spiranju se tako s površine delcev lahko odstranijo le šibko vezane molekule PE, ki jih je v mediju s pH 8 manj kot pri mediju s pH 4, zato se povprečna velikost delcev v primeru vzorca s pH 8 malo zmanjša, medtem ko se v primeru vzorca s pH 4 znatno poveča (s spiranjem sprožimo odstranjevanje PE s površine delcev in združevanje delcev v večje skupke).



Slika 20: Povprečna velikost delcev po prvem (1x) in drugem (2x) čiščenju v magnetnem polju in redispergiranje delcev v mediju s pH 4 ali 8 za vzorec s končno koncentracijo SPION-ov v vzorcu $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ in $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$.

Preglednica XIV: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji po prvem in drugem čiščenju v magnetnem polju in redispergiranju delcev v mediju s pH 4 ali 8 za vzorca s končno koncentracijo SPION-ov v vzorcu $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ in $c_{2K} = 1 \ \mu g/ml$.

Končna koncentracija SPION-ov v vzorcu	1 μg/ml	10 µg/ml
Čiščenje v magnetnem polju	PI	
Enkratno čiščenje in redispergiranje v pH 4	$0,306 \pm 0,009$	/
Dvakratno čiščenje in redispergiranje v pH 4	$0,524 \pm 0,109$	/
Enkratno čiščenje in redispergiranje v pH 8	0,321 ± 0,031	$0,350 \pm 0,075$
Dvakratno čiščenje in redispergiranje v pH 8	$0,470 \pm 0,073$	$0,174 \pm 0,010$

Pri končni koncentraciji vzorca SPION-ov $c_{1K} = 10 \ \mu g/ml$ smo pri prvem in drugem redispergiranju v mediju s pH 4 takoj opazili vidne delce. Ker tak vzorec ni primeren za PCS analizo, meritev nismo izvedli.

4.2.8 Vpliv premreževanja hitosanske obloge s TPP

Tekom raziskav smo proučili učinek TPP, ki premrežuje molekule kationskega PE tj. hitosana-NV, na povprečno velikost delcev v disperziji (slika 21, preglednica XV).



Slika 21: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od časa inkubiranja po dodatku različnih koncentracij TPP. Velikost delcev po 24 h in čiščenju v magnetnem polju in redispergiranju v mediju s pH 4 je bila za vzorec s koncentracijo TPP $c_{TPP} = 12,5 \ \mu g/ml \ 2548 \pm 445 \ nm, za$ koncentracijo TPP $c_{TPP} = 10,5 \ \mu g/ml \ 1778 \pm 557 \ nm$ in za koncentracijo TPP $c_{TPP} = 8,3 \ \mu g/ml \ 2965 \pm 1814 \ nm.$

Preglednica XV: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji v odvisnosti od časa inkubiranja po dodatku različnih koncentracij TPP.

c _{TPP} (µg/ml)	12,5	10,5	8,3	
čas (h)	РІ			
0	$0,270 \pm 0,043$	$0,243 \pm 0,030$	$0,262 \pm 0,041$	
24	$0,205 \pm 0,013$	$0,275 \pm 0,033$	$0, 224 \pm 0,035$	
24 h očiščen v magnetnem				
polju in redispergiran v				
mediju s pH 4	$1,000 \pm 0,000$	$0,893 \pm 0,109$	$0,995 \pm 0,009$	

Rezultati kažejo, da različne koncentracije premreževalca bistveno ne vplivajo na povečanje velikosti delcev. Najmanjše vrednosti smo dobili pri koncentraciji TPP $c_{TPP} = 12,5 \ \mu g/ml$ in sicer povprečna velikost delcev, ki smo jih izmeril takoj po premreževanju, je znašala 203,1 ± 3,4 nm in PI 0,270 ± 0,043, ter pri vzorcu izmerjenem po 24 h 208,1 ± 2,7 nm in PI 0,205 ± 0,013. PI kaže, da se porazdelitev velikosti delcev tudi po 24 h ni bistveno spremenila in je dokaj homogena. Povprečna velikost delcev se je znatno povečala, ko smo vzorce po 24 h očistili v magnetnem polju (5 min) in redispergirali v mediju s pH 4 in sicer pri vseh koncentracijah dodanega TPP (povprečna velikost je bila večja od 1700 nm). Sklepamo, da smo s čiščenjem in redispergiranjem v mediju s pH 4 sprali s površine delcev tudi šibko vezan sloj hitosana-NV, ki se ni dovolj dobro adsorbiral, da bi disperzija ostala stabilna dlje časa. Posledično so se delci začeli združevati, kar nam nakazuje tudi povečanje PI, ki je > 0, 9.



Slika 22: Povprečna velikost SPION-ov v vzorcu, po posamezni fazi LBL oblaganja. V fazah nanašanja hitosana-NV (2. in 4. plast) smo uporabili TPP.

Preglednica XVI: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji po posamezni fazi LBL oblaganja. V fazah nanašanja hitosana (2. in 4. plast) smo uporabili TPP.

Plast	Polielektrolit	PI
1.	PAA	$0,237 \pm 0,056$
2.	hitosan-NV brez TPP	$0,321 \pm 0,036$
2.	hitosan-NV s TPP	$0,279 \pm 0,013$
3.	PAA	$1,00 \pm 0,000$
4.	hitosan-NV brez TPP	$0,875 \pm 0,031$
4.	hitosan –NV s TPP	$0,985 \pm 0,025$

Če primerjamo rezultate meritev po nanosu 2. plasti (hitosana-NV) z in brez dodanega TPP, ki smo jih izvedli po čiščenju v magnetnem polju in redispergiranju v mediju s pH 4 (slika 22, preglednica XVI) vidimo, da so delci v vzorcu s TPP manjši (povprečna velikost delcev 224,3 \pm 10,2 nm) in porazdelitev velikosti delcev v vzorcu je ožja (PI 0,279 \pm 0,013) kot pri vzorcu brez dodanega premreževalca (povprečna velikost delcev: 282,8 \pm 15,5 nm, PI 0,321 \pm 0,036). Premreževalec prečno poveže verige hitosana, zato je nanešena plast bolj kompaktna, a tanjša. Po nanosu 4. plasti merjeno po čiščenju v magnetnem polju in redispergiranju v mediju s pH 4 pa se povprečna velikost delcev poveča tako pri vzorcu s premreževalcem TPP (povprečna velikost delcev 1614 \pm 267,4 nm, PI 0,985 \pm 0,025) kot pri vzorcu brez premreževalca (povprečna velikost delcev 1322 \pm 86,3 nm, PI 0,875 \pm 0,031). Sklepamo, da je rezultat posledica ponavljajočega izpostavljanja delcev magnetnim silam, ki povzročijo medsebojno približevanje delcev na razdalje, ki povzročijo nestabilnost tj. združevanje delcev v skupke, kar se kaže na povečanju povprečne velikosti delcev po čiščenju in redispergiranju.

Literatura navaja, da je učinkovitost premreževanja hitosana odvisna od razpoložljivih kationskih skupin hitosana in negativno nabitih molekul TPP, zato lahko na premreževanje vpliva pH medija. Hitosan ima pri kislem pH mediju ionizirane proste amino skupine ($-NH_3^+$), medtem ko je TPP v obliki anionov ($P_3O_{10}^{5-}$). Pri dodatku TPP k hitosanu nastopijo ionske interakcije med polifosfatnimi anioni in ioniziranimi amino skupinami hitosana. Gostota premreževanja v mediju s kislim pH je večja kot v mediju z bazičnim pH (pH 9), saj je v bazičnem pH ioniziran le TPP, medtem ko je hitosan neioniziran (31).

Poskus smo izvedli tudi v mediju s pH 5 (acetatni pufer), da bi dosegli ustrezno ionizacijo PAA in hitosana. Organoleptično smo takoj opazili, da v takšnih vzorcih delci sedimentirajo, zato le-ti niso bili primerni za merjenje velikosti delcev s PCS. Delce smo z vorteksiranjem uspeli redispergirati, a se je ponovno pojavila sedimentacija, kar kaže na fizikalno nestabilnost disperzije. Kot je znano iz literature (35), kjer so proučevali odvisnost debeline adsorbirane plasti od pH medija pri nanašanju obloge iz PAA in PAH, ionizacija PE močno vpliva na debelino adsorbirane plasti. Ker sta tako PAH in kot hitosan šibka kationska PE, lahko rezultate iz literature primerjamo z našimi rezultati. V mediju s pH 5 je PAA bolj ionizirana kot hitosan. Ionizirane verige hitosana se tako adsorbirane plasti, saj se verige ne morejo razporediti v iztegnjeni konformaciji ampak zavzamejo zvito konformacijo, ki se razprostira stran od površine

v disperzni medij. Pomembno vpliva na debelino adsorbirane plasti tudi molekulska masa adsorbiranega PE (15, 35).

4.2.9 Vpliv ionske moči disperznega medija na velikost SPION-ov, ki smo jih obložili s plastjo PAA in hitosana-NV

Povprečna velikost delcev po nanosu 1. plasti PAA je bila že ob najmanjši prisotnosti soli ($c_{NaCl} = 0,01 \text{ mol/l}$) večja za ~170 nm kot velikost delcev v vzorcu brez dodatka soli (186,1 ± 8,1 nm) (slika 23, preglednica XVII). Ioni soli, ki so prisotni v disperznem mediju, vplivajo na jakost elektrostatskih sil med posameznimi plastmi PE in posledično na debelino adsorbirane obloge (23). Debelina difuzne plasti nasprotno nabitih ionov na površini delcev je tanjša v primeru večje koncentracije soli v mediju, zato se delci lahko bolj približajo, kar poveča verjetnost njihovega združevanja. Takšno razlago potrjujejo tudi meritve ZP, saj absolutna vrednost ZP z večanjem koncentracije soli v vzorcu pada. Rezultati kažejo, da se pri adsorpciji 1. plasti (PAA) z večanjem koncentracije soli absolutno manjšal, kar kaže, da je disperzija pri večji koncentraciji soli manj stabilizirana.



Slika 23: Povprečna velikost SPION-ov v odvisnosti od koncentracije NaCl v disperziji pri dodatku 1. plasti (PAA) in 2. plasti (hitosan-NV) LBL obloge.

1. plast: PAA				
c _{NaCl} (mol/l)	PI	ZP		
0	$0,237 \pm 0,056$	/		
0,01	$0,307 \pm 0,058$	$-32,5 \pm 1,5$		
0,05	$0,379 \pm 0,048$	$-23,0 \pm 1,3$		
0,10	$0,432 \pm 0,118$	$-22,0 \pm 0,8$		
0,15	$0,445 \pm 0,033$	$-21,1 \pm 6,2$		
0,20	$0,\!429 \pm 0,\!051$	$-19,3 \pm 2,3$		

Preglednica XVII: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji in ZP v odvisnosti od koncentracije NaCl v disperziji pri nanosu 1.plasti LBL obloge (PAA).

Preglednica XVIII: Porazdelitev velikosti delcev v disperziji v odvisnosti od koncentracije NaCl v disperziji pri nanosu 2. plasti LBL obloge (hitosan-NV).

2. plast: hitosan-NV		
c _{NaCl} (mol/l)	PI	
0	$0,279 \pm 0,013$	
0,01	/	
0,05	/	
0,10	$0,579 \pm 0,163$	
0,15	$0,655 \pm 0,023$	
0,20	$0,655 \pm 0,023$	

Pri nanosu 2. plasti LBL obloge (hitosan-NV) je bil vpliv soli v mediju na povprečno velikost delcev v disperziji veliko bolj izrazit, saj se je povprečna velikost delcev poveča kar za 500-krat glede na začetna povprečno velikost SPION-ov brez dodane soli, ki je znašala 224,3 \pm 10,22 nm (slika 23, preglednica XVIII). Tak učinek smo opazili pri vseh vzorcih ne glede na koncentracijo dodanega NaCl. V prisotnosti soli PE zasedejo bolj zvito konformacijo, saj je njihov naboj zasenčen s prisotnimi ioni soli; torej se PE obnaša kot molekula z manjšim oz. brez naboja. Elektrostatski odboj med nabitimi skupinami se zmanjša in na površini delcev se lahko adsorbira večja gostota molekul polielektrolita (25). Posledično je debelina adsorbirane plasti debelejša, a zaradi manjšega ZP, je tudi elektrostatski odboj med delci manjši, kar lahko vodi v nestabilnost koloidne disperzije. Po dodatku soli (NaCl) smo pri nižjih koncentracijah c_{NaCl} = 0,01 mol/1 in c_{NaCl} = 0,05 mol/l pred redispergiranjem v mediju s pH 4 z dodatkom soli izmerili povprečne velikosti 575,5 ± 83,1 nm (c_{NaCl} = 0,01 mol/1) in 632,0 ± 16,3 nm (c_{NaCl} = 0,05 mol/l). Ker je takšna velikost delcev je neustrezna, saj so predhodni rezultati pokazali, da se po redispergiranju

delci še povečajo, vzorcev po redispergiranju nismo merili. Glede na rezultate PI, vidimo da so vzorci polidisperzni. Sklepamo lahko, da prisotnost ionov soli vpliva na elektrostatski odboj med sloji LBL obloge in delci v disperziji ter posledično na velikost delcev. Plasti PE, ki jih nanesemo v prisotnosti soli, kažejo drugačno morfologijo in so gostejše od tistih, ki se adsorbirajo na površino delcev brez soli v mediju v katerem poteka adsorpcija (25). Pri določeni koncentraciji soli v mediju se naboj na delcih kompenzira, kar vodi v nastanek motne, koagulirane disperzije. V takšnih eksperimentalnih pogojih nadaljnje nanašanje slojev PE po LBL metodi ni več mogoče (23). V naši raziskavi smo ugotovili, da koagulacija in obarjanje s prostim očesom vidnih delcev nastopi pri koncentraciji NaCl $c_{NaCl} = 0,10$ mol/l.

5. SKLEP

- Z metodo plast za plastjo smo na površino SPION-ov izmenično nanašali anionski PE PAA in kationski PE hitosan ali PAH, v prisotnosti ali odsotnosti soli v disperznem mediju. Ugotovili smo, da je optimalna končna koncentracija za nanos anionskega PE PAA c_{PAA} = 50 µg/ml, ki smo jo pripravili v mediju s pH 4, in optimalna za nanos kationskega PE raztopina hitosana z nizko viskoznostjo s končno koncentracijo c_{HIT-NV} = 50 µg/ml, ki smo jo pripravili v 3 % (m/v) ocetni kislini, saj sta se v takšnih pogojih povprečna velikost delcev in PI po nanosu plasti PE najmanj povečala, kar nakazuje na homogenost in stabilnost vzorca.
- Z uporabo raztopin PE z zgoraj omenjeno koncentracijo smo uspeli nanesti na površino SPION-ov 4 plasti: 1. plast PAA, 2. plast hitosan, 3. plast PAA in 4. plast hitosan. Končna povprečna velikost delcev s 4 sloji PE obloge je bila 405,7 ± 180,8 nm, PI 0,553 ± 0,118 in ZP 27,9 ± 4,5. Z merjenjem ZP smo ugotovili, da se je plast anionskega in kationskega PE uspešno adsorbirala na delce, saj se je predznak ZP spremenil.
- Če smo vzorce po čiščenju v magnetnem polju redispergirali v katerem koli mediju in izmerili velikost delcev, smo ugotovili, da se je povprečna velikost delcev močno povečala ali pa smo celo opazili s prostim očesom vidne agregate. Sklepamo lahko, da smo s spiranjem šibko pritrjen PE odstranili s površine delcev, zato so se delci začeli združevati in porazdelitev velikosti delcev je postala bolj heterogena. Da bi se izognili s spiranjem induciranemu združevanju delcev, smo večji del raziskav izvedli brez vmesnega spiranja. V primeru, ko so delci agregirali, smo uporabili UZ sondo ali kadičko in tako z vnosom dodatne energije v disperzijo agregate delcev razbili. Ugotovili smo, da je optimalni čas soniciranja z UZ sondo 15 s.
- Po nanosu četrte plasti PE obloge se je velikost delcev povečala do te mere, da disperzija več ni bila primerna za nadaljnje oblaganje. Sklepamo, da so se molekule hitosana razporedile na površini delcev v obliki zvite konformacije ali pa so molekule v plasti hitosana vstopale v interakcije z notranjimi plastmi obloge, kar je povzročilo eksponentno povečevanje velikosti delcev.
- Da bi zmanjšali velikost delcev in povečali stabilnost obloge iz hitosana, smo po nanosu vsake plasti hitosana uporabili premreževalec TPP, ki se uporablja za premreževanje

hitosanskih verig. Ugotovili smo, da se je velikost delcev po dodatku TPP malo zmanjšala, a vendar so bili delci za nadaljnje LBL oblaganje preveliki.

- Glede na to, da je ionizacija obeh uporabljenih PE močno odvisna od pH vrednosti in ionske moči medija, smo poskusili zagotoviti optimalne pogoje, v katerih bi bil naboj obeh PE optimalen, adsorbiran sloj pa čim tanjši in stabilen. V raziskavi se je izkazal kot najboljši disperzni medij s pH 4.
- Glede na literature podatke smo pričakovali, da bomo lahko z metodo plast za plastjo nanesli več plasti PE na površino SPION-ov. Sklepamo, da sta zaradi šibkega naboja kationskega in anionskega PE v mediju s pH 4 oba PE šibko vezana na površino in se lahko s čiščenjem v magnetnem polju in redispergiranjem odstranita s površine delcev, kar pomeni, da delci niso več stabilizirani in se posledično združujejo. Zanemarljiv ni niti učinek magnetnega polja, saj magnetne sile povzročijo približevanje delcev, ki lahko vodi v njihovo agregiranje. Povečanje debeline LBL obloge lahko razložimo z zmanjšanjem površinskega naboja do vrednosti, ko nastanejo zvite konformacije verig PE in ne linearne, ki vodijo v tanjšo plast obloge.
- Tekom raziskovalnega dela smo uspeli nanesti le 4 plasti LBL obloge in ugotovili, da koloidna disperzija po modifikaciji površine SPION-ov v prisotnosti soli in pri fiziološkem pH ni bila stabilna. V nadaljevanju raziskav bi bilo smiselno uporabiti drugi par anionskega in kationskega PE za LBL oblaganje ter manj močen magnet za ločevanje delcev v magnetnem polju, saj je lahko le-ta sprožil združevanje delcev v agregate.
- Ker smo dokazali, da se pH medija po dodatku SPION-ov spremeni (nismo pa spremljali vpliva dodatka PE na pH medija v katerem poteka oblaganje), bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno spremljati pH disperzije med celotnim postopkom oblaganja.
- Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je izvedba metode LBL oblaganja zelo enostavna, a številni parametri vplivajo na uspešnost nanosa plasti PE. Torej je metoda obetavna za modifikacijo površine nanodelcev, vendar so potrebne nadaljnje raziskave v smeri izbire kationskega in anionskega para PE ter pogojev v katerih poteka LBL oblaganje, da bomo lahko pripravili stabilno disperzijo SPION-ov.

6. LITERATURA

- 1. Kristl J: Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil. Farmacevtski vestnik 2012; 63: 67-73.
- Veiseh O, Gunn J.W, Zhang M: Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imagin. Advanced Drug Delivery Reviews 2010; 62: 284–304.
- 3. http://www.nanosonic.com/29/nanocomposites.html. Dostopano 15.1.2014.
- Hosokawa M, Nogi K, Naito M, Yokoyama T: Nanoparticle Technology Handbook. Elsavier, Netherlands, 2012: 5-14.
- 5. Cegnar M, Kerč J: Nanozdravila. Farmacevtski vestnik 2012; 63: 82-87.
- Chapel J. P, Berret J. F: Versatile electrostatic assembly of nanoparticles and polyelectrolytes. Coating, clustering and layer-by-layer processes. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2012; 17: 97–105.
- 7. Teskač Plajnšek K: Povezava med površinskimi lastnostmi nanodelcev, celičnim privzemom in biološkim odgovorom. Doktorska dizertacija. Ljubljana 2011; 11-30.
- Hofmann-Amtenbrink M, Von Rechenberg B, Hofmann H: Superparamagnetic nanoparticles for biomedical application. Nanostructured Materials for Biomedical Applications. Transworld Research Network, India 2009; 120-130.
- Temova B: Optimizacija izdelave polimernih nanodelcev s superparamagnetnim železovim oksidom in in vitro vrednotenje celičnega odziva. Diplomska naloga. Ljubljana 2012; 3-16.
- 10. Kocbek P: Novosti na področju farmacevtske nanotehnologije. Farmacevtski vestnik 2012; 63: 75-81.
- 11. Čampelj S, Makovec D, Bele M, Drofenik M, Jamnik J: Sinteza magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih s tanko plastjo silike. Materiali in tehnologije 2007; 41: 103–107.
- Gyergyek S: Superparamagnetni nanokompoziti na osnovi nanodelcev superparamagnetnega železovega oksida in polimetil metaakrilata. Doktorska dizertacija. Maribor 2010; 4-29.
- Demas V, Lowery T.J: Magnetic resonance for *in vitro* medical diagnostics. Superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. New Journal of Physics, Massachusetts 2011; 13: 2-18.

- Andrade1 A, Ferreira R, Fabris J, Domingues R: Coating Nanomagnetic Particles for Biomedical Applications. Biomedical Engineering – Frontiers and Challenges 2011: 157-176.
- 15. Singha N, Jenkins G.J.S, Asadib R, Doak S.H: Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). Nano reviews 2010; 1: 5358 DOI 10.3402.
- Muthiah M, Park I-K, Cho C-S: Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting. Biotechnology Advances 2013; 1-13.
- 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: 24–46.
- Neuberger T, Scho B, Hofmann H, Hofmann M, Von Rechenberg B: Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 2005; 2934: 83–496.
- Szpak A, Kania G, Skorka T, Tokarz W, Zapotoczny S, Nowakowska M: Stable aqueous dispersion of superparamagnetic irion oxide nanoparticles protected by charged chitosan derivates. Journal of Nanoparticle Research 2013; 15: 2-11.
- Ahmed N, Fessi H, Elaissari A: Theranostic applications of nanoparticles in cancer. Drug Discovery Today 2012; 17: 928-934.
- 21. http://www.edinformatics.com/nanotechnology/nanomedicine.htm.
- 22. Cole A.J, Yang V.C, David A.E: Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. Trends in Biotechnology 2011; 29: 323-332.
- 23. De Villiers M.M, Otto D.P, Strydom S.J, Lvov Y.M: Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. Advanced Drug Delivery Reviews 2011; 63: 701-715.
- Schuetz P, Caruso F: Multilayer thin films based on polyelectrolyte-complex Nanoparticles. Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects 2002; 207: 33–40.
- 25. Deligöza H, Tiekeb B: QCM-D study of layer-by-layer assembly of polyelectrolyte blendfilms and their drug loading-release behavior. Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects 2014; 441: 725–736.

- 26. De Villiers M. M, Otto D. P, Lvov Y. M: Application of Electrostatic Layer-by-Layer Nanocoating in Drug Delivery, American Pharmaceutical Review 2012: 1-8.
- 27. Mermut O, Barrett C. J: Effects of Charge Density and Counterions on the Assembly of Polyelectrolyte Multilayers. Journal of Physical Chemistry 2003; 107: 2525-2530.
- Yang W, Trau D, Renneberg R, Teng Yu N, Caruso F: Layer-by-Layer Construction of Novel Biofunctional Fluorescent Microparticles for Immunoassay Applications. Journal of Colloid and Interface Science 2001; 234: 356–362.
- 29. Elzbieciak-Wodka M, Warszynski P: Effect of deposition conditions on thickness and permeability of the multilayer films formed from natural polyelectrolytes. Electrochimica Acta 2013; 104: 348– 357.
- Chattopadhyay D. P, Inamdar M. S: Aqueous Behaviour of Chitosan. International Journal of Polymer Science 2010: 1-7.
- 31. Bhumkar D. R, Pokharkar V. B: Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate. A Technical Note. Journal of Pharmaceutical Science and Technology 2006; 7: 1-6.
- 32. Antipov A, Shchukin D, Fedutik Y, Petrov A. I, Sukhorukov G. B, Moehwald H: Carbonate microparticles for hollow polyelectrolyte capsules fabrication. Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects 2003; 224: 175–183.
- 33. Cranford S. W, Ortizac C, Buehler M. J: Mechanomutable properties of a PAA/PAH polyelectrolyte complex: rate dependence and ionization effects on tunable adhesion strength. The Royal Society of Chemistry 2010; 6: 4175–4188.
- 34. Elzbieciaka M, Kolasinskab M, Zapotocznyc S, Krastevb R, Nowakowskac M, Warszynski P: Nonlinear growth of multilayer films formed from weak polyelectrolytes. Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects 2009; 343: 89–95.
- 35. Shiratori S. S, Rubner M. F: pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. Macromolecules 2000; 33: 4213-4219.
- 36. Sui L: Mechanical Properties of Layer-by-layer Assembled Thin Film Nano-Composites Using Brillouin Light Scattering. Doctoral dissertation. Michigan 2011: 1-15.
- 37. Ahlin Grabnar P, Kocbek P, Kristl J: Vaje iz farmacevtske nanotehnologije. Magistrski program industrijska farmacija. Katedra za farmacevtsko tehnologijo.