

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO JURIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTERIJSKI ŠTUDIJ PROGRAMA  
FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO JURIČ

**OPTIMIZACIJA SESTAVE IN METODE IZDELAVE  
MAGNETOLIPOSOMOV**

**OPTIMIZATION OF MAGNETOLIPOSOME COMPOSITION AND  
THEIR PREPARATION METHOD**

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag.farm. Vzorce klastrov SPION-ov so pripravili v podjetju Nanos Scientifical d.o.o.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se doc. dr. Petri Kocbek, ki mi je s svojim strokovnim znanjem svetovala pri izdelavi magistrskega dela. Zahvala gre tudi moji družini in prijateljem, ki so me podpirali med študijem. Na koncu se zahvaljujem Mateji, ki mi je ves čas stala ob strani in me spodbujala k čimprejšnjemu dokončanju magistrske naloge.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Petre Kocbek

Marko Jurič

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega

Član komisije: doc. dr. Jurij Trontelj

# VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Nanotehnologija.....	1
1.2 Nanoteranostiki.....	1
1.3 Ciljanje z nanodelci.....	2
1.4 Superparamagnetni nanodelci železovega oksida (SPION-i) .....	3
1.4.1 Superparamagnetizem .....	3
1.4.2 Klastri SPION-ov.....	4
1.4.3 Fizikalna stabilnost disperzije SPION-ov.....	5
1.4.4 Uporaba SPION-ov.....	5
1.5 Liposomi .....	6
1.5.1 Stabilnost liposomov .....	8
1.5.2 Metode za pripravo liposomov .....	9
1.5.3 Metode za zmanjševanje in poenotenje velikosti liposomov .....	10
1.5.4 Uporaba liposomov .....	10
1.6 Magnetoliposomi (ML).....	11
1.7 Metode za vrednotenje magnetoliposomov .....	11
1.7.1 Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS).....	12
1.7.2 Laserska Dopplerjeva anemometrija (LDV) .....	12
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>13</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>14</b>
3.1 Materiali .....	14
3.2 Laboratorijska oprema:.....	15
3.3 Metode.....	16
3.3.1 Izdelava magnetoliposomov z metodo tankih filmov .....	16
3.3.2 Poenotenje velikosti magnetoliposomov .....	18
3.3.3 Stabilizacija magnetoliposomov s poloksamerom 188. ....	18
3.3.4 Priprava disperzije magnetoliposomov v raztopini natrijevega klorida.....	19
3.3.5 Priprava disperzije magnetoliposomov v raztopini NaCl in poloksamera 188.....	19
3.3.6 Ločevanje magnetoliposomov v magnetnem polju .....	19

3.3.7	Vrednotenje magnetoliposomov .....	21
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>23</b>
4.1	Vpliv vsebnosti holesterola v formulaciji na izdelavo in velikost liposomov .....	23
4.2	Poenotenje velikosti disperzije magnetoliposomov .....	27
4.3	Vpliv medija za hidratiranje na velikost magnetoliposomov .....	28
4.3.1	Vpliv hidratiranja na vgrajevanje klastrov SPION-ov.....	30
4.4	Vpliv stabilizatorja na magnetoliposome.....	34
4.5	Vpliv ionske moči disperznega medija na magnetoliposome .....	37
4.6	Vpliv ionske moči disperznega medija na sterično stabilizirane magnetoliposome.....	40
4.7	Vpliv magnetnega polja na magnetoliposome .....	41
<b>5</b>	<b>SKLEP.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>49</b>

## POVZETEK

Napredek na področju nanotehnologije omogoča hiter razvoj nanomaterialov, ki jih zaradi posebnih elektronskih, optičnih in magnetnih lastnosti v medicini uporabljamo za diagnostiko in zdravljenje bolezni. SPION-i so superparamagnetni nanodelci železovega oksida, kar pomeni, da imajo izražene magnetne lastnosti le v prisotnosti magnetne sile in jih lahko s pomočjo zunanjega magnetnega polja usmerjamo. Z združevanjem SPION-ov v klastre dosežemo optimalno velikost delcev za uporabo pri ciljni dostavi učinkovin ali diagnostikov ob sočasno ohranjenih superparamagnetnih lastnosti delcev. Liposomi pa predstavljajo nanodostavni sistem, ki je dandanes že v klinični uporabi.

Namen magistrske naloge je bil z metodo tankih filmov izdelati magnetoliposome (ML), tj. liposome z vgrajenimi klastri SPION-ov. Izdelanim ML smo s pomočjo fotonske korelacijske spektroskopije in laserske Dopplerjeve anemometrije izmerili povprečno velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial ter jih tekom raziskave vrednotili tudi organoleptično. Kot optimalna metoda za zmanjšanje in poenotenje velikosti veziklov se je izkazala metoda soniciranja, saj smo tako dosegli povprečno velikost ~100 nm. V prvem delu magistrske naloge smo optimizirali formulacijo liposomov tako, da smo spreminjali sestavo lipidov s ciljem, da bi se glede na vsebnost holesterola čim bolj približali vsebnosti, kot jo najdemo v celičnih membranah *in vivo*. Količina holesterola v lipidni zmesi hidrogeniranega in nehidrogeniranega sojinega fosfatidilholina je vplivala na velikost veziklov. Le-ti so bili manjši, če je bila količina holesterola v zmesi manjša. Kot potencialna fiziološko sprejemljiva disperzna medija smo proučili izotonični fosfatni pufer in izotonično raztopino manitola. Ugotovili smo, da je povprečna velikost veziklov v takšnih medijih večja, disperzije pa niso fizikalno stabilne. Proučili smo tudi, kako vpliva ionska moč disperznega medija na fizikalno stabilnost ML. S pomočjo sterične stabilizacije s poloksamerom 188 smo dosegli tudi v prisotnosti fiziološke koncentracije soli fizikalno stabilno disperzijo ML. Dokazali smo, da lahko s pomočjo zunanjega magnetnega polja izvedemo ločevanje delcev s superparamagnetnimi lastnostmi od disperznega medija in koloidnih struktur, ki ne izkazujejo magnetnih lastnosti. Zaključimo lahko, da smo v raziskavi uspeli vgraditi klastre SPION-ov v liposome in tako izdelati dostavni sistem, ki se odziva na delovanje magnetnega polja.

**Ključne besede:** nanodostavni sistemi, SPION-i, liposomi, magnetoliposomi, metoda tankih filmov.

## ABSTRACT

Progress in nanotechnology enables rapid development of nanomaterials, which are used in medicine for the diagnosis and treatment of diseases due to their specific electronic, optical and magnetic properties. SPIONs are superparamagnetic iron oxide nanoparticles therefore they exhibit magnetic properties only in the presence of a magnetic force and can be magnetically guided by external magnetic field. SPION clustering increases the particle size up to the optimal value for application in targeted drug or diagnostic delivery, while maintaining their superparamagnetic properties. However, liposomes represent a nanodelivery system which is nowadays already in clinical use.

The objective of the master thesis was to prepare magnetoliposomes (ML) i.e liposomes with encapsulated SPION clusters by the thin film method. We used photon correlation spectroscopy and laser Doppler anemometry to measure the average size, polydisperse index and zeta potential of prepared ML. The samples were evaluated also organoleptically throughout the study. Sonication was shown to be an optimal method for reduction of vesicle size and increase of their size uniformity, since the average size of ~100 nm was achieved. In the first part of the master thesis, we optimized the formulation of liposomes by changing composition of lipids, with a goal to reach the cholesterol content similar to the cholesterol levels found in the cell membranes *in vivo*. The amount of cholesterol in lipid mixtures of hydrogenated and unhydrogenated soybean phosphatidylcholine affected the size of the vesicles. They were smaller if the quantity of the cholesterol in a mixture was lower. Isotonic phosphate buffer and isotonic mannitol solution were studied as potential physiologically acceptable dispersion media. The average size of the vesicles in such media was larger and the dispersions were not physically stable. We also examined, how ionic strenght of the dispersion medium impacts on the physical stability of ML. The physically stable dispersion of ML even in the presence of physiological salt concentration was achieved by steric stabilization with poloxamer 188. We have proven, that the particles with superparamagnetic properties can be separated from the dispersion medium and colloidal structures that do not exhibit magnetic properties by an external magnetic field. In conclusion, in the current study we managed to incorporate SPION clusters into liposomes and thus prepare a delivery system, that can respond to the applied magnetic field.

**Keywords:** nanodelivery systems, SPIONs, liposomes, magnetoliposomes, thin film method

## SEZNAM OKRAJŠAV

CMC	kritična micelska koncentracija (angl. »Critical micelle concentration«)
d	povprečni premer delcev
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EPR	učinek povečane prepustnosti in zadrževanja (angl. »Enhanced Permeability and Retention effect«)
FTIR	Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
GUV	gigantski enoslojni liposomi (angl. »Giant Unilamellar Vesicles«)
LDA	laserska Dopplerjeva anemometrija
LUV	veliki enoslojni liposomi (angl. »Large Unilamellar Vesicles«)
MLV	večslojni liposomi (angl. »Multilamellar Vesicles«)
MRI	magnetno resonančno slikanje (angl. »Magnetic Resonance Imaging«)
MVV	večvezikularni liposomi (angl. »Multivesicular Vesicles«)
PET	pozitronska emisijska tomografija
PAS	površinsko aktivna snov
PBS	fosfatni pufer (angl. »Phosphate Buffered Saline«)
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija (angl. »Photon Correlation Spectroscopy«)
PDI	polidisperzni indeks
PEG	polietilenglikol
RES	retikuloendotelijski sistem
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (angl. »Scanning electron microscope«)
SPION	superparamagnetni nanodelec železovega oksida (angl. »Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle«)
SPECT	enofotonska emisijska računalniška tomografija (angl. »Single-Photon Emission Computed Tomography«)
SSPIO	standardni SPION-i
SUV	majhni enoslojni liposomi (angl. »Small Unilamellar Vesicles«)
TEM	presevna elektronska mikroskopija
ULV	enoslojni liposomi (angl. »Unilamellar Vesicles«)
USPIO	ultramajhni SPION-i
XRD	rentgenska difraktometrija (angl. »X-Ray Diffraction«)



ZU            zdravilna učinkovina  
ZP            zeta potencial

# 1 UVOD

## 1.1 NANOTEHNOLOGIJA

Nanotehnologija označuje načrtovanje, vrednotenje, izdelavo in uporabo materialov, struktur, naprav in sistemov z obvladovanjem njihove oblike in velikosti v nanomerilu. V nanotehnologiji uporabljamo materiale ali strukture z vsaj eno dimenzijo v območju 1–100 nm. Na področju farmacije so zelo aktualne raziskave nanomaterialov za vnos zdravilnih učinkovin ali diagnostikov tj. nanodostavnih sistemov. Strokovna literatura s področja farmacije pa običajno med nanodostavne sisteme ne prišteva le tistih s povprečno velikostjo do 100 nm, ampak tudi tiste s povprečno velikostjo do 1  $\mu\text{m}$  (1, 2). Med nanodostavne sisteme spadajo npr. anorganski nanodelci, polimerni nanodelci, trdni lipidni nanodelci, liposomi, nanokristali, ogljikove nanocevi in dendrimeri (3). Napredek na področju nanotehnologije omogoča hiter razvoj inovativnih nanodostavnih sistemov, ki so zaradi njihovih posebnih elektronskih, optičnih in magnetnih lastnosti zelo aktualni v medicini za diagnostiko in zdravljenje različnih bolezni (4, 5).

## 1.2 NANOTERANOSTIKI

Teranostiki so dostavni sistemi, ki združujejo terapevtsko in diagnostično komponento (6). Teranostike s povprečno velikostjo v nanometrskem območju imenujemo nanoteranostiki. S pomočjo teranostikov lahko dosežemo sočasno ciljano dostavo zdravilnih učinkovin (ZU) do tarčnih tkiv in hkrati neinvazivno spremljamo lokalizacijo dostavnega sistema v organizmu (7). Terapevtsko komponento nanoteranostika lahko predstavljajo ZU, beljakovine, peptidi ali genetski material, ki so kovalentno ali nekovalentno vezani na nanodostavni sistem. Diagnostična komponenta omogoča spremljanje nanoteranostika v organizmu z optičnim slikanjem (uporaba fluorescentnih spojin), z magnetnim resonančnim slikanjem (MRI, angl. *magnetic resonance imaging*) (uporaba superparamagnetnih delcev npr. železovega oksida) in s pozitronsko emisijsko tomografijo (PET) ali enofotonsko emisijsko računalniško tomografijo (SPECT, angl. *Single-photon emission computed tomography*) (uporaba radioizotopov npr. joda) (7, 8). Tak pristop omogoča specifično izbiro zdravljenja, načrtovanje zdravljenja, objektivno spremljanje terapevtskega odziva in nadaljnje načrtovanje zdravljenja, ki temelji na specifičnih značilnostih bolezni (6). V terapiji raka se zelo pogosto uporabljajo nanodelci železovega

oksida, ki se lahko že sami uporabljajo kot teranostiki ali pa so vgrajeni v nanodostavne sisteme, kot so npr. liposomi (8).

### 1.3 CILJANJE Z NANODELCI

Z razvojem nanodostavnih sistemov za pasivno in aktivno ciljanje dosežemo večjo selektivnost dostave učinkovin na tarčno mesto in posledično večjo učinkovitost zdravljenja z manj stranskimi učinki (7).

Pasivno ciljanje temelji na izkoriščanju fizikalno-kemijskih, patofizioloških ali anatomskih značilnosti tarčnega mesta. Primer pasivnega ciljanja predstavlja izkoriščanje učinka povečane prepustnosti in zadrževanja (angl. *enhanced permeability and retention effect*, EPR), ki temelji na večji prepustnosti tumorskega žilja, ki omogoča prehajanje in kopičenje nanodostavnih sistemov v tumorskem tkivu, saj je okrnjena tudi limfna drenaža takšnega tkiva. Pasivno lahko ciljamo tudi celice retikuloendotelijskega sistema (RES), ki iz krvnega obtoka specifično privzamejo nanodelce s hidrofobno površino. Na tak način se nanodostavni sistem ciljano nalaga v celicah RES (9). Novost na področju pasivnega ciljanja predstavljajo »pametni« nanodostavni sistemi, ki omogočajo pasivno ciljanje in sproščanje ZU pod vplivom endogenih dejavnikov na tarčnem mestu (npr. pH, temperatura, redoks potencial, prisotnost encimov) ali zunanjih dražljajev (npr. svetloba, magnetno polje, ultrazvok) (7, 10). Ciljana dostava ZU s pomočjo magnetnega polja izkorišča možnost usmerjanja magnetnih nanodelcev na tarčno mesto s pomočjo zunanjega magnetnega polja. Magnetni nanodelci morajo biti dovolj veliki in jakost zunanjega magnetnega polja mora biti dovolj visoka, da lahko delce učinkovito usmerjamo in vodimo na tarčno mesto (11).

Nanodostavni sistemi za aktivno ciljanje imajo na površini vezane specifične ligande, ki prepoznajo molekule na površini tarčnih celic (antigen ali receptor) ter na ta način omogočijo selektivno zadrževanje nanodostavnega sistema na tarčnem mestu. Ligande za aktivno ciljanje delimo na proteine (protitelesa in njihovi fragmenti), nukleinske kisline (aptameri) in druge ligande (peptide, vitamine in ogljikove hidrate) (12).

## 1.4 SUPERPARAMAGNETNI NANODELCI ŽELEZOVEGA OKSIDA (SPION-I)

Magnetni nanodelci so delci nanometerskih velikosti, ki jih lahko usmerjamo s pomočjo zunanjega magnetnega polja. SPION-i (angl. *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) so superparamagnetni nanodelci železovega oksida v obliki maghemita ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) ali magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Med superparamagnetne nanodelce uvrščamo tudi nanodelce oksidov prehodnih kovin, kot so baker, kobalt, nikelj in mangan, saj prav tako kažejo superparamagnetne lastnosti (13). Glede na velikost SPION-ov zasledimo v literaturi zanje različna poimenovanja: SPION-i, standardni SPION-i (SSPIO) in ultra majhni SPION-i (USPIO) (14).

Za izdelavo SPION-ov obstaja več različnih metod, med katerimi je najbolj splošno uveljavljena metoda koprecipitacije, ki predstavlja najenostavnejšo in učinkovito pot pridobivanja magnetnih delcev za uporabo v biomedicini. Z dodajanjem baze k vodni raztopini železovih ionov ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) v inertni atmosferi dosežemo obarjanje nanodelcev magnetita. Pri obarjanju je pomembno, da sta natančno nadzorovana procesa nukleacije (nastanek jedra) in rasti kristalov, s čimer dobimo monodisperzno disperzijo SPION-ov (14, 15).

Oblaganje površine SPION-ov s primernimi materiali prinaša pomembne lastnosti SPION-om, ki so bistvene za njihovo uporabo pri dostavi učinkovin. Z oblaganjem površine SPION-ov zmanjšamo težnjo delcev po agregiranju ter tako izboljšamo koloidno stabilnost, zaščitimo površino delcev pred oksidacijo, omogočimo vezavo ZU in ligandov, podaljšamo čas zadrževanja v sistemskega krvnem obtoku z izogibanjem RES, izboljšamo biokompatibilnost, zmanjšamo nespecifične interakcije, ter njihovo toksičnost. Med primerne materiale za oblaganje SPION-ov štejemo npr. hitosan, polietilenglikol, polivinil-alkohol, polivinil-pirolidon, dekstran, albumin, silicijev dioksid, zlato, škrob, želatino in etil celulozo (4, 13, 14).

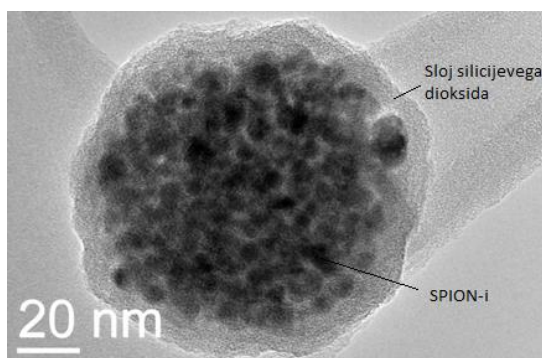
### 1.4.1 Superparamagnetizem

Superparamagnetizem je oblika magnetizma, ki se pojavi v majhnih feromagnetnih in ferimagnetnih nanodelcih. Superparamagnetne lastnosti kažejo nanodelci velikosti do 10 nm, ki so sestavljeni iz ene same domene (področje, kjer ima spontana magnetizacija enako smer). Prisotnost zunanjega magnetnega polja povzroči urejanje domen magnetnih

nanodelcev v smeri magnetnega polja. Po odstranitvi zunanjega magnetnega polja magnetni nanodelci ne ostanejo namagneteni, kar pomeni, da imajo superparamagnetni nanodelci izražene magnetne lastnosti le ob prisotnosti zunanjega magnetnega polja (16, 17).

#### 1.4.2 Klastri SPION-ov

Klastre SPION-ov (beseda, povzeta iz angl. *SPION cluster*) (slika 2) sestavljajo skupki nanokristalov železovega oksida velikosti do 10 nm, zato imajo klastri ohranjene superparamagnetne lastnosti pri sobni temperaturi. Prednost klastrov SPION-ov pred SPION-i je v enostavnem ločevanju klastrov od stabilne suspenzije posameznih SPION-ov v prisotnosti magnetne sile, ki močnejše deluje na SPION-e združene v klastre, kot na posamezne SPION-e (18). Kadar je velikost SPION-ov manjša od 10 nm, lahko takšni delci pri fizioloških pogojih prehajajo skozi pore kapilar v tkivih, zato se ne kopičijo le v tumorju. Z združevanjem SPION-ov v klastre dosežemo optimalno velikost delcev, kar omogoča učinkovito izkoriščanje EPR učinka za njihovo zadrževanje v tumorjih (5). Delci, ki so manjši od 10 nm, se iz organizma odstranijo z ledvičnim očiščkom, medtem ko se delci večje od 200 nm zadržijo v vranici in se odstranijo s fagocitozo, kar vodi do znižanja koncentracije SPION-ov v plazmi. Prednost uporabe delcev manjših od 100 nm je velika specifična površina, ki omogoča pripenjanje ligandov, kar lahko zmanjša agregiranje in upočasni sedimentacijo delcev, s čimer dosežemo fizikalno stabilnost disperzije. Velikosti med 10-100 nm veljajo kot optimalne, saj se takšni delci izognejo privzemu v celice RES in lahko prehajajo skozi stene fenestriranih kapilar na tarčno mesto. S površinskimi modifikacijami klastrov SPION-ov dobimo homogene disperzije, ko so primerne za uporabo v biomedicini (4, 13).



**Slika 1:** SPION-i združeni v klaster ter obdani s tankim slojem silicijevog dioksida (Povzeto po viru 13)

### **1.4.3 Fizikalna stabilnost disperzije SPION-ov**

Na fizikalno stabilnost SPION-ov v suspenzijah vplivajo hidrofobne, magnetne, van der Waalove, elektrostatske in sterične interakcije. Stabilnost magnetnih koloidnih disperzij je rezultat ravnotežja med privlačnimi in odbojnimi silami. Posamezni SPION-i se ob prisotnosti hidrofobnih interakcij združujejo v agregate mikrometrskih velikosti, kar je posledica velikega razmerja med površino in velikostjo delcev. Magnetne dipol-dipol interakcije povzročijo namagnetenje dveh sosednjih mikrometrskih skupkov SPION-ov, kar vodi v nadaljnje združevanje delcev, ki je še bolj izraženo ob prisotnosti zunanega magnetnega polja. V splošnem nanodelci agregirajo v suspenzijah zaradi učinka privlačnih van der Waalovih sil, saj se na ta način zmanjša medfazna energija sistema. Stabilizacija SPION-ov je pomembna za ohranitev učinkovitosti SPION-ov v ciljni dostavi zdravil. S prilagajanjem odbojnih elektrostatskih in steričnih interakcij lahko preprečimo nastanek agregatov (4, 15).

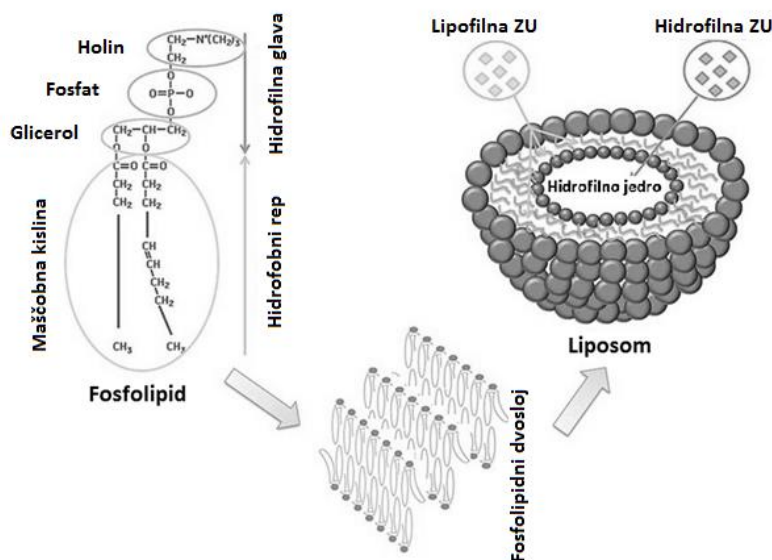
### **1.4.4 Uporaba SPION-ov**

Magnetne lastnosti SPION-ov omogočajo njihovo uporabo za MRI, v ciljni dostavi ZU, hipertermiji, bioseparaciji in tkivnem inženirstvu. Na trgu so dostopne naslednje formulacije SPION-ov: ferumoksitol (Feraheme™) za zdravljenje anemije ter ferumoksid (Endorem® v Evropi in Feridex® v ZDA), ferukarbotran (Resovist®) in ferumoksil (Lumiren® v Evropi in Gastromark® v ZDA) kot diagnostiki za zdravljenje raka (20, 21). MRI predstavlja učinkovito neinvazivno medicinsko diagnostično orodje in temelji na uporabi močnega magnetnega polja in pulza radio valov za pridobivanje slike telesa. SPION-i služijo kot diagnostično oz. kontrastno sredstvo za MRI. SPION-e v kombinacij z zunanjim magnetnim poljem uporabljamo tudi za ciljno dostavo delcev do želenega tarčnega mesta, kjer lahko dosežemo lokalno sproščanje učinkovine. Z dostavljanjem učinkovin na specifična mesta se zmanjša obseg stranskih učinkov in odmerek ZU, ki je potreben za določen terapevtski učinek. Prisotnost zunanega izmeničnega magnetnega polja lahko povzroči pretvorbo magnetne energije SPION-ov v toploto. To lastnost lahko izkoriščamo *in vivo* za uničenje tumorskih celic, ki so bolj občutljive na povišano temperaturo kot zdrave celice. Tako hipertermija omogoča selektivno uničenje patoloških celic. V biomedicinskih raziskavah je pogosto potrebno ločiti specifične analite tj. biološki materiali (npr. DNK, proteine, celice) od okolja ali disperznega medija. Za takšno

ločevanje lahko uporabimo površinsko spremenjene SPION-e, ki lahko določen analit specifično vežejo in ga nato s pomočjo zunanega magnetnega polja ločimo (magnetna separacija). Magnetne nanodelce lahko uporabimo v tkivnem inženirstvu za označevanje in ločevanje celic (matične celice), spremljanje presadka in ciljno dostavo ZU *in vivo* (16, 22, 23).

## 1.5 LIPOSOMI

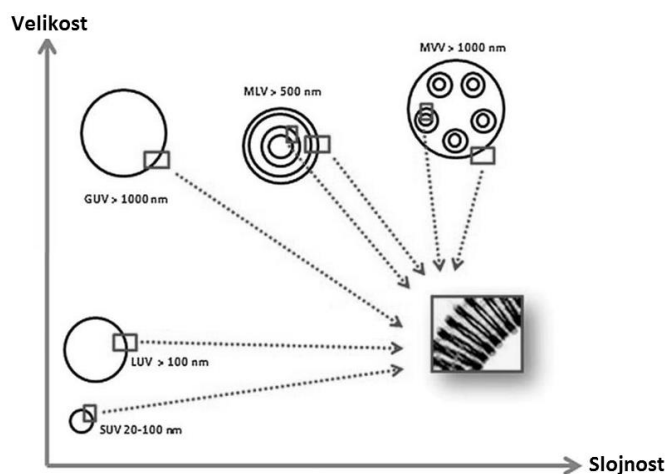
Liposomi predstavljajo, zaradi podobnosti z zgradbo celičnih membran, idealen nanodostavni sistem za vnos in ciljno dostavo ZU. Beseda liposom izvira iz grških besed, kjer *lipos* pomeni maščobo, *soma* pa telo ter označuje strukturo, kjer lipidni dvosloj obdaja vodno sredico (24).



**Slika 2:** Shematski prikaz strukture liposomov in vgrajevanja lipofilnih in hidrofilnih ZU vanje (povzeto po viru 27)

Liposomi so mikroskopski vezikli velikosti od 20 nm do 4  $\mu\text{m}$  sestavljeni iz koncentrično urejenih lipidnih dvoslojev, ki obdajajo prostore z vodo (slika 2). Na podlagi velikosti, slojnosti in notranje strukture ločimo več vrst liposomov, ki jih prikazuje slika 3. Tako delimo liposome glede na njihovo slojnost na enoslojne liposome (angl. *unilamellar vesicles*, ULV) in večslojne liposome (angl. *multilamellar vesicles*, MLV). Enoslojne liposome nadalje delimo po velikosti na majhne enoslojne liposome (angl. *small unilamellar vesicles*, SUV), velike enoslojne liposome (angl. *large unilamellar vesicles*, LUV) in gigantske enoslojne liposome (angl. *giant unilamellar vesicles*, GUV). Poznamo

tudi večvezikularne liposome (angl. *multivesicular vesicles*, MVV), kjer je več manjših veziklov ujetih znotraj enega sloja lipidnega dvosloja (25, 26).



**Slika 3:** Razdelitev liposomov glede na slojnost, velikost in notranjo strukturo (povzeto po viru 27)

Razvoj liposomskih formulacij se je začel s prvo generacijo, ki predstavlja glede na zapletenost zgradbe lipidnega dvosloja liposome z najenostavnejšo zgradbo. V to skupino liposomov spadajo liposomi izdelani iz enostavnih naravnih ali sinteznih fosfolipidov. Zanje je značilna hitra odstranitev iz krvi s celicami RES. V drugo generacijo uvrščamo sterično stabilizirane liposome s hidrofilno površino. Le-ti imajo običajno površino pokrito z molekulami hidrofilnega polimera polietilenglikola (PEG) in jih imenujemo pegilirani liposomi. Površina liposoma je zaradi prisotnosti molekul PEG močno hidratirana in zaščitena pred adsorpcijo plazemskih proteinov in opsonizacijo. Razpolovni čas pegiliranih liposomov v krvnem obtoku se podaljša tudi do 72 h. Tretjo generacijo predstavljajo prav tako sterično stabilizirani pegilirani liposomi, ki pa na svoji površini nosijo ligande za ciljno dostavo učinkovine npr. v tumorsko tkivo (ciljana dostava in sproščanje učinkovine) (26).

Osnovni gradniki lipidnega dvosloja liposomov so naravni (npr. fosfatidiletanolamin, fosfatidilholin, fosfatidilserin) ali sintezni (npr. dipalmitol fosfatidilholin) fosfolipidi. Fosfatidilholin, imenovan tudi lecitin, je naravni fosfolipid, ki se najpogosteje uporablja za pripravo liposomov. Molekula fosfatidilholina je sestavljena iz glicerola, ki ima dve hidroksilni skupini zaestreni z maščobnimi kislinami (slika 2). Lipofilni verigi maščobnih kislin predstavljata nepolarni del molekule (hidrofobni rep). Preostala hidroksilna skupina



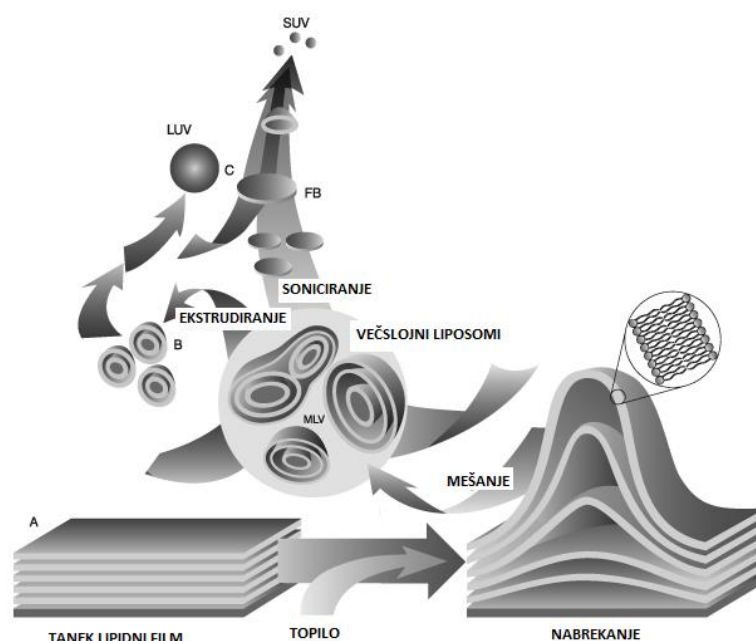
v molekula glicerola je zaestrena s fosforno kislino, na katero se veže holin ter tako tvori polarni del fosfatidilholina (hidrofilna glava) (28, 29). V lipidni dvosloj liposomov vgrajujemo poleg osnovnih gradnikov tj. fosfolipidov tudi holesterol. Molekula holesterola ima v strukturi steroidni obroč, zato je molekula planarna in rigidna. V fosfolipidnem dvosloju se orientira s hidroksilno skupino v vodno fazo, hidrofobni steroidni obroč pa se umesti med lipofilne verige fosfolipidov. Vključevanje holesterola v fosfolipidni dvosloj poveča njegovo rigidnost in zmanjša prepustnost dvosloja za prehajanje ZU (29, 30).

### **1.5.1 Stabilnost liposomov**

Ločimo fizikalno, kemijsko in mikrobiološko stabilnost liposomov (31). Glavne sestavine liposomov so, kot je bilo že prej omenjeno, fosfolipidi; bodisi naravnega ali sinteznega izvora. Fosfolipidi, ki vsebujejo v strukturi zaestrene nenasičene maščobne kisline, so podvrženi oksidaciji, kar lahko povzroči spremembe v prepustnosti lipidnih dvoslojev liposomov, ki so zgrajeni iz takšnih fosfolipidov. Lipidna peroksidacija in hidroliza lipidov predstavljata glavni poti kemijske razgradnje lipidov. Oksidacijo fosfolipidov lahko preprečimo z vključevanjem antioksidantov ali EDTA (kelira kovinske ione) v formulacijo in shranjevanjem liposomov v inertni atmosferi. Hidrolizo estrskih vezi zmanjšamo z optimizacijo pH in ionske moči formulacije ter z nadzorom temperature izdelave in shranjevanja (28). Posledica fizikalnih procesov, ki vplivajo na stabilnost liposomov, je sproščanje vgrajenih ZU iz liposomov ter spremembe v velikosti liposomov kot posledica agregiranja in fuzije liposomov. Agregiranje je reverzibilen proces združevanja liposomov, medtem ko ob zlivanju (fuziji) liposomov ireverzibilno nastane nova struktura koloidne ali večje velikosti (32). Težavam zaradi fizikalne nestabilnosti liposomov se lahko izognemo ali jih omilimo s povečanjem naboja liposomov (elektrostatska stabilizacija) ali z zmanjšanjem ionske moči disperznega medija. Alternativno lahko preprečimo združevanje liposomov tudi s pomočjo sterične stabilizacije. (33). Formulacije liposomov so vodne disperzije, zato so podvržene mikrobiološki kontaminaciji. Ustrezno mikrobiološko kakovost formulacij lahko vzdržujemo z dodajanjem ustreznih konzervansov. Večina formulacij liposomov pa je namenjena parenteralnemu, zato morajo biti te formulacije sterilne (27). Sterilnost liposomov lahko dosežemo z membransko filtracijo ali aseptičnim postopkom priprave liposomov.

## 1.5.2 Metode za pripravo liposomov

Obstajajo različne metode za pripravo liposomov, ki se razlikujejo v načinu odstranjevanja organskih topil in dispergiranju lipidov v vodnem mediju (34). Hidratiranje tankega lipidnega filma (slika 4) je najbolj razširjena metoda za pripravo MLV (35). Postopek vključuje pripravo tankega lipidnega filma, hidratiranje lipidnega filma ob rahlem stresanju in poenotenje velikosti liposomov. Lipide najprej popolnoma raztopimo v organskem topilu, da zagotovimo homogenost lipidnega filma, ki ga bomo pripravili. Z odparevanjem topila dobimo tanek lipidni film, ki ga hidratiramo z dodatkom vodnega medija, katerega sestava zavisi od nadaljnje uporabe lipidnih veziklov. Primerni mediji za hidratiranje so prečiščena voda, pufri, raztopine elektrolitov in neelektrolitov (npr. manitola). S stresanjem dobimo disperzijo liposomov, ki vsebuje cel razpon velikosti veziklov od manjših SUV do večjih MLV liposomov. Pomanjkljivost metode je heterogena porazdelitev velikosti liposomov v disperziji, zato potrebujemo v nadaljevanju priprave metode za zmanjševanje in poenotenje velikosti, kot sta soniciranje in ekstrudiranje (34).



**Slika 4:** Shematski prikaz tvorbe liposomov z metodo hidratiranja tankega lipidnega filma (povzeto po viru 35)

Poleg mehanskih postopkov izdelave liposomov, ki temeljijo na dispergiranju lipidov v vodno fazo, obstajajo tudi številni postopki dispergiranja raztopine lipidov v organskem

topilu v vodno fazo in metode odstranjevanja detergentov. Metoda z injiciranjem vključuje raztapljanje lipidov v organskem topilu (npr. etanol ali eter), ki mu sledi injiciranje raztopine lipidov v vodni medij in spontan nastanek enoslojnih liposomov. Detergente pri koncentraciji enaki ali višji kot je kritična micelska koncentracija (CMC) uporabljamo za raztapljanje lipidov. Ko detergent odstranimo, postanejo miceli postopoma bogatejši s fosfolipidi in tvorijo LUV. Detergente iz takšnega sistema odstranimo z nadzorovano dializo (39).

### **1.5.3 Metode za zmanjševanje in poenotenje velikosti liposomov**

Soniciranje je preprosta metoda za zmanjševanje in poenotenje velikosti liposomov. MLV lahko soniciramo bodisi z ultrazvočno kopeljo ali z ultrazvočno sondo. S sondo vnašamo v sistem energijo v obliki ultrazvočnih valov s frekvencami nad 20 kHz, kar povzroči zmanjšanje MLV v SUV (24, 35). Glavne pomanjkljivosti metode so morebitna razgradnja fosfolipidov lipidnega dvosloja in vgrajenih ZU ter kontaminacija s kovinami, ki jih lahko odpušča sonda, zato za pripravo SUV pogosteje uporabljamo soniciranje v ultrazvočni kopeli, kjer je vnos energije manjši (34). Ekstrudiranje je proces, s katerim disperzijo MLV strukturno modificiramo v disperzijo LUV. Liposome pod tlakom ekstrudiramo skozi pore polikarbonatne membrane definiranih velikosti (pore velikosti nekaj deset nm do nekaj  $\mu\text{m}$ ) (24).

### **1.5.4 Uporaba liposomov**

Liposome uporabljamo v farmaciji zaradi njihovih edinstvenih lastnosti za dostavo ZU in diagnostikov (25). Liposomi so biokompatibilni, biorazgradljivi, netoksični, neimunogeni ter primerni za sistemsko in lokalno aplikacijo. Vanje lahko vgradimo tako hidrofilne (v vodne predelke liposoma), kot hidrofobne (v lipidni dvosloj) in amfifilne (na medfazo med vodnim predelkom in lipidnim dvoslojem) ZU. Z vgrajevanjem v liposome ZU zaščitimo pred zunanjimi vplivi, povečamo stabilnost ZU ter zmanjšamo potencialne stranske učinke. Na površino liposomov lahko vežemo specifične ligande, kar omogoča aktivno ciljno dostavo ZU (36, 37). Liposomi se v terapiji uporabljajo predvsem za zdravljenje sistemskih glivičnih okužb in pri zdravljenju raka, poleg tega kažejo velik potencial na področju dostave cepiv, ter v diagnostiki in zdravljenju drugih boleznih. Liposome uporabljamo kot dostavni sistem za vnos antibiotikov, protivirusnih učinkovin, prostaglandinov, steroidov, nesteroidnimi protivnetnih učinkovin, insulina in drugih. Registrirana zdravila na osnovi

liposomskih formulacij so predstavljena v preglednici I. Za laično javnost je bolj kot uporaba liposomov v farmaciji znana njihova uporaba v kozmetiki in manj v živilski industriji (33).

**Preglednica I:** Registrirana nanozdravila z liposomi (36, 38)

Ime zdravila	Zdravilna učinkovina	Indikacija
Ambisome®	Amfotericin B	Glivične infekcije
DaunoXome®	Daunorubicin	Kaposijev sarkom
Doxil®	Doksorubicin	Kaposijev sarkom, rak dojke, rak jajčnikov
Myocet®	Doksorubicin	Rak dojke
Visudine®	Verteporin	Starostna degeneracija rumene pege
Depocyt®	Citarabin	Limfomatozni meningitis
DepoDur®	Morfijev sulfat	Pooperativna bolečina
Epaxal®	Rekonstituiran virusom	Hepatitis A
Inflexal® V	Rekonstituiran virusom	Gripa
Ventus™	Prostaglandin E1	Kronične vnetne bolezni

## 1.6 MAGNETOLIPOSOMI (ML)

Magnetoliposomi (ML) so vezikli tj. liposomi z vgrajenimi magnetnimi nanodelci (npr. SPION-i). ML predstavljajo nanodostavni sistem, ki združuje prednosti liposomov in magnetnih nanodelcev. Na ta način zagotovimo visoko učinkovitost vgrajevanja ZU, njeno stabilnost in zagotovimo magnetne lastnosti dostavnega sistema. Z izpostavljenostjo ML permanentnemu enosmernemu magnetnemu polju povzročimo urejanje magnetnih delcev znotraj fosfolipidnih dvoslojev, kar lahko povzroči agregiranje ML, fuzijo in sproščanje ZU na tarčno mesto (13). ML izdelamo med pripravo liposomov z vgrajevanjem suspenzije nanodelcev železovega oksida v vodno sredico liposomov (40).

## 1.7 METODE ZA VREDNOTENJE MAGNETOLIPOSOMOV

Za vrednotenje ML uporabljamo številne metode npr. fotonsko korelacijsko spektroskopijo (PCS), lasersko Dopplerjevo anemometrijo (LDA), presevno in vrstično elektronsko mikroskopijo (TEM, SEM), infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo

(FTIR), rentgensko difraktometrijo (XRD) in kvantno interferometrijo (SQUID) (41, 42).

Metode nam omogočajo vrednotenje naslednjih lastnosti ML:

- Velikost delcev (PCS, TEM, SEM)
- Naboj na površni delcev (LDA)
- Morfologija delcev (TEM, SEM)
- Kristaliničnost strukture delcev (XRD)
- Magnetne lastnosti (SQUID)
- Identifikacija funkcionalnih skupin na površini (FTIR) (16)

### **1.7.1 Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS)**

Zetasizer Nano ZS izvaja meritve povprečne velikosti koloidnih delcev na osnovi fotonske korelacijske spektroskopije (PCS). Metoda meri velikost delcev na podlagi detekcije intenzitete fluktuacij laserske svetlobe, ki se siplje na koloidnih delcih, ki se v vzorcu Brownovo gibajo (naključno gibanje delcev zaradi trkov z molekulami disperznega medija). Majhni delci se gibljejo hitreje, večji pa počasneje. Odnos med velikostjo in hitrostjo Brownovega gibanja je definirana s Stokes-Einsteinovo enačbo. Kot rezultat dobimo povprečno velikost delcev in polidisperzni indeks (PDI), ki je merilo za širino porazdelitve velikosti delcev. Vrednosti PDI so med 0 in 1, kjer vrednost 0 označuje popolnoma monodisperzno disperzijo, vrednost 1 pa popolnoma polidisperzno distribucijo velikosti delcev (43).

### **1.7.2 Laserska Dopplerjeva anemometrija (LDV)**

Zeta potencial (ZP) je elektrokinetični potencial, ki določa stanje površinskega naboja na mejni strižni površini trdnega telesa in tekočine. ZP določamo z metodo laserske Dopplerjeve anemometrije (LDA) (sinonim LDV angl. *Laser Doppler Velocimetry*). Z laserjem posvetimo na delce v vzorcu, kar povzroči sipanje svetlobe na delcih v disperziji. Ker se delci gibljejo v električnem polju, elektroforezna mobilnost delcev (proti nasprotno nabiti elektrodi) povzroči spremembo frekvence sipane svetlobe (Dopplerjev efekt), ki jo naprava izmeri (43).

## 2 NAMEN DELA

Namen našega raziskovalnega dela je z metodo hidratiranja tankega lipidnega filma izdelati homogeno disperzijo ML, ki se bodo odzivali na zunanje magnetno polje in potencialno omogočili ciljano dostavo ZU.

Najprej bomo spreminjali sestavo lipidov v formulaciji, tako da bomo izbrali sestavo z optimalno vsebnostjo holesterola. Nadalje bomo spreminjali parametre metode tankih filmov z namenom, da bi v liposome uspeli vgraditi klastre SPION-ov. Lipidni film bomo hidratirali z izbranim fiziološko sprejemljivim medijem in s pomočjo centrifugiranja ugotavljali vpliv disperznega medija na vgrajevanje klastrov SPION-ov v liposome. V liposome bomo vgrajevali klastre SPION-ov z različno nabito površino. Zaradi potencialne uporabe *in vivo* nas bo zanimal vpliv ionske moči disperznega medija na stabilnost dispergiranih koloidnih struktur. Na osnovi ionskih interakcij med ioni soli in klastri SPION-ov bomo poskušali iz disperzije ML ločiti nevgrajene klastre SPION-ov. Disperzijo ML bomo stabilizirali z dodajanjem stabilizatorja poloksamera 188 in poiskali koncentracijo, pri kateri izkazujejo liposomi največjo fizikalno stabilnost. Izvedli bomo tudi ločevanje delcev s superparamagnetnimi lastnostmi ob prisotnosti zunanjega magnetnega polja.

Izdelane ML bomo fizikalno vrednotili tako, da bomo s PCS in LDA izmerili povprečno velikost in polidisperznost delcev ter njihov ZP. Tekom raziskave bomo vzorce disperzije ML vrednotili tudi organoleptično. Spremljali bomo barvo in opalescentnost vzorca ter prisotnost s prostim očesom vidnih delcev in sedimenta.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

Za izdelavo liposomov smo uporabili:

- Lipoid S 100: nehidrogeniran sojin fosfatidilholin (Lipoid GmbH, Nemčija)
- Lipoid S PC-3: hidrogeniran sojin fosfatidilholin (Lipoid GmbH, Nemčija)
- Holesterol (Lex d.o.o, Slovenija)

V liposome smo vgradili disperzijo klastrov SPION-ov, obloženih s slojem silicijevega dioksida, ki so jih pripravili v podjetju Nanos Scientifica d.o.o. (Ljubljana, Slovenia)

- (A) iNANOVative™ s funkcionalizirano površino (proste  $-NH_2$  skupine) (4 mg/mL, datum priprave: 10.01.2014)
- (B) iNANOVative™ s funkcionalizirano površino (proste  $-NH_2$  skupine) (2,1 mg/mL, datum priprave: 27.04.2014)
- (C) iNANOVative™ s funkcionalizirano površino (proste  $-COOH$  skupine) (1,5 mg/mL, datum priprave: 28.04.2014)

Ostali uporabljeni materiali:

- Etanol (96 %, Merck, Nemčija)
- Poloksamer 188 (Lutrol® F68) (BASF, Nemčija)
- Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija)
- Natrijev klorid (Merck, Nemčija)
- Manitol (Sigma, Nemčija)
- Fosfatni pufer (PBS), smo pripravili z raztapljanjem 4,000 g NaCl, 0,100 g KCl, 1,815 g  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  in 0,120 g  $KH_2PO_4$  v 400 mL prečiščene vode, uravnavali na pH 7,4 s HCl in dopolnili do 500mL s prečiščeno vodo.

### 3.2 LABORATORIJSKA OPREMA:

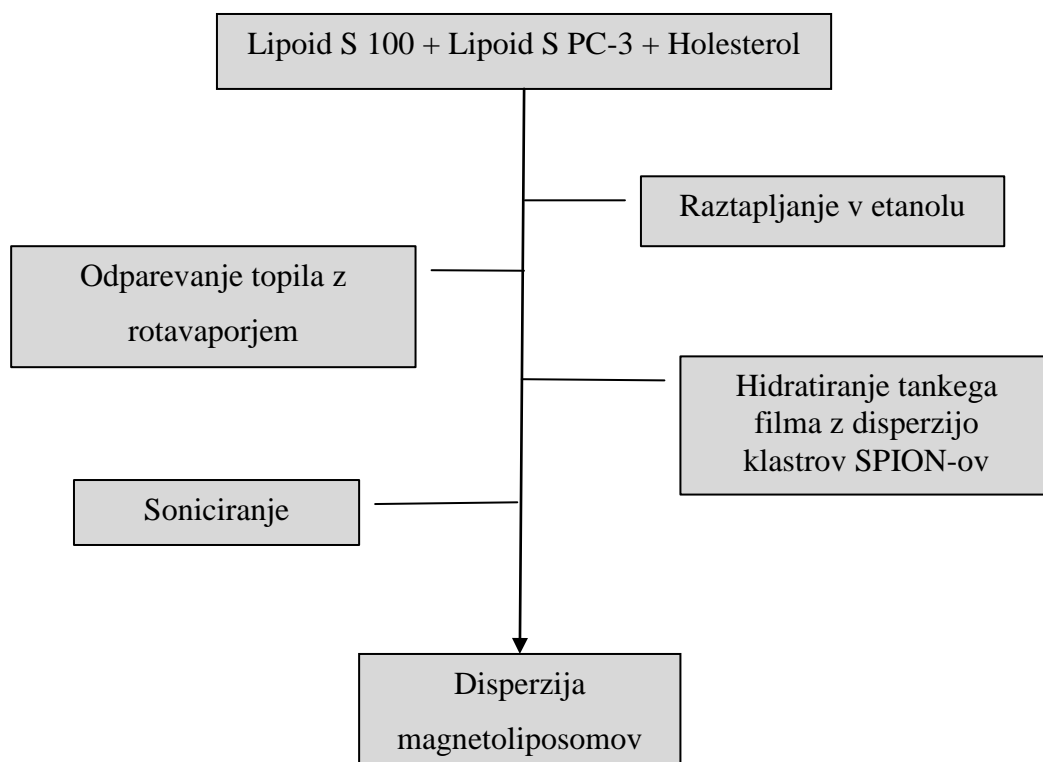
- Analitska tehtnica Mettler Toledo AG245 (Mettler toledo, Nemčija)
- Mehanske pipete 10-100, 100-1000 in 1000-5000  $\mu\text{L}$  (Biohit, Helsinki, Finska)
- Nastavki za pipete (Biohit, Helsinki, Finska)
- Plastične centrifugirke z navojem in pokrovčkom (Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- Mikroeprovete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Vibracijsko mešalo Vibramix10 Vortex (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Ultrazvočna sonda (Ultrasonic processor, Illinois, ZDA)
- Zetasiter Nano ZS (Malvern instruments, Malvern, Velika Britanija)
- Polistirienska kiveta (Sarstedt Numbrecht, Nemčija)
- Celica za merjenje zeta potenciala (DTS1060, Malvern, Velika Britanija)
- Rotavapor (Rotavapor R-114, Büchi, Švica)
- Vodna kopel (B-721, Büchi, Švica)
- Polikarbonatne membrane 1000 nm in 400 nm (Avestin, Nemčija)
- Ekstrudor (LiposoFast-Basic, Avestin, Nemčija)
- Ultracentrifuga (Sorvall WX100 Ultracentrifuge, Termo Scientific)



### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Izdelava magnetoliposomov z metodo tankih filmov

Liposome smo pripravili iz zmesi nehidrogeniranega in hidrogeniranega sojinega fosfatidilholina ter holesterola z metodo tankih filmov (slika 5). V stekleno 100 mL bučko z okroglim dnom smo natehtali Lipoid S100, Lipoid SPC3 in holesterol (preglednica II) ter dodali 5 mL etanola. Zmes smo nežno ročno stresali na vodni kopeli pri 40 °C, da so se lipidi popolnoma raztopili in nato počakali vsaj 1 h, preden smo odparili topilo. Bučko smo namestili na rotavapor in pod znižanim tlakom (160 mbar) in pri temperaturi 40 °C odparili topilo, da je na steni bučke nastal tanek film lipidov.



**Slika 5:** Shema postopka izdelave ML z metodo tankih filmov

**Preglednica II:** Sestava zmesi lipidov za pripravo liposomov z različno vsebnostjo holesterola

Vzorec	Masni delež holesterola [%]	m Holesterol [mg]	m Lipoid S PC-3 [mg]	m Lipoid S 100 [mg]
V <sub>1</sub>	15	18,75	95,63	10,63
V <sub>2</sub>	20	25,00	88,23	11,76
V <sub>3</sub>	25	31,25	82,72	11,03
V <sub>4</sub>	30	37,50	77,21	10,29
V <sub>5</sub>	35	43,75	71,69	9,56
V <sub>6</sub>	40	50,00	66,18	8,82

Lipidni film smo z nežnim ročnim stresanjem pri sobni temperaturi hidratirali s 5 mL vodne disperzije klastrov SPION-ov, s koncentracijo 62,5 µg/mL. Izhodno disperzijo klastrov SPION-ov smo najprej mehansko premešali z vorteksiranjem in nato z redčenjem pripravili medij za hidratiranje, ki smo ga dali v bučko k predhodno pripravljenemu lipidnemu filmu. Tako so spontano nastali MLV.

Kot medij za hidratiranje lipidnega filma smo uporabili prečiščeno vodo, PBS (pH 7,4) ali raztopino manitola s koncentracijo 58,2 mg/mL.

### 3.3.1.1 Priprava vzorcev praznih liposomov s klastri SPION-ov

Da bi preverili, ali se klastri SPION-ov med hidratiranjem lipidnega filma vgradijo v vezikle ali ostanejo prosti v disperziji, smo po enakem postopku kot liposome z vgrajenimi klastri SPION-ov pripravili vzorec praznih liposomov, ki smo mu nato dodali klastre SPION-ov. Izdelan tanek film lipidov smo hidratirali s 5 mL prečiščene vode, da smo dobili vzorec praznih liposomov. Po soniciranju z ultrazvočno sondo smo disperziji praznih liposomov dodali klastre SPION-ov (A) s koncentracijo 62,5 µg/mL, premešali z vorteksiranjem in počakali 10 min.

Ločitev liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov in prostimi nevgrajenimi klastri SPION-ov v disperziji smo izvedli s postopkom centrifugiranja. Centrifugirali smo 1 mL vzorca 5 min pri  $440 \times g$  in 4 °C.

### 3.3.2 Poenotenje velikosti magnetoliposomov

#### 3.3.2.1 Ekstrudiranje

Pripravljeno disperzijo ML smo potiskali skozi polikarbonatno membrano z definirano velikostjo por. Izvedli smo serije 10-tih prehodov skozi membrano z velikostjo por 1000 nm, dokler nismo dosegli povprečno velikost veziklov v območju velikosti por membrane, nato smo nadaljevali z ekstrudiranjem skozi membrano z velikostjo por 400 nm. Med ekstrudiranjem smo spremljali spreminjanje velikosti liposomov z merjenjem povprečne velikosti in PDI.

#### 3.3.2.2 Soniciranje

Disperzijo 2,5 mL ML smo v plastični centrifugirki kontinuirano sonicirali z ultrazvočno sondo 30 s (amplituda 30%). Ponovili smo 10 ciklov soniciranja, med posameznimi soniciranjmi pa smo počakali vsaj 1 min, da smo preprečili pretirano segrevanje vzorca zaradi vnosa energije v vzorec.

### 3.3.3 Stabilizacija magnetoliposomov s poloksamerom 188.

Preverili smo, kako vpliva dodatek neionogenega stabilizatorja poloksamera 188 na stabilnost ML. Pripravili smo raztopine z različno koncentracijo stabilizatorja, ki smo jih pomešali z vzorcem soniciranih ML (preglednica III). V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 600  $\mu$ L disperzije liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (A, C) in enak volumen predhodno pripravljene raztopine stabilizatorja (preglednica III).

**Preglednica III:** Sestava vzorcev ML s poloksamer 188

Vzorec	$m_{\text{stabilizator}}:m_{\text{lipidov}}$	Koncentracija raztopine stabilizatorja [mg/mL]
S <sub>1</sub>	1:10	2,5
S <sub>2</sub>	1:5	5
S <sub>3</sub>	1:2	12,5
S <sub>4</sub>	1:1	25
S <sub>5</sub>	2:1	50

### 3.3.4 Priprava disperzije magnetoliposomov v raztopini natrijevega klorida

Preverili smo vpliv ionske moči disperznega medija na fizikalno stabilnost ML. Disperziji soniciranih liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (A, C) smo dodali raztopino NaCl različnih koncentracij v volumskem razmerju 1:1, tako da je bil celokupni volumen vzorca 1200  $\mu$ L. Pripravili smo vzorce z naslednjimi koncentracijami NaCl: 2,25, 5,00, 9,00, 11,25 in 13,50 g/L. Raztopine NaCl smo pripravili z redčenjem osnovne raztopine NaCl tj. raztopine z najvišjo koncentracijo NaCl s prečiščeno vodo.

### 3.3.5 Priprava disperzije magnetoliposomov v raztopini NaCl in poloksamera 188

V 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 600  $\mu$ L izdelane sonicirane disperzije ML in ji dodali enak volumen pripravljene raztopine stabilizatorja S<sub>4</sub> ali S<sub>5</sub> (preglednica III). Vzorce ML z vgrajenimi klastri SPION-ov (A) smo pustili pri sobnih pogojih 24 h in nato dodali 600  $\mu$ L raztopine NaCl s koncentracijo 9 g/L, kot je prikazano na sliki 6.



**Slika 6:** Shema priprave vzorcev disperzije ML v raztopini NaCl in poloksamera 188. S<sub>4</sub>-raztopina poloksamera s koncentracijo 25 mg/mL; S<sub>5</sub>-raztopina poloksamera s koncentracijo 50 mg/mL.

### 3.3.6 Ločevanje magnetoliposomov v magnetnem polju

S pomočjo zunanjega magnetnega polja smo izvedli ločevanje delcev (veziklov) s superparamagnetnimi lastnostmi od disperznega medija in koloidnih struktur, ki niso izkazovale magnetnih lastnosti in so ostale dispergirane v mediju. Vzorce disperzije ML v mikrocentrifugirkah (1 mL) smo postavili ob permanentni magnet. Zaradi delovanja magnetnih sil na delce (vezikle) s superparamagnetnimi lastnostmi se je ob steni

mikrocentrifugirke po določenem času pojavila svetlo rjava lisa, ki je predstavljala zbrane magnetne delce. Supernatant smo previdno odpipetirali v drugo mikrocentrifugirko, zbranim delcem pa smo dodali 0,5 mL prečiščene vode in jih s pomočjo vorteksiranja redispergirali.

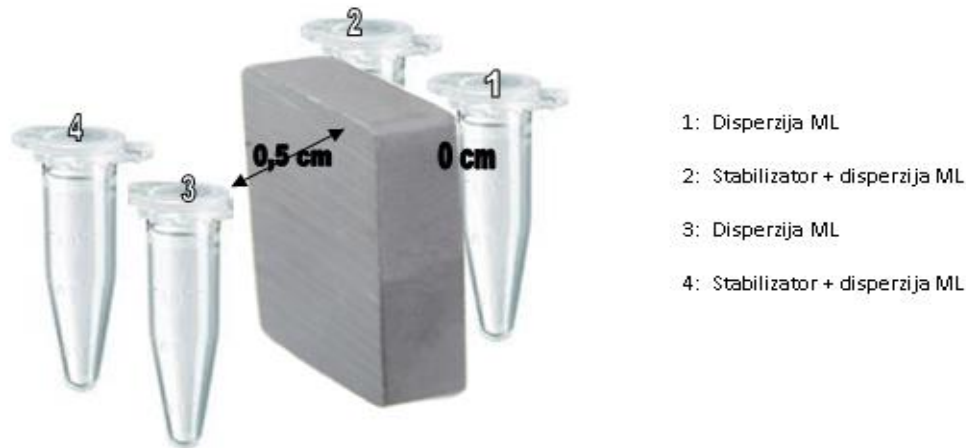
Postopek ločevanja ML v zunanjem magnetnem polju smo spremljali z merjenjem povprečne velikosti, PDI in ZP posameznih frakcij (supernatanta in zbranih delcev).

### **3.3.6.1 Vpliv koncentracije klastrov SPION-ov na ločevanje disperzije v magnetnem polju.**

Disperzije liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (A) s koncentracijo 62,5 µg/mL in 312,5 µg/mL smo izpostavili magnetnemu polju. Po 30 min smo ločili supernatant od magnetnih delcev, ki so se zbrali ob steni mikrocentrifugirke. Zbrane delce smo redispergirali v prečiščeni vodi ter jih skupaj s supernatantom ponovno izpostavili magnetnemu polju in ponovili postopek ločevanja.

### **3.3.6.2 Vpliv razdalje med vzorcem magnetoliposomov in magnetom na ločevanje**

Jakost magnetnega polja se z razdaljo od permanentnega magneta spreminja, zato smo želeli ugotoviti, kako položaj vzorca v magnetnem polju (razdalja od magneta) vpliva na ločevanje struktur z magnetnimi lastnostmi. Odziv na magnetno polje smo preverili na vzorcu disperzije ML s stabilizatorjem poloksamerom 188 ( $m_{\text{stabilizator}}:m_{\text{lipidov}} = 2:1$ ). Vzorce v mikrocentrifugirkah (1 ml) smo postavili ob magnet in na definirano razdaljo od magneta (0,5 cm), kot kontrolni vzorec pa smo uporabili ML brez dodanega stabilizatorja (slika 7). Po določenem času (1 h), ko so se delci z magnetnimi lastnostmi zbrali ob steni mikrocentrifugirke, smo s pipeto previdno ločili supernatant od zbranih delcev in le-te redispergirali v 0,5 mL prečiščene vode.



**Slika 7:** Vpliv razdalje od permanentnega magneta na ločevanje disperzije ML brez stabilizatorja in s stabilizatorjem v magnetnem polju

### 3.3.7 Vrednotenje magnetoliposomov

#### 3.3.7.1 Organoleptično vrednotenje

Vzorci smo organoleptično vrednotili na različnih stopnjah v postopku izdelave ML in tako hitro zaznali morebitne neželene spremembe. Opazovali smo:

- osnovno disperzijo klastrov SPION-ov (potencialno sedimentiranje delcev)
- izgled tankega filma (prisotnost kristalov in morebitna prisotnost znatnih zaostankov topila)
- disperzijo ML po soniciranju (barva, pojav kosmičenja in sedimentacije delcev)
- vzorce pred in po meritvah z Zetasiterjem Nano ZS (prisotnost nečistot, večjih agregatov in mehurčkov, ki bi vplivali na rezultate meritev)
- vzorce po centrifugiranju in ločevanju v magnetnem polju (barva, pojav ločenih faz in sedimentacije delcev)
- spreminjanje vzorcev med shranjevanjem (barva, pojav kosmičenja in sedimentacije delcev).

#### 3.3.7.2 Merjenje velikosti delcev in zeta potenciala

Pripravljenim ML smo izmerili povprečni premer delcev (d), PDI in ZP.

Disperzijo ML (~1,5 mL) smo s kapalko prenesli v polistirensko kiveto ter s PCS metodo z napravo Zetasiter Nano ZS izmerili povprečno velikost in PDI pri naslednjih pogojih: temperatura 25 °C, viskoznost disperznega medija 0,8872 mPas, lomni količnik disperznega medija (RI) 1,330 in kot merjenja 173 °.

Z metodo laserske Dopplerjeve anemometrije smo izmerili ZP delcev v disperziji tako, da smo vzorec ML (~1 mL) z injekcijsko brizgo prenesli v elektroforezno celico ter pri enakih pogojih (temperatura, viskoznost in RI medija) kot pri merjenju velikosti izvedli 3 meritve ZP.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Vpliv vsebnosti holesterola v formulaciji na izdelavo in velikost liposomov

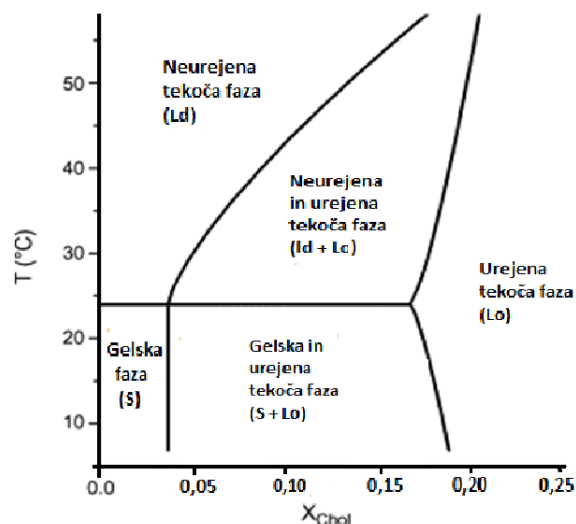
Holesterol predstavlja, odvisno od vrste celic, 25-50 % lipidne faze celičnih membran (39). V raziskavi smo spreminjali sestavo lipidov v formulaciji ML, da bi se glede na vsebnost holesterola čim bolj približali vsebnosti, kot jo najdemo v celičnih membranah *in vivo*. Povečevali smo masni delež holesterola v zmesi lipidov (15, 20, 25, 30, 40%), ter ohranili masno razmerje nehidrogeniranega (Lipoid S 100) in hidrogeniranega (Lipoid S PC-3) sojinega fosfatidilholina.



**Slika 8:** Tanek film lipidov s 30 % (m/m) (levo) in 15 % (m/m) (desno) holesterola na steni bučke

Pri izdelavi tankega filma lipidov so se pri deležih holesterola, ki so bili večji od 20 %, pojavili vidni kristali, film pa ni bil homogeno razporejen po steni bučke (slika 8). Molekule holesterola imajo pomembno vlogo pri faznih prehodih fosfolipidov (slika 9). Z dodajanjem holesterola strukturi fosfolipidov preide gelska faza (S) v tekočo urejeno fazo ( $L_o$ ), kar je opazno tudi na tankem filmu lipidov. Vzorca  $V_1$  in  $V_2$  (preglednica II) sta izkazovala na videz najbolj homogen tanek film lipidov, medtem ko smo pri vzorcih z večjim deležem holesterola ( $V_{3-6}$ , preglednica II) opazili pojav kristalov.



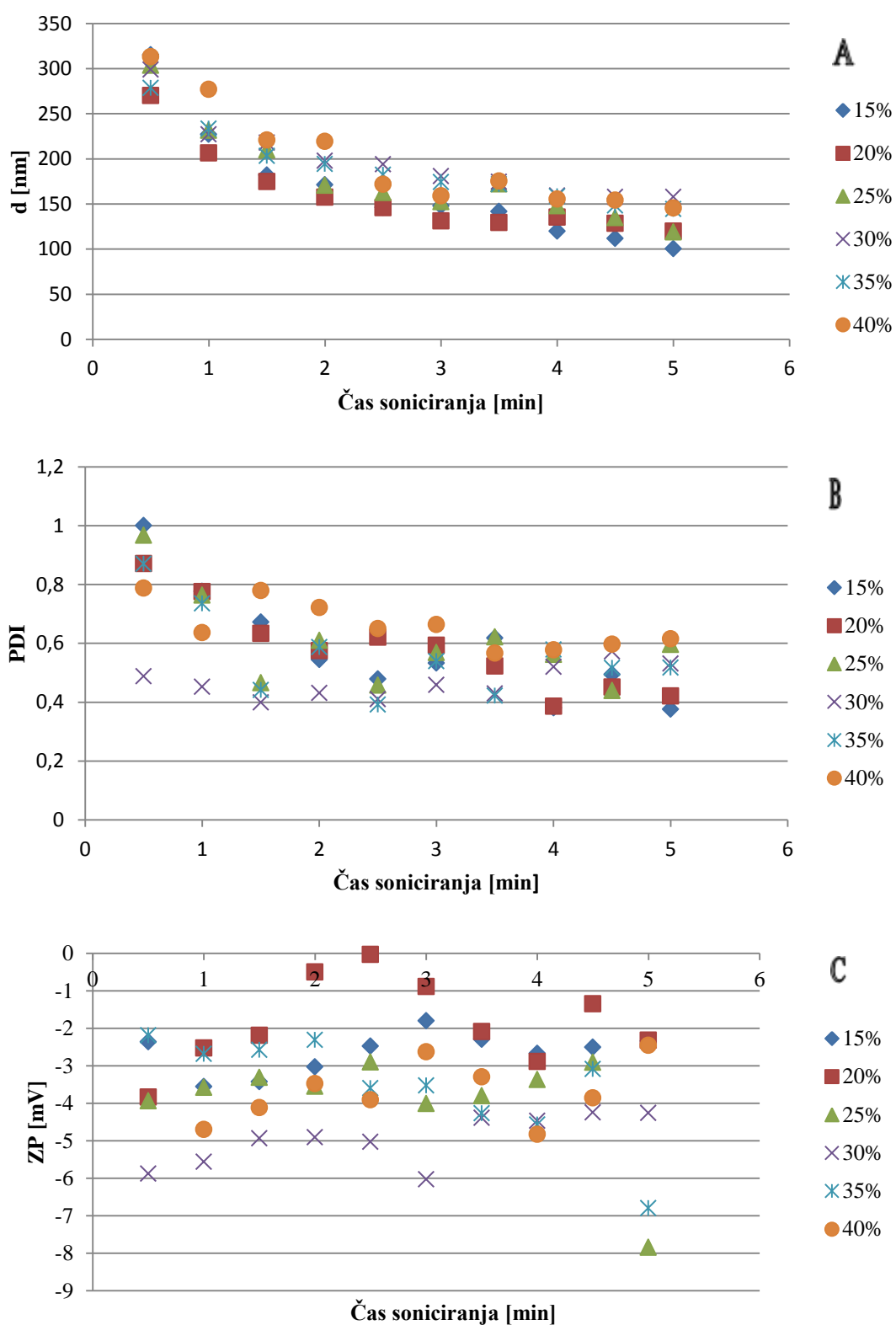


**Slika 9:** Fazni diagram zmesi fosfatidilholina in holesterola. Diagram prikazuje območja neurejene tekoče faze ( $L_d$ ); urejene tekoče faze ( $L_o$ ) in gelske faze (S). Črte predstavljajo fazne prehode, horizontalna linija pa označuje temperaturo glavnega faznega prehoda ( $T_m$ ).  $X_{chol}$  predstavlja masni delež holesterola v zmesi (povzeto po viru 4).

Tudi pri izdelavi liposomov iz pripravljenega tankega filma smo ugotovili, da ima delež holesterola pomemben vpliv. Količina holesterola v fosfolipidnem dvosloju je vplivala na velikost veziklov, ki so bili manjši, če je bila količina holesterola manjša (slika 10A). Po soniciranju je bila povprečna velikost liposomov v disperzijah 100-158 nm. Dobljene rezultate lahko razložimo na osnovi sprememb v fluidnosti membrane, kot posledica vključitve holesterola v fosfolipidni dvosloj. Pričakovati je, da vključitev holesterola v strukturo liposomov naredi fosfolipidni dvosloj manj fluiden, s čimer se izboljša fizikalna stabilnost, kar lahko vpliva na zmanjševanje velikosti s soniciranjem. Pri nižjih vsebnostih holesterola so membrane bolj fluidne in bolj prilagodljive na vpliv ultrazvočnih valov, kar se kaže v manjši povprečni velikosti veziklov. Z naraščajočo vsebnostjo holesterola rigidnost membran, zato je učinek ultrazvoka na zmanjšanje velikosti veziklov manjši in posledično je povprečna velikost veziklov večja (44, 45, 46). Dokazano je bilo, da prisotnost holesterola povzroči povečanje debeline fosfolipidnega dvosloja membrane (47). S povečevanjem deleža holesterola v lipidni zmesi se je polidisperznost liposomov večala (višje vrednosti PDI). Vrednosti PDI nad 0,4 kažejo na polidisperznost vzorcev (slika 10B). Cilj naše raziskave je bil pripraviti glede na povprečno velikost karseda homogene vzorce ML. Kadar imamo široko porazdelitev velikosti delcev v vzorcu (vrednosti PDI nad 0,5), meritve povprečne velikosti s PCS niso zanesljive (43).

Z vključevanjem holesterola v liposome se vrednosti ZP niso bistveno spremenile (slika 10C). Struktura fosfolipida fosfatidilholina ima strukturo iona dvojčka (zwitter ion), zato ima molekula celokupno nevtralen naboj; tudi vključevanje holesterola na naboj liposomov ni vplivalo, saj je holesterol brez naboja. Dobljene vrednosti ZP so bile med -7,84 mV in in -0,03 mV, torej lahko sklepamo, da vzorci dolgoročno nebi bili fizikalno stabilni. V splošnem koloidne disperzije, stabilizirane zgolj elektrostatsko, pri absolutnih vrednosti ZP pod 30 mV niso fizikalno stabilne, saj se delci med seboj ne odbijajo in se združujejo v agregate (43).

Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili, da v nadaljnjih raziskavah uporabimo formulacijo V<sub>1</sub> z najmanjšo vsebnostjo holesterola (15 %), saj sta bila povprečna velikost veziklov in PDI tega vzorca najmanjša.

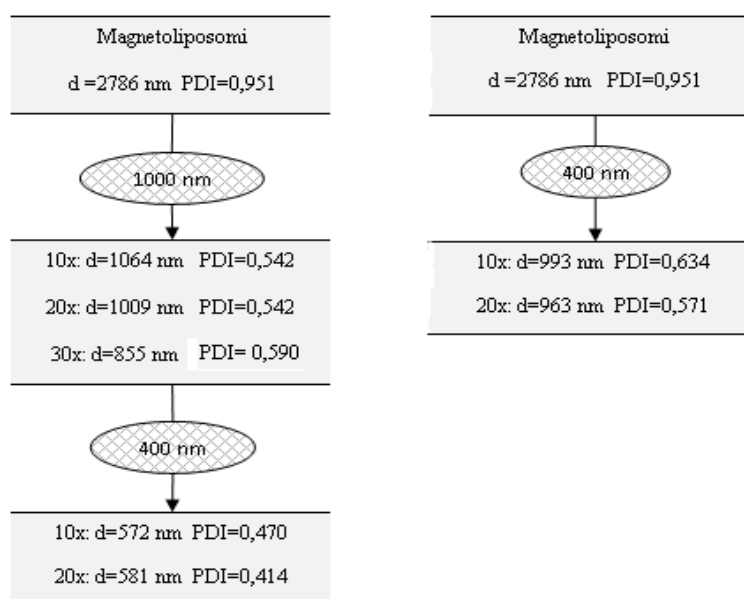


**Slika 10:** Vpliv soniciranja na povprečno velikost ( $d$ ) (A), polidisperzni indeks (PDI) (B) in zeta potencial (ZP) (C) magnetoliposomov z različno vsebnostjo holesterola

## 4.2 Poenotenje velikosti disperzije magnetoliposomov

Za poenotenje velikosti smo v raziskavi najprej preizkusili metodo ekstrudiranja, ki poteka v milejših pogojih v primerjavi s soniciranjem. Pri soniciranju vnašamo v vzorec visoko energijo za zmanjševanje velikosti veziklov, kar pa lahko povzroči destabilizacijo veziklov ali celo kemijsko nestabilnost lipidov v strukturi liposomov (48).

Disperzijo ML z začetno povprečno velikostjo 2786 nm smo ekstrudirali skozi membrano z velikostjo por 1000 nm. Povprečna velikost veziklov se je po 30-tih prehodih membrane zmanjšala (855 nm), vendar je bil PDI dobljene ekstrudirane disperzije visok (nad 0,5), kar nakazuje na heterogenost disperzije ML. Ekstrudiranje istega vzorca smo nadaljevali skozi membrano z manjšo velikostjo por (400 nm) (slika 11). Zaradi izgub vzorca v postopku ročnega ekstrudiranja nam je zmanjkalo vzorca, kar je onemogočilo nadaljnje zmanjševanje velikosti ML z ekstrudiranjem skozi membrane manjše velikosti. Poskusili smo z neposrednim ekstrudiranjem disperzije ML skozi membrano z velikostjo por 400 nm (slika 11). Po 20-tih prehodih skozi membrano sta se povprečna velikost in PDI zmanjšala, vendar so se pore membrane zamašile zaradi prisotnosti večjih agregatov ML v vzorcu. Metoda se ni izkazala za uspešno, saj nismo dosegli želene optimalne velikosti ML tj. povprečne velikosti veziklov ~100 nm; poleg tega je postopek zelo dolgotrajen, zato smo v raziskavi nadaljevali z uporabo metode soniciranja z namenom poenotenja velikosti in slojnosti liposomov.



**Slika 11:** Povprečna velikost ( $d$ ) in PDI magnetoliposomov po ekstrudiranju skozi membrano z velikostjo por 400 nm in 1000 nm

Soniciranje je preprosta metoda za zmanjševanje in poenotenje velikosti liposomov (24). S pomočjo dovajanje energije z ultrazvočnim valovanjem smo uspešno zmanjšali povprečno velikost disperzije ML na ~100 nm ter tako dobili disperzijo majhnih enoslojnih liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (ML). PDI disperzije liposomov po soniciranju je bil ~0,4. V disperzijo po končanem soniciranju so bili poleg ML prisotne tudi druge koloidne strukture tj. prostih klastrov SPION-ov, ki se niso vgradili v liposome, prazni liposomi in miceli, ki prav tako vplivajo na izmerjeno povprečno velikost delcev (veziklov) v vzorcu.

### 4.3 Vpliv medija za hidratiranje na velikost magnetoliposomov

Disperzija liposomov za *in vivo* uporabo mora biti fiziološko sprejemljiva, kar pomeni, da mora biti tak tudi disperzni medij. Tako smo v okviru naše raziskave proučili, kako vpliva zamenjava disperznega medija, ki je bila v osnovni formulaciji prečiščena voda, na lastnosti izdelanih liposomov. Kot disperzni medij smo uporabili raztopino manitola s fiziološko osmolarnostjo (320 mOsmol/l) in PBS. PBS je izotoničen ima fiziološki pH (7,4), kar omogoča njegovo potencialno uporabo *in vivo*.

**Preglednica IV:** Povprečna velikost, PDI in ZP disperzije klastrov SPION-ov (A) in ML v različnih disperznih medijih

Medij		Klastri SPION-ov	ML pred soniciranjem	ML po soniciranju	ML po 48 h	ML po 1 tednu
Prečiščena voda	d [nm]	212,6	2815,0	100,7	118,2	125,4
	PDI	0,086	0,372	0,376	0,397	0,406
	ZP [mV]	-4,07 ± 0,57	-3,60 ± 0,11	-2,34 ± 0,41	-5,92 ± 0,14	-16,70 ± 0,70
PBS	d [nm]	679,8	2706,0	137,6	148,9	140,7
	PDI	0,321	0,562	0,434	0,489	0,358
	ZP [mV]	-13,30 ± 1,50	-3,86 ± 1,00	-1,05 ± 0,05	-1,91 ± 0,33	-4,83 ± 0,33
Raztopina manitola	d [nm]	347,7	2927,0	198,4	189,6	217,0
	PDI	0,239	0,704	0,440	0,456	0,438
	ZP [mV]	23,40 ± 0,78	-3,86 ± 0,79	-1,28 ± 0,21	-4,47 ± 0,35	-4,62 ± 0,29

Rezultati meritev, ki so prikazani v preglednici IV, kažejo vpliv medija za hidratiranje na povprečno velikost ML v disperziji. Povprečna velikost ML po soniciranju je bila večja, če

smo tanek lipidni sloj hidratirali z raztopino manitola. Pri hidratiranju tankega filma s prečiščeno vodo in PBS smo po soniciranju dosegli optimalnejšo povprečno velikost veziklov (100,7 nm oz. 137,6 nm). Vrednosti ZP pri uporabi različnih disperznih medijev se niso bistveno spremenile. Meritve smo izvedli še 48 h in 1 teden po izdelavi. Povprečna velikost in PDI se nista bistveno spremenila, kar pomeni, da so bili vzorci glede na velikost in porazdelitev velikosti dispergiranih struktur fizikalno stabilni.

Ker smo ML pripravili tako, da smo v mediju za hidratiranje lipidnega filma dispergirali klastre SPION-ov, smo preverili tudi, kakšna je velikost samih klastrov SPION-ov v disperznem mediju. Klastri SPION-ov (A) so imeli najmanjšo povprečno velikost delcev v vodi, medtem ko smo pri dispergiranju v raztopini manitola in PBS izmerili večje povprečne velikosti (preglednica IV), zato smo sklepali, da so se klastri SPION-ov vsaj delno združili v agregate. Vzroka sta lahko bila sprememba ionske moči in/ali pH disperznega medija, ki sta povzročila zmanjšanje debeline difuznega sloja na površini delcev, kar je lahko vodilo v nestabilnost in združevanje delcev v agregate (13).

Za izdelavo ML je pomembno, da so klastri SPION-ov v disperznem mediju za hidratiranje tankega sloja lipidov karseda stabilni. Ker pa se je izkazalo, da klastri SPION-ov (A) niso stabilni v fiziološko sprejemljivih disperznih medijih (preglednica IV), smo uporabili klastre SPION-ov (B) in klastre SPION-ov (C), ki so imeli absolutno vrednost ZP večjo kot klastri SPION-ov (A). Klastri SPION-ov (B) so imeli pozitiven ZP (preglednica V), medtem ko so imeli klastri SPION-ov (C) negativen ZP (preglednica VI).

**Preglednica V:** Povprečna velikost, PDI in ZP disperzije klastrov SPION-ov (B) in ML v različnih disperznih medijih

Medij		Klastri SPION-ov (B)	ML pred soniciranjem	ML po soniciranju	ML po 48 h	ML po 1 tednu
Prečiščena voda	d [nm]	462,2	3631,0	106,0	167,5	167,2
	PDI	0,265	0,361	0,403	0,686	0,705
	ZP [mV]	28,30	-0,07	-1,06	-2,08	-3,86
PBS	d [nm]	324,3	3093,0	136,0	127,8	130,7
	PDI	0,254	1,000	0,363	0,368	0,357
	ZP [mV]	6,09	-2,82	-1,24	-1,20	-3,97

**Preglednica VI:** Povprečna velikost, PDI in ZP disperzije klastrov SPION-ov (C) in ML v različnih disperznih medijih

Medij		Klastri SPION-ov (C)	ML pred soniciranjem	ML po soniciranju	ML po 48 h	ML po 1 tednu
Prečiščena voda	d [nm]	445,4	2089,0	87,4	89,8	90,9
	PDI	0,442	0,562	0,293	0,293	0,376
	ZP [mV]	-8,79	-4,85	-3,14	-2,75	-3,63
PBS	d [nm]	432,1	2055,0	138,3	127,8	130,7
	PDI	0,409	1,000	0,395	0,368	0,357
	ZP [mV]	-9,42	-2,07	-0,58	-1,20	-3,97

Klastri SPION-ov (B) in (C) so v prečiščeni vodi in PBS izkazovali primerljive rezultate povprečne velikosti in PDI (preglednica V, VI). Po soniciranju disperzij ML, ki smo jih izdelali s klastri SPION-ov (A), (B) in (C), prav tako ni opaziti bistvenih razlik v povprečni velikosti in PDI, če smo kot disperzni medij uporabili prečiščeno vodo ali PBS (preglednica IV, V, VI). Povprečna velikost vseh vzorcev ML je bila znatno večja, če smo uporabili PBS kot medij za hidriranje.

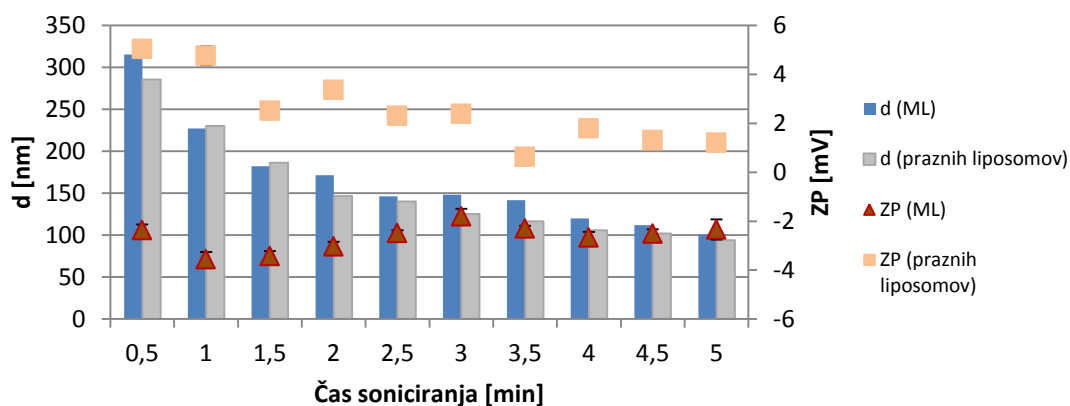
Po 48 h in 1 tednu smo sedimentirane ML zlahka redispergirali. Povprečna velikost velikosti in PDI ML, izdelanih s klastri SPION-ov (B), sta bila rahlo višji kot pri meritvah ML s klastri SPION-ov (A) in (C).

Izmerjen ZP je bil blizu 0 mV, kar nakazuje na fizikalno nestabilnost disperzije ML, ki bi lahko sčasoma tvorila večje agregate. Nizke vrednosti ZP so povzročile tudi nizko razmerje med signalom in šumom pri meritvah ZP, kar je zahtevalo dolgotrajnejše merjenje z Zetasizerjem Nano ZS, zato smo izvedli samo eno meritev ZP. Vgrajevanje klastrov SPION-ov (B) ni pokazalo obetavnejših rezultatov, zato smo raziskavo nadaljevali s klastri SPION-ov (A) in (C).

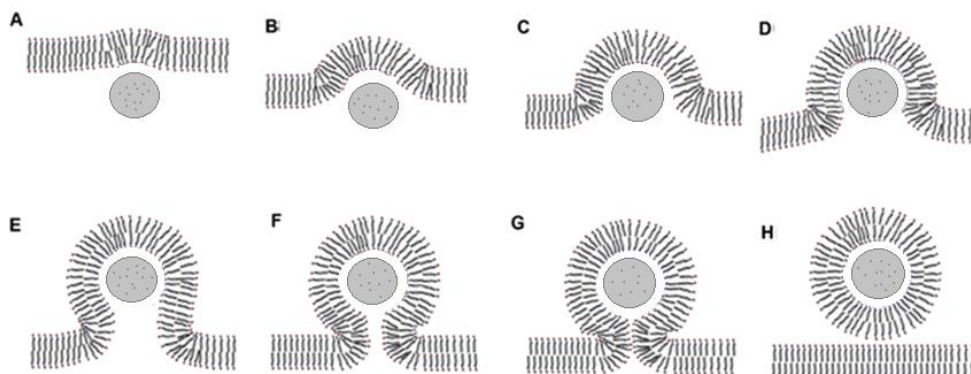
#### 4.3.1 Vpliv hidriranja na vgrajevanje klastrov SPION-ov

Primerjali smo velikost in ZP praznih liposomov ter liposomov v katere smo med hidriranjem vgradili klastre SPION-ov (A) (slika 12). Rezultati kažejo, da se z vgrajevanjem klastrov SPION-ov rahlo poveča povprečna velikost veziklov v disperziji ML. Po soniciranju smo dobili disperzijo praznih liposomov bele barve s povprečno velikosti veziklov 94 nm in disperzijo ML svetlo rjava barve s povprečno velikostjo

veziklov 101 nm. Glede na vrednosti ZP klastrov SPION-ov (A) ( $-4,07 \pm 0,57$  mV) in disperzije praznih liposomov ( $1,21 \pm 0,33$  mV) ne moremo zagotovo sklepati, da so klastri SPION-ov vgrajeni v ML, katerih izmerjen ZP je bil  $-2,34 \pm 0,41$  mV. Sprememba ZP je lahko pokazatelj vgrajevanje klastrov SPION-ov v liposome. ZP se ne bi spremenil, če bi se vsi klastri SPION-ov vgradili v notranjost liposomov, tako pa lahko ostanejo prosti v disperziji ali adsorbirani na površino liposomov, kar vpliva na izmerjen ZP (slika 13).



**Slika 12:** Povprečna velikost delcev ( $d$ ) in ZP v disperziji praznih liposomov in disperziji liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (ML)



**Slika 13:** Shematski prikaz vključevanja klastrov SPION-ov nanometrskje velikosti v liposome: (I) klastri SPION-ov se adsorbirajo na membrano z elektrostatskimi silami (A); (II) uvihavanje membrane, ki objame nanometrski klaster (B-F); (III) odcepitev vezikla od lipidnega filma (G, H) (povzeto po viru 49)

S pomočjo centrifugiranja smo poskusili ločiti liposome z vgrajenimi klastri SPION-ov od nevgrajenih klastrov SPION-ov. Glede na literaturo (50) smo pričakovali pojav treh



različnih frakcij: na dnu vsebnika frakcijo nevgrajenih klastrov SPION-ov, nad njo frakcijo liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov in supernatant s praznimi liposomi (slika 14). Po centrifugiranju disperzije ML smo dobili dve ločeni frakciji: sediment in supernatant (preglednica VII). V sedimentu so bili agregati klastrov SPION-ov, ki smo jih lahko dispergirali s pulznim soniciranjem (povprečna velikost delcev 225,1 nm; PDI 0,245; ZP - 11,60 ± 0,36). Velikost delcev v sedimentu je bila primerljiva s povprečno velikostjo klastrov SPION-ov (A) v vodi (~200 nm), torej lahko sklepamo, da so bili v sedimentu res prisotni nevgrajeni klastri SPION-ov. V supernatantu je ostala disperzija ML z vgrajenimi klastri SPION-ov in morebitni prazni liposomi.

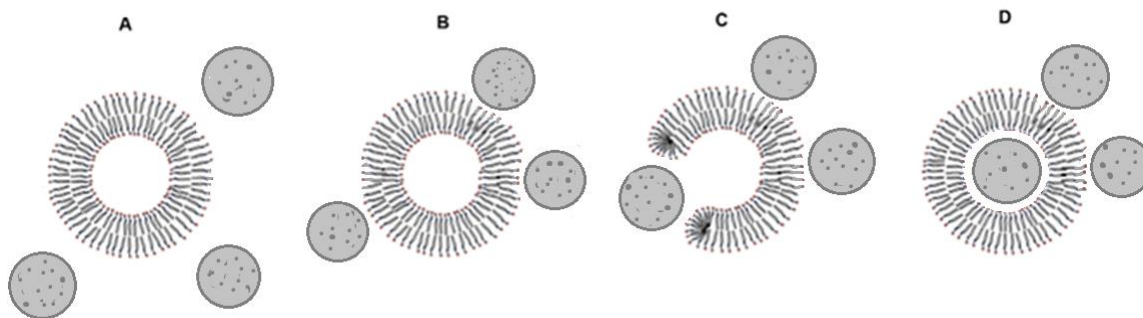


**Slika 14:** Shematski prikaz ločenih frakcij po centrifugiranju

**Preglednica VII:** Povprečna velikost, PDI in ZP nanostruktur v frakcijah vzorca ML po centrifugiranju

Frakcija	d [nm]	PDI	ZP [mV]	Barva
Začetni vzorec ML	100,7	0,376	-3,12 ± 0,49	svetlo rjava
Supernatant	93,7	0,334	3,12 ± 0,49	bela, s svetlo rjavim odtenkom
Sediment	441,8	0,246	-8,92 ± 0,75	temno rjava

Nadalje nas je zanimalo, kaj se zgodi, če že izdelani disperziji soniciranih praznih liposomov dodamo klastre SPION-ov (A). Na ta način smo pripravili disperzijo s povprečno velikostjo dispergirane faze 105,9 nm, PDI 0,41 in ZP 0,610 ± 0,20. Na podlagi dobljenih rezultatov nismo mogli ugotoviti, ali so se klastri SPION-ov naknadno vgradili v prazne liposome ali so ostali prosti v disperziji (slika 15).



**Slika 15:** Shematski prikaz potencialnih interakcij klastrov SPION-ov z lipidno membrano liposomov in vgraditev v jedro že izdelanih liposomov: približevanje klastrov SPION-ov površini lipidne membrane (A), adsorpcija klastrov SPION-ov na površino lipidne membrane in rahlo uvihanje membrane (B), oblikovanje pore v lipidni membrani (C), vgraditev klastrov SPION-ov v jedro liposomov (D) (povzeto po viru 49)

S centrifugiranjem tako pripravljenega vzorca tj. dodatek klastrov SPION-ov k že izdelani disperziji praznih liposomov so se ločile tri frakcije (slika 14, preglednica VIII). Spodnja frakcija temno rjava barva kaže prisotnost nevgrajenih klastrov SPION-ov, ki so se, glede na izmerjeno povprečno velikost (425 nm), združili v agregate. Srednja frakcija je vsebovala liposome z vgrajenimi klastrami SPION-ov (ML), kar dokazuje svetlo rjava barva značilna za disperzijo ML. Večja izmerjena povprečna velikost delcev srednje frakcije (558 nm) glede na povprečno izmerjeno velikost ML je posledica potencialne napake pri prenosu vzorca v merilno kiveto, saj smo lahko poleg srednje frakcije zajeli tudi del zgornje in spodnje frakcije. Zgornjo frakcijo (supernatant) je predstavljala disperzija praznih liposomov ter ostalih koloidnih struktur. S postopkom centrifugiranja smo vzorec izpostavili delovanju centrifugalne sile, kar je lahko povzročilo vgrajevanje nevgrajenih klastrov SPION-ov v prazne liposome ter prehajanje že vgrajenih klastrov SPION-ov iz notranjosti liposomov v disperzni medij. Predvidevamo, da se klastrami SPION-ov ne vgrajujejo v liposome le med procesom hidriranja tankega lipidnega filma, temveč lahko prihaja do vključevanja klastrov SPION-ov v liposome tudi, če v vzorec vnašamo dodatno energijo ali ga izpostavimo delovanju zunanje sile npr. med soniciranjem, centrifugiranjem ali izpostavitvi magnetni sili. Kadar so prisotne privlačne elektrostatske interakcije med klastrami SPION-ov ter lipidnim dvoslojem prihaja do adsorpcije delcev na površino liposomov, kar lahko povzroča vgrajevanje klastrov SPION-ov v liposome skozi pore lipidnega dvosloja (slika 15). Na ta način se lahko, ob prisotnosti elektrostatskih interakcij, klastrami SPION-ov vgrajujejo tudi tekom shranjevanja vzorca (49).

**Preglednica VIII:** Povprečna velikost, PDI in ZP nanostruktur v frakcijah disperzije praznih liposomov, ki smo jim naknadno dodali klastre SPION-ov, po centrifugiranju

Frakcija	d [nm]	PDI	ZP [mV]	Barva
Zgornja	83,72	0,250	3,63 ± 0,26	bela
Srednja	557,9	0,378	1,92 ± 0,21	svetlo rjava
Spodnja	424,9	0,378	-4,66 ± 0,41	temno rjava

#### 4.4 Vpliv stabilizatorja na magnetoliposome

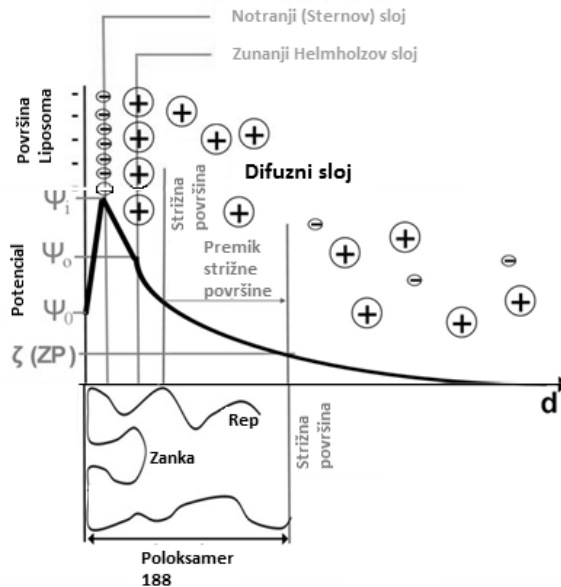
ML smo stabilizirali z različnimi koncentracijami poloksamera 188 ter poskušali najti koncentracijo, pri kateri bi disperzija ML izkazovala največjo fizikalno stabilnost. Rezultati meritev kažejo (preglednica IX), da se je povprečna velikost delcev v vzorcu z dodanim stabilizatorjem po 48 h in 1 tednu ohranila, saj nismo opazili trenda naraščanja povprečne velikosti delcev v vzorcu liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (A) in (C).

Poloksamer 188 se adsorbira na liposome in jih sterično stabilizira, kar je lahko razlog za nekoliko povečano velikost liposomov, ki jo izmerimo s PCS. Sterična stabilizacija povzroči sterični odboj tj. preprečuje približevanje veziklov in njihovo agregiranje. Za učinkovito delovanje se mora stabilizator močno adsorbirati na površino liposomov, hkrati pa se morajo segmenti molekule stabilizatorja iztezati v disperzijo in tako tvoriti čim debelejši sterični sloj na površini liposomov. Če je gostota adsorbiranih molekul stabilizatorja na površini liposomov nizka, imajo molekule stabilizatorja okoli sebe dovolj prostora in se lahko zvijejo v klobčič. Molekule stabilizatorja, ki so gosto adsorbirane na površini liposomov, pa nimajo dovolj prostora in se zato nahaja v iztegnjeni konformaciji, kar posledično poveča debelino steričnega sloja na površini delcev (veziklov) (51). Pri koncentracijah nad CMC tvori poloksamer 188 micelle, kar lahko vpliva na zmanjšanje izmerjene povprečne velikosti delcev v disperziji, s povečevanjem koncentracije poloksamera 188 pa lahko začnejo nastajati večji agregati (52).

**Preglednica IX:** Povprečna velikost, PDI in ZP vzorcev ML z dodanim steričnim stabilizatorjem poloksamerom 188

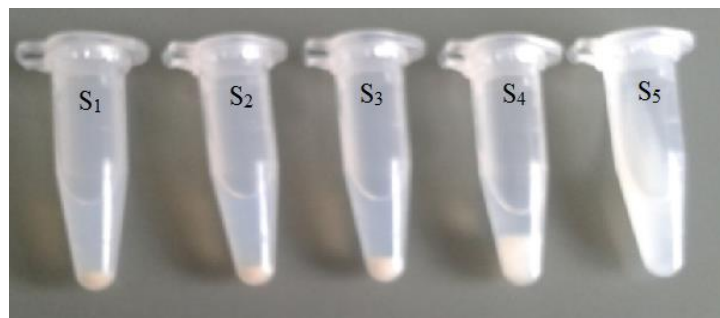
Vzorec		Liposomi z vgrajenimi klastri SPION-ov (A)			Liposomi z vgrajenimi klastri SPION-ov (C)		
		Ob izdelavi	48 h	1 teden	Ob izdelavi	48 h	1 teden
S <sub>1</sub>	d [nm]	118,6	120,7	122,0	104,3	103,2	114,5
	PDI	0,378	0,391	0,427	0,285	0,356	0,419
	ZP [nm]	-4,55 ± 0,10	-4,85 ± 0,07	-5,60 ± 0,36	-2,72 ± 0,15	-8,26 ± 0,84	-20,6 ± 0,32
S <sub>2</sub>	d [nm]	122,3	123,4	123,7	103,9	104,0	102,8
	PDI	0,401	0,393	0,423	0,297	0,372	0,374
	ZP [nm]	-4,18 ± 0,14	-6,34 ± 0,15	-13,80 ± 0,36	-2,90 ± 0,44	-4,65 ± 0,42	-10,20 ± 1,00
S <sub>3</sub>	d [nm]	118,7	121,3	120,5	104,4	104,0	104,3
	PDI	0,383	0,370	0,390	0,286	0,339	0,367
	ZP [nm]	-4,63 ± 0,31	-3,54 ± 0,30	-8,90 ± 0,30	-2,12 ± 0,34	-4,42 ± 0,25	-11,10 ± 1,10
S <sub>4</sub>	d [nm]	119,4	119,6	121,0	103,3	104,5	106,6
	PDI	0,382	0,376	0,392	0,280	0,379	0,294
	ZP [nm]	-4,15 ± 0,21	-3,63 ± 0,10	-12,30 ± 0,25	-2,34 ± 0,12	-4,33 ± 0,22	-9,50 ± 0,90
S <sub>5</sub>	d [nm]	121,5	121,2	119,7	106,3	105,8	106,9
	PDI	0,377	0,396	0,383	0,284	0,359	0,332
	ZP [nm]	-4,36 ± 0,10	-3,15 ± 0,20	-7,24 ± 0,56	-2,27 ± 0,17	-7,07 ± 0,10	-11,70 ± 0,11

Adsorpcija steričnega stabilizatorja na površino ML premakne strižno površino globlje v disperzijo (na večjo razdaljo od površine delcev), kar zmanjša vrednost ZP liposomov (slika 16). Glede na meritve (preglednica IX) se ZP s povečevanjem koncentracije stabilizatorja ni spreminjal; smo pa opazili naraščanje ZP pri shranjevanju vzorcev po 48 h in 1 tednu. Poloksamer 188 je površinsko aktivna snov (PAS), ki lahko povzroči penjenje vzorca. Zaznana nihanja vrednosti ZP so lahko posledica napačnih meritev zaradi prisotnih mehurčkov v celici za merjenje ZP. Pri meritvah smo zanemarili spremembo viskoznosti disperznega medija, na katero lahko vpliva prisotnost poloksamera 188 (54).



**Slika 16:** Shematski prikaz ZP ML z adsorbiranimi molekulami steričnega stabilizatorja (Povzeto po viru 53)

Organoleptično smo ocenjevali izgled vzorcev disperzij ML z dodanim steričnim stabilizatorjem ob izdelavi, po 48 h in 1 tednu. Vzorci praznih liposomov ter liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (A) in (C) so pri shranjevanju kazali podobne rezultate (slika 17). Zaradi dodanega stabilizatorja so vzorci disperzije ML spremenili barvo iz svetlo rjave v belo barvo. Po 48 h in 1 tednu smo pri vzorcih  $S_1$ ,  $S_2$  in  $S_3$  opazili svetlo rjav sediment, medtem ko je supernatant ostal opalescenten. Prisotni sediment smo z rahlim stresanjem zlahka redispergirali. Vzorca  $S_4$  in  $S_5$  z višjo koncentracijo steričnega stabilizatorja nista izkazovala prisotnosti rjavega sedimenta, smo pa opazili bel sediment in rahlo opalescenten supernatant. Rezultati kažejo, da smo s povečevanjem koncentracije steričnega stabilizatorja v vzorcu izboljšali stabilnost disperzije ML. Pri najvišji proučevani koncentraciji steričnega stabilizatorja je bil volumen sedimenta skoraj enak volumnu vzorca, zato pričakujemo, da bi z nadaljnjim povečevanjem koncentracije poloksamera 188 lahko posedanje popolnoma preprečili in tako dosegli fizikalno stabilnost disperzije.



**Slika 17:** Vzorci disperzije liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (A) z naraščajočo koncentracijo poloksamera 188 (od 1,25 do 25 mg/mL od leve proti desni) po 1 tednu

#### 4.5 Vpliv ionske moči disperznega medija na magnetoliposome

Ionska moč disperznega medija vpliva na stabilnost dispergiranih koloidnih struktur. Klastri SPION-ov so zaradi učinka ionskih interakcij med delci in ioni soli občutljivi na prisotnost soli v disperznem mediju (40, 56), medtem ko bi naj bili liposomi stabilni v prisotnosti soli. Tako smo pričakovali, da bo dodatek NaCl v disperzijo ML spodbudil združevanje nevgrajenih klastrov SPION-ov v agregate in njihovo obarjanje, medtem ko bodo ostali liposomi dispergirani. Koncentracija soli v disperziji ML vpliva na tanjšanje difuznega sloja ionov na površini delcev, zato se lahko delci bolj približajo, kar poveča verjetnost njihovega združevanja. Debelejši kot je električni dvosloj na površini dispergiranih delcev, stabilnejši je koloidni sistem. Stabilnost koloidnih sistemov lahko razložimo z DLVO teorijo, ki opisuje interakcije med dvema delcema na osnovi privlačnih van der Waalsovih in odbojnih elektrostatskih sil (57, 58, 59). Znano je, da se stabilnost strukture liposomov ne spremeni signifikantno pri koncentracijah NaCl, ki so manjše od 1 M (40), zato sedimentirajo samo nevgrajeni klastri SPION-ov po dodatku NaCl v vzorec. Glede na dobljene rezultate (preglednica X) lahko trdimo, da takoj po izdelavi dodatek NaCl v vzorec ni povzročil povečanja povprečne velikosti delcev v disperziji, kar bi lahko nakazovalo, da so bili klastri SPION-ov vgrajeni v liposome, zato povečana ionska moč disperznega medija ni povzročila njihovega agregiranja. Pri shranjevanju disperzije ML v disperznem mediju z dodanim NaCl pa se je pojavil svetlo rjav sediment, ki lahko predstavlja agregate nevgrajenih klastrov SPION-ov. Z ročnim stresanjem pa smo lahko sediment redispergirali tako, da s prostim očesom ni bilo opaznih temno rjavih agregatov klastrov SPION-ov. Rezultate raziskav vpliva ionske moči disperznega medija na stabilnost ML lahko primerjamo z rezultati, ki smo jih dobili po postopku centrifugiranja disperzije ML, kjer smo prav tako ločevali liposome z vgrajenimi klastri SPION-ov od

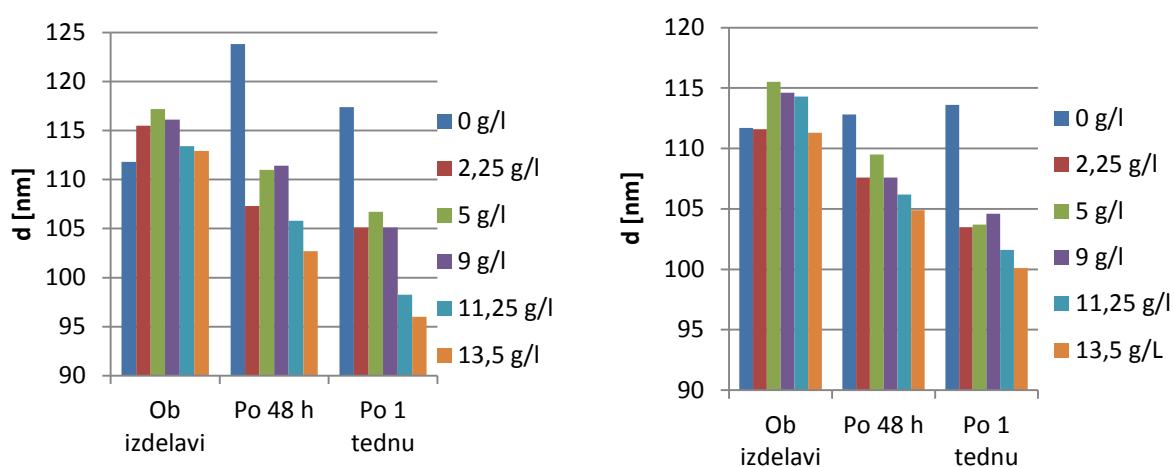
nevgrajenih klastrov SPION-ov in dokazali prisotnost slednjih. Zaključimo lahko, da na podlagi izvedenih raziskav ne moremo zanesljivo potrditi prisotnosti nevgrajenih klastrov SPION-ov v vzorcu ML, zato so potrebne še nadaljnje raziskave.

**Preglednica X:** Povprečna velikost (d), PDI in ZP vzorcev liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (A) in (C), pri različnih koncentracijah dodanega NaCl

Koncentracija NaCl v vzorcu		Liposomi z vgrajenimi klastri SPION-ov (C)			Liposomi z vgrajenimi klastri SPION-ov (A)		
		Ob izdelavi	Po 48 h	Po 1 tednu	Ob izdelavi	Po 48 h	Po 1 tednu
0 g/L	d [nm]	111,7	112,8	113,6	111,8	123,8	117,4
	PDI	0,379	0,372	0,407	0,378	0,431	0,452
	ZP [nm]	-5,04 ± 0,47	-10,10 ± 0,67	-16,3 ± 0,20	-1,45 ± 0,84	-3,16 ± 0,23	-11,4 ± 0,54
2,25 g/L	d [nm]	111,6	107,6	103,5	115,5	107,3	105,1
	PDI	0,362	0,285	0,362	0,380	0,361	0,333
	ZP [nm]	-4,09 ± 0,14	-7,58 ± 0,57	-9,58 ± 0,25	-1,03 ± 0,53	-3,67 ± 0,13	-10,8 ± 0,75
5 g/L	d [nm]	115,5	109,5	103,7	117,2	111,0	106,7
	PDI	0,369	0,284	0,390	0,424	0,408	0,387
	ZP [nm]	-2,70 ± 0,52	-6,40 ± 0,25	-9,8 ± 0,27	-1,12 ± 0,42	-2,14 ± 0,02	-7,59 ± 0,49
9 g/L	d [nm]	114,6	107,6	104,6	116,1	111,4	105,1
	PDI	0,379	0,287	0,367	0,397	0,390	0,386
	ZP [nm]	-3,59 ± 0,11	-4,31 ± 0,28	-7,53 ± 0,46	-1,14 ± 0,39	-1,80 ± 0,12	-5,31 ± 0,37
11,25 g/L	d [nm]	114,3	106,2	101,6	113,4	105,8	98,3
	PDI	0,38	0,358	0,352	0,386	0,370	0,410
	ZP [nm]	-3,43 ± 0,19	-4,22 ± 0,59	-7,19 ± 0,59	-1,07 ± 0,25	-2,24 ± 0,89	-4,12 ± 0,70
13,5 g/L	d [nm]	111,3	104,9	100,1	112,9	102,7	96,0
	PDI	0,360	0,282	0,360	0,389	0,367	0,404
	ZP [nm]	-3,23 ± 0,19	-3,42 ± 0,36	-4,82 ± 0,45	-1,06 ± 0,11	-1,92 ± 0,16	-3,67 ± 0,14

Rezultati meritev (preglednica X) kažejo, da se s časom povprečna velikost ML v prisotnosti NaCl zmanjša, kar je lahko posledica prehajanja vode iz notranjosti liposomov v medij zaradi osmotskega učinka. Osmoza je posledica koncentracijskega gradienta NaCl na obeh straneh fosfolipidnega dvosloja tj. prehajanje vode iz področja z nižjo koncentracijo raztopljenih soli (notranjost liposomov) v področje z višjo koncentracijo NaCl (disperzni medij) (58). Z večanjem koncentracije soli v disperznem mediju opazimo

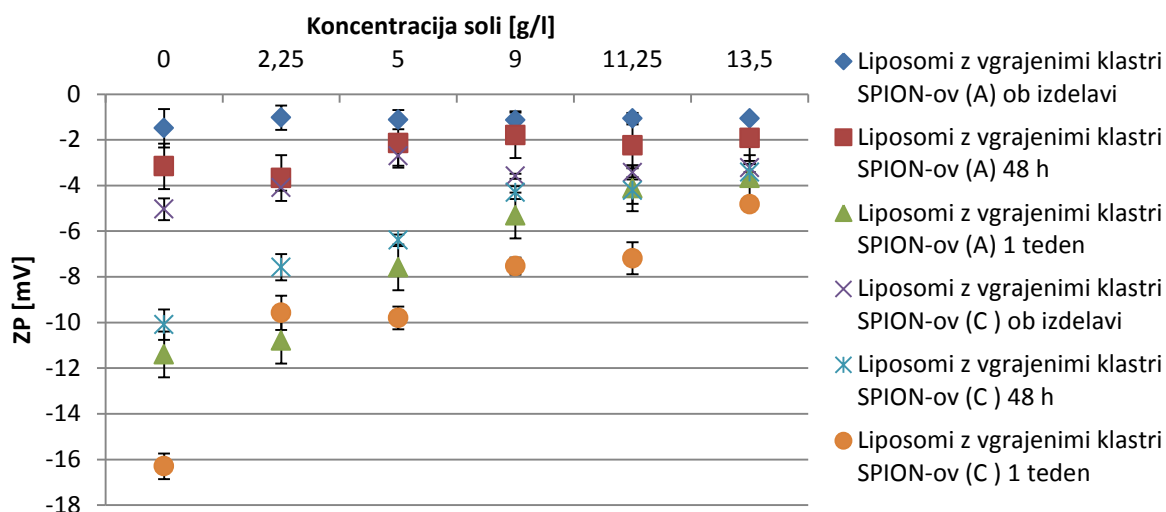
večje zmanjšanje velikosti veziklov 48 h in 1 teden po izdelavi liposomov (slika 18). Torej lahko sklepamo, da je zaradi hipertoničnosti disperznega medija, v katerem so bili dispergirani ML voda prehajala iz notranjosti liposomov v disperzni medij, zato se je povprečna velikost liposomov zmanjšala (59). Zmanjšanje povprečne velikosti liposomov lahko razložimo tudi na osnovi interakcij NaCl s fosfolipidnim dvoslojem. Na<sup>+</sup> prodirajo v membrano liposoma in se vežejo na fosfatno skupino fosfatidilholina, medtem ko Cl<sup>-</sup> ostanejo v disperziji. Vezava natrijevih ionov povzroči dehidracijo fosfolipidov, kar zmanjša hidratacijski ovoj na površini liposomov ter posledično zmanjša povprečno velikost liposomov (60).



**Slika 18:** Vpliv NaCl na povprečno velikost liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (A) (desno) in SPION-ov (C) (levo) ob izdelavi, po 48 h in 1 tednu

Vpliv NaCl na fizikalno stabilnost disperzije ML smo raziskali tudi z merjenjem ZP delcev v disperziji. Debelina električnega dvosloja na površini delcev je odvisna od koncentracije ionov v raztopini. Pri višji koncentraciji soli se površinski naboj kompenzira na krajši razdalji od površine delca, kar pomeni hitrejši padec ZP in tanjšo difuzno plast. Posledično se zmanjša fizikalna stabilnost koloidne disperzije (53). Meritve prikazane na sliki 19 potrjujejo, da se je vrednost ZP zniževala s povečevanjem koncentracije soli v vzorcu. ZP, ki smo ga izmerili 48 h in 1 teden po izdelavi disperzije ML, je bil večji v primerjavi z ZP, ki smo ga izmerili takoj po izdelavi. Rezultat je lahko posledica termodinamskih sprememb na površini koloidnih struktur, kar vpliva na površinski naboj struktur.





**Slika 19:** Vpliv koncentracije NaCl na ZP liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov (A) in (C)

#### 4.6 Vpliv ionske moči disperznega medija na sterično stabilizirane magnetoliposome

Stabilizacijo ML lahko dosežemo z nadzorom koncentracije elektrolitov, ki vplivajo na odbojne elektrostatske sile med delci in s pomočjo sterične stabilizacije (15). Preverili smo vpliv ionske moči na disperzije ML, ki smo jih stabilizirali s poloksamerom 188. Uporabili smo vzorca ML  $S_1$  ( $m_{\text{stabilizator}}:m_{\text{lipidov}}=1:1$ ) in  $S_2$  ( $m_{\text{stabilizator}}:m_{\text{lipidov}}=2:1$ ), saj sta glede dobljene rezultate (preglednica X) kazala največjo stabilnost. V vzorca smo dodali NaCl, da smo dosegli končno koncentracijo NaCl v vzorcu 9 g/L, kar ustreza fiziološki osmolarnosti (320 mOsmol/l).

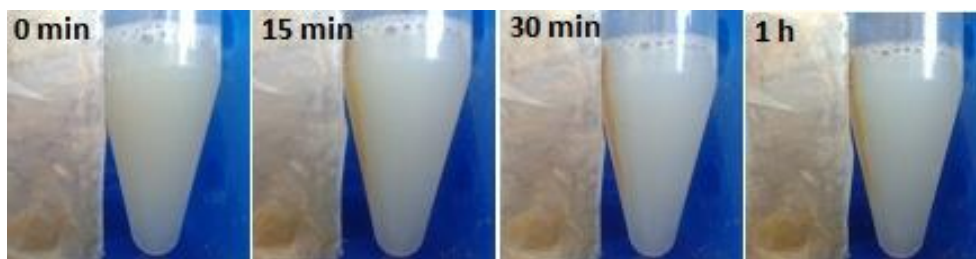
Liposomi stabilizirani s poloksamerom 188 so bili bolj odporni na vpliv ionske moči elektrolita kot nestabilizirani vzorci ML. Višja koncentracija steričnega stabilizatorja je stabilizirala liposome pred vplivom povečane ionske moči disperznega medija, saj se je s staranjem vzorca povprečna velikost delcev v vzorcu ohranila (preglednica XI). Pri vzorcu brez stabilizatorja se je povprečna velikost 48 h in 1 teden po izdelavi liposomov ohranila. S pomočjo sterične stabilizacije smo dosegli fizikalno stabilno disperzijo ML, katero lahko uporabimo *in vivo*, saj je odporna na vpliv NaCl v koncentraciji, kot jo vsebuje fiziološka raztopina.

**Preglednica XI:** Vpliv stabilizatorja in elektrolita na stabilnost disperzije ML

Vzorec		Ob izdelavi	Po 48 h	Po 1 tednu
0 g/L NaCl +0 mg poloxamer 188	d [nm]	115,0	113,2	116,3
	PDI	0,397	0,404	0,424
	ZP [mV]	-4,04 ± 0,14	-4,37 ± 0,18	-7,04 ± 0,36
9 g/L NaCl +0 mg poloxamer 188	d [nm]	113,5	99,7	91,5
	PDI	0,414	0,362	0,357
	ZP [mV]	-1,43 ± 0,23	-1,66 ± 0,15	-5,99 ± 0,30
0 g/L NaCl +25 mg poloxamer 188	d [nm]	111,1	111,7	110,3
	PDI	0,401	0,410	0,411
	ZP [mV]	-0,87 ± 0,22	-2,06 ± 0,16	-16 ± 0,61
9 g/L NaCl +25 mg poloxamer 188	d [nm]	119,8	105,5	98,8
	PDI	0,396	0,388	0,384
	ZP [mV]	-2,13 ± 1,22	-1,52 ± 0,19	-4,12 ± 1,28
0 g/L NaCl +50 mg poloxamer 188	d [nm]	112,2	111,5	111,3
	PDI	0,396	0,384	0,396
	ZP [mV]	-1,57 ± 0,16	-3,16 ± 0,26	-8,66 ± 0,61
9 g/L NaCl +50 mg poloxamer 188	d [nm]	116,8	111,0	102,9
	PDI	0,398	0,397	0,374
	ZP [mV]	-0,97 ± 0,24	-1,86 ± 0,41	-3,35 ± 1,15

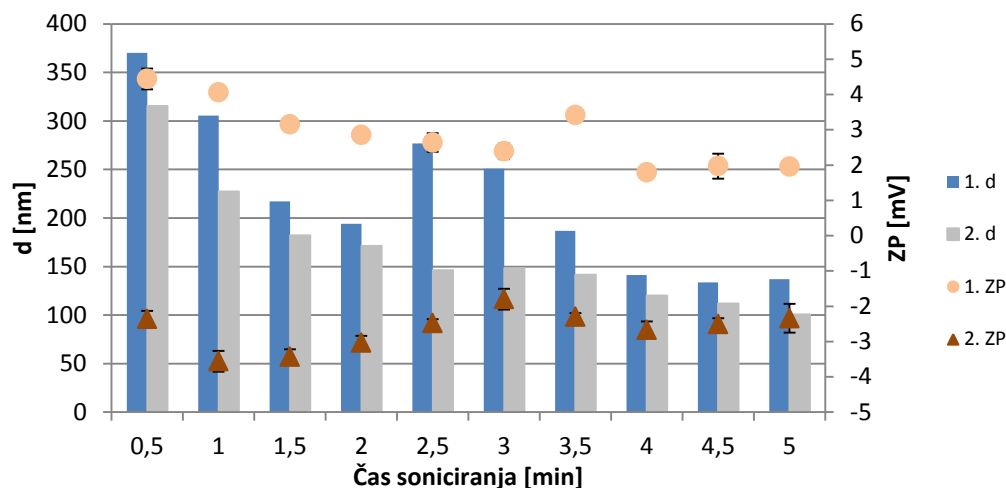
#### 4.7 Vpliv magnetnega polja na magnetoliposome

Izpostavitve disperzije ML zunanjemu magnetnemu polju je povzročila ločevanje delcev (veziklov) s superparamagnetnimi lastnostmi od disperznega medija in dispergiranih koloidnih struktur brez magnetnih lastnosti. Delci (vezikli) s superparamagnetnimi lastnostmi so se po izpostavitvi magnetne sile začeli zbirati ob steni centrifugirke kar smo po ~15 min lahko opazili kot svetlo rjavo liso (slika 20). Na tak način smo lahko ločili liposome, ki niso imeli vgrajenih klastrov SPION-ov od ML in prostih klastrov SPION-ov. Z odstranitvijo permanentnega magneta smo povzročili, da zbrani delci (vezikli) niso več izkazovali magnetnih lastnosti in so se ponovno redispergirali v mediju, kar dokazuje, da delci (vezikli) ne ohranjajo magnetnih lastnosti po odstranitvi magnetnega polja tj. so superparamagnetni.



**Slika 20** : Ločevanje disperzije magnetoliposomov v zunanjem magnetnem polju. Ob permanentni magnet (levo) smo postavili vzorec ML v mikrocentrifugirki (desno).

Cilj naše raziskave je bil doseči karseda učinkovito vgrajevanje klastrov SPION-ov v liposome, kar smo skušali doseči tudi s povečanjem koncentracije klastrov SPION-ov v mediju za hidriranje tankega lipidnega filma. Z večjo koncentracijo klastrov SPION-ov smo želeli v disperziji ML povečati delež delcev (veziklov) s superparamagnetnimi lastnostmi, s čimer smo hoteli izboljšati tudi učinkovitost ločevanja ML v magnetnem polju. Pri izdelavi disperzije ML z višjo koncentracijo klastrov SPION-ov ( $312,5 \mu\text{g/mL}$ ) je bila povprečna velikost veziklov  $136,9 \text{ nm}$ , PDI  $0,456$  in ZP  $1,96 \pm 0,11$ . Glede na ML z nižjo koncentracijo klastrov SPION-ov ( $62,5 \mu\text{g/mL}$ ) je bila pri ML z večjo koncentracijo klastrov SPION-ov povprečna velikost večja, ZP bolj pozitiven (slika 21) in PDI višji. Zaradi večje koncentracije klastrov SPION-ov v disperziji smo pričakovali več prostih klastrov SPION-ov v disperziji in posledično večji vpliv na povprečno velikost delcev v vzorcu. Ker se je povprečna velikost delcev v vzorcu z večjo koncentracijo klastrov SPION-ov povečala, lahko sklepamo, da je povečanje posledica prisotnih agregatov prostih klastrov SPION-ov ali morebitnega povečanja liposomov zaradi večje učinkovitosti vgrajevanja klastrov SPION-ov. Da bi ugotovili, kateri proces je prevladal, bi morali izvesti še nadaljnje raziskave.



**Slika 21:** Vpliv koncentracije klastrov SPION-ov v vzorcu na povprečno velikost in ZP. Vzorec (1) – koncentracija klastrov SPION-ov 312,5  $\mu\text{g/mL}$ ; vzorec (2) – koncentracija klastrov SPION-ov 62,5  $\mu\text{g/mL}$

Po izpostavitvi disperzije ML zunanemu magnetnemu polju smo ločili supernatant (i) in zbrano frakcijo (i) tj. frakcijo, ki se je zbrala ob magnetu zaradi delovanja magnetne sile na delce z izraženimi superparamagnetnimi lastnostmi. Supernatant (i) je bil bele barve, torej so bili prazni liposomi, kar potrjujejo tudi meritve povprečne velikosti (preglednica XII), ki ustrezajo velikosti praznih liposomov. Izmerjena povprečna velikost in rjava barva dispergirane zbrane frakcije (i) kaže na prisotnost klastrov SPION-ov v zbrani frakciji (i). Kljub večji povprečni velikosti delcev v disperziji ML, ki smo jo pripravili z višjo koncentracijo klastrov SPION-ov, smo dobili rahlo manjšo povprečno velikost delcev in nižji PDI v zbrani frakciji (i), kot v disperziji ML z nižjo koncentracijo vgrajenih klastrov SPION-ov.

**Preglednica XII:** Povprečna velikost, PDI in ZP koloidnih struktur v frakcijah po ločevanju disperzije ML 30 min v zunanem magnetnem polju

Koncentracija klastrov SPION-ov vgrajenih v liposome	Supernatant (i)		Zbrana frakcija (i)
	62,5 $\mu\text{g/mL}$	d [nm]	97,8
PDI		0,354	0,493
ZP [mV]		$-3,36 \pm 0,37$	$-9,25 \pm 0,36$
312,5 $\mu\text{g/mL}$	d [nm]	88,0	371,8
	PDI	0,255	0,367
	ZP [mV]	$0,97 \pm 0,30$	$-5,10 \pm 0,10$

Ponovili smo postopek ločevanja v magnetnem polju, tako da smo supernatant (i) in dispergirano zbrano frakcijo (i) ponovno izpostavili zunanjemu magnetnemu polju. V supernatantu (i) ni bilo več prisotnih delcev (veziklov) s superparamagnetnimi lastnostmi, tako da ni prišlo do ločitve faz ob ponovni izpostavitvi magnetnemu polju. V prisotnosti magnetnega polja so se delci (vezikli) s superparamagnetnimi lastnostmi v dispergirani zbrani frakciji (i) ponovno zbrali ob steni mikrocentrifugirke in tako smo dobili zbrano frakcijo (ii); nemagnetne koloidne strukture pa so ostale v supernatantu (ii). V zbrani frakciji (ii), ki je bila glede na zbrano frakcijo (i) dlje časa izpostavljena magnetnemu polju, se je povprečna velikost delcev (veziklov) povečala, kar je posledica združevanja v agregate. Delovanje magnetne sile lahko vpliva na stabilnost koloidnega sistema, saj lahko povzročijo približevanje delcev na razdalje, kjer prevladujejo med delci privlačne sile, kar vodi v združevanje delcev. Magnetna sila je lahko povlekla vgrajene klastre SPION-ov iz liposomov, kar pomeni, da so bili v zbrani frakciji liposomi z vgrajenimi klastri SPION-ov, kot tudi nevgrajeni klastri SPION-ov. V supernatantu (ii), ki je bil bele barve, so bili dispergirani prazni liposomi, kar so pokazale meritve povprečne velikosti (preglednica XIII). Večja povprečna velikost delcev (veziklov) v supernatantu (ii) s koncentracijo klastrov SPION-ov 62,5 µg/mL je lahko tudi posledica nenatančnosti pri zbiranju frakcij, saj smo lahko zajeli tudi del zbrane frakcije (ii). Izmerjen PDI je bil nižji pri višji koncentraciji klastrov SPION-ov v vzorcu, torej je bila ločitev ML v magnetnem polju izboljšana, saj smo dobili bolj homogeno populacijo delcev v supernatantu in zbrani frakciji.

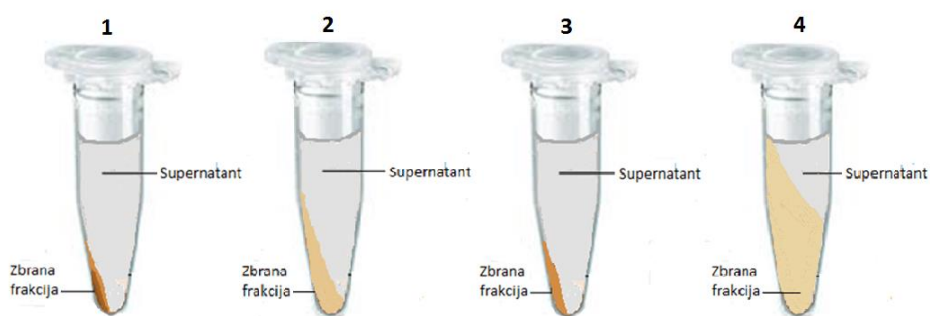
**Preglednica XIII:** Povprečna velikost, PDI in ZP koloidnih struktur v frakcijah po ponovnem 30 min ločevanju disperzije ML v zunanjem magnetnem polju

Koncentracija klastrov SPION-ov vgrajenih v liposome		Supernatant (ii)	Zbrana frakcija (ii)
62,5 µg/mL	d [nm]	401,9	600,5
	PDI	0,472	0,440
	ZP [mV]	-11,9 ± 0,40	-15,7 ± 1,11
312,5 µg/mL	d [nm]	91,24	458,7
	PDI	0,260	0,368
	ZP [mV]	-1,42 ± 0,30	-9,08 ± 0,62

Ločevanje ML tik ob permanentnem magnetu je povzročilo agregiranje delcev (veziklov), zato smo postopek ločevanja poskušali optimizirati s povečanjem razdalje disperzije ML

od permanentnega magneta in sterično stabilizacijo liposomov. Na ta način smo predvidevali, da bomo preprečili agregiranje in dosegli učinkovito ločevanje superparamagnetnih struktur.

Delci so se ob magnetu zbrali hitreje, če je bila razdalja od magneta manjša, saj jakost magnetnega polja pada z oddaljenostjo od magneta. Na hitrost ločevanja je vplivala tudi sterična stabilizacija disperzije ML s poloksamerom 188. Tako stabilizirani liposomi so se počasneje zbirali ob steni mikrocentrifugirke. Primerjavo rezultatov učinkovitosti ločevanja smo izvedli po 2 h, ko smo opazili zbiranje delcev (veziklov) z dodanim stabilizatorjem ob steni mikrocentrifugirke (slika 22).



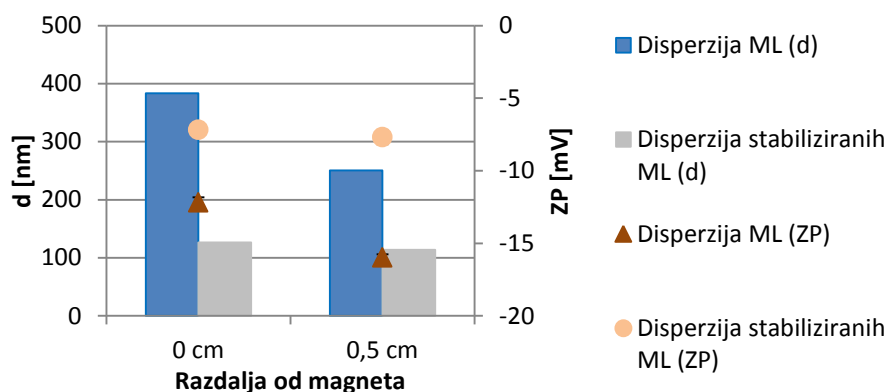
**Slika 22:** Shematski prikaz ločevanja disperzije ML v zunanjem magnetnem polju. Disperzija ML na razdalji 0 cm (1); disperzija stabiliziranih ML na razdalji 0 cm (2); disperzija ML na razdalji 0,5 cm (3); disperzija stabiliziranih ML na razdalji 0,5 cm (4) od permanentnega magneta

Rezultati meritev (preglednica XIV) kažejo vpliv oddaljenosti disperzije ML od permanentnega magneta na učinkovitost ločevanja superparamagnetnih struktur. Večja razdalja je zmanjšala delovanje magnetnih sil na superparamagnetne delce (vezikle), zato le-ti niso agregirali je bila izmerjena povprečna velikost delcev manjša kot pri vzorcu, ki smo ga ločevali neposredno ob permanentnem magnetu (slika 23). Sklepamo, da smo s povečanjem razdalje med vzorcem in permanentnem magnetom zmanjšali obseg agregiranja delcev (veziklov). V zbranih frakcijah vzorcev 1 in 3 (preglednica XIV) so bili prisotni agregati prostih klastrov SPION-ov, ki so bili prisotni v vzorcu in tistih, ki jih je delovanje magnetne sile povleklo iz jedra ML, kar smo dokazali s pulzom soniciranja, ki je agregate razbil in povprečna velikost delcev v vzorcu je bila primerljiva z velikostjo osnovnih klastrov SPION-ov (~200 nm). S stabilizacijo disperzije ML smo dosegli, da so klastri SPION-ov ostali vgrajeni v liposomih tudi po izpostavitvi zunanjemu magnetnemu polju, saj smo izmerili velikost delcev (veziklov), ki je ustrezala velikosti ML (~100 nm). V supernatantu vzorcev 2 in 4 (preglednica XIV) smo izmerili zelo majhno povprečno

velikosti dispergiranih struktur (37 nm oz. 46 nm), kar kaže, da so bili prisotni predvsem miceli prostega stabilizatorja. S sterično stabilizacijo ML in povečanjem razdalje med vzorcem in permanentnim magnetom smo v primeru vzorca 4 preprečili združevanje delcev (veziklov) v agregate, saj se je povprečna velikost delcev po ločevanju v magnetnem polju ohranila. Zaključimo lahko, da smo s povečanjem razdalje med vzorcem ML in permanentnim magnetom in sterično stabilizacijo ML uspeli zmanjšati obseg združevanja delcev (veziklov) v agregate.

**Preglednica XIV:** Povprečna velikost, PDI in ZP delcev v supernatantu in zbrani frakciji po ločevanju disperzije ML brez in z dodanim steričnim stabilizatorjem v zunanem magnetnem polju. Disperzija ML na razdalji 0 cm (1); disperzija stabiliziranih ML na razdalji 0 cm (2); disperzija ML na razdalji 0,5 cm (3); disperzija stabiliziranih ML na razdalji 0,5 cm (4) od permanentnega magneta

Vzorec		Supernatant	Zbrana frakcija
1	d [nm]	82,33	383,3
	PDI	0,245	0,285
	ZP [mV]	-5,22 ± 0,44	-12,2 ± 0,36
2	d [nm]	36,7	126,3
	PDI	0,120	0,276
	ZP [mV]	-4,23 ± 0,94	-7,19 ± 0,275
3	d [nm]	82,17	250,6
	PDI	0,261	0,341
	ZP [mV]	-4,78 ± 0,16	-16,0 ± 0,23
4	d [nm]	45,59	114,0
	PDI	0,261	0,288
	ZP [mV]	-5,08 ± 1,08	-7,69 ± 0,47



**Slika 23:** Vpliv razdalje med disperzijo ML in permanentnim magnetom na povprečno velikost in ZP delcev v redispergiranih zbranih frakcijah

## 5 SKLEP

V raziskavi smo z optimizacijo filmske metode uspešno izdelali ML z vgrajenimi klastri SPION-ov. Zmanjšanje in poenotenje velikosti smo dosegli s pomočjo soniciranja disperzije magnetoliposomov. Ta metoda se je izkazala za uspešnejšo metodo v primerjavi z ekstrudiranjem, kjer smo naleteli na težave zaradi izgub vzorca med ekstrudiranjem in mašenje por membrane. Povprečna velikost ML v disperziji po soniciranju je bila ~ 100 nm.

Pri izdelavi liposomov smo ugotovili, da ima delež holesterola pomemben vpliv na strukturo lipidov v tankem lipidnem filmu, kar se odraža tudi na povprečni velikosti in polidisperznosti liposomov. Če smo povečali delež holesterola v lipidni zmesi, sta se povprečna velikost in PDI povečala. V nadaljnji raziskavi smo uporabili liposome izdelane iz lipidne zmesi s 15 % holesterola, saj so bili glede na izmerjeno povprečno velikost najbolj homogeni.

Ugotovili smo, da je za hidratacijo tankega lipidnega filma najprimernejši medij prečiščena voda. S PBS in raztopino manitola smo poskušali zagotoviti pripraviti fiziološko kompatibilne vzorce za *in vivo* uporabo, vendar nismo dosegli optimalnih velikosti in fizikalno stabilnih disperzij ML. Da bi preverili učinkovitost vgrajevanja klastrov SPION-ov med hidratiranjem, smo uporabili metodo centrifugiranja. Kljub temu, da smo uspeli ločiti frakcijo liposomov z vgrajenimi klastri SPION-ov in frakcijo s prostimi nevgrajenimi klastri SPION-ov, ne moremo zanesljivo potrditi prisotnosti nevgrajenih klastrov SPION-ov v vzorcu ML, zato so potrebne še nadaljnje raziskave. Za vgrajevanje v liposome so se kot obetavni izkazali klastri SPION-ov (A) in (C). Z vgrajevanjem klastrov SPION-ov (B) v liposome namreč nismo dosegli želene fizikalne stabilnosti disperzije.

Glede na podatke v literaturi smo pričakovali, da bomo z dodatkom NaCl spodbudili združevanje nevgrajenih klastrov SPION-ov v agregate, ter jih na ta način ločili od disperzije ML. Rezultati meritev pa so pokazali, da na ta način nismo uspeli ločiti nevgrajenih klastrov SPION-ov od disperzije ML. Izkazalo se je, da ionska moč disperznega medija zmanjša povprečno velikost ML v disperziji. Sklepamo, da se je velikost zmanjšala zaradi osmotskega učinka ali zaradi dehidracije polarnih glav fosfolipidov ob prisotnosti ionov.

Ugotovili smo, da je optimalna koncentracija dodanega stabilizatorja poloksamera 188 50 mg/mL. S stabilizacijo disperzije ML se je povprečna velikost ohranila nespremenjena en



teden, medtem ko smo pri nestabiliziranih ML opazili pojav sedimenta že v času 48 h. Vrednost ZP delcev v disperziji je bila zelo nizka, kar kaže, da disperzija ni elektrostatsko stabilizirana. Stabilnost disperzije ML pri fizioloških pogojih omogoča uporabo *in vivo*. S stabilizacijo disperzije ML smo uspeli zmanjšati vpliv NaCl na fizikalno stabilnost disperzije. Tako stabilizirana disperzija liposomov je bila stabilna vsaj en teden.

Dokazali smo, da imajo superparamagnetni delci izražene magnetne lastnosti le ob prisotnosti zunanjega magnetnega polja, saj so se po prenehanju delovanja magnetne sile redispergirali v mediju. Delci s superparamagnetnimi lastnostmi so se uspešno zbrali ob permanentnem magnetu, vendar smo na podlagi meritev opazili, da so se delno agregirali. Da bi se izognili agregiranju, smo uporabili stabilizator ter v postopku ločevanja delcev v zunanjem magnetnem polju povečali razdaljo med disperzijo ML in permanentnim magnetom. S povečano koncentracijo klastrov SPION-ov v disperznem mediju smo dosegli večji delež delcev (veziklov) s superparamagnetnimi lastnostmi in na ta način izboljšali ločbo v prisotnosti zunanjega magnetnega polja. Hkrati smo opazili, da se je povprečna velikost ML v disperziji povečala, če smo uporabili višjo koncentracijo klastrov SPION-ov v mediju za hidratiranje lipidnega dvosloja.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da smo uspeli izdelati ML z vgrajenimi klastri SPION-ov, ki so potencialno primerni za uporabo v medicini kot nanodostavni sistem za ciljan vnos zdravilnih učinkovin s pomočjo zunanjega magnetnega polja. Ker je disperzija, ki jo dobimo s hidratiranjem lipidnega filma, kompleksna, bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno razviti metodo, ki bo omogočila nedvoumno ločevanje ML od prostih SPION-ov in ostalih nemagnetnih koloidnih struktur, saj se metode, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, niso izkazale kot učinkovite.

## 6 LITERATURA

1. Ramsden J: Essentials of nanotechnology. BookBoon 2009.
2. Mirković B, Turnšek LT, Kos J: Nanotehnologija pri zdravljenju raka. Zdrav vest 2010; 79:146-155.
3. Faraji AH, Wipf P: Nanoparticles in cellular drug delivery. Bioorg & Med Chem 2009; 17: 2950-2962.
4. Mahmoudi M, Sant S, Wang B, Laurent S, Sen T: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. Adv Drug Deliv Rev 2011; 63: 24-46.
5. Veseh O, Gunn WJ, Zhang M: Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. Adv Drug Deliv Rev 2010; 62: 284-304.
6. Ryu JH, Lee S, Son S, Kim HS, Leary FJ, Choi K, Kwon CI: Theranostic nanoparticles for future personalized medicine. J Controlled Release 2014; 190: 477-484.
7. Kocbek P: Novosti na področju farmacevtske nanotehnologije. Farm vest 2012; 63: 75-81.
8. Muthu SM, Leong TD, Mei L, Feng S: Nanotheranostic-Application and Further Development of Nanomedicine Strategies for Advanced Theranostics. Theranostics 2014; 4(6): 660-677.
9. Sun C, Lee SHJ, Zhang M: Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60:1252-1265.
10. Lee KB, Yun HY, Park K: Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. Chem Eng Sci 2014. 1-7
11. Yu MK, Park J, Jon S: Magnetic nanoparticles and their application in image-guided drug delivery. Drug deliv and Transl Res 2012; 2:3-21.
12. Mirković B, Turnšek LT, Kos Janko: Nanotehnologija pri zdravljenju raka. Zdrav vest 2010; 79: 146-155.
13. Wahajuddin, Arora S: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplateforms as drug carriers. Int J Nanomedicine 2012; 7: 3445-3471.
14. Thorek LJD, Chen KA, Czupryna J, Tsourkas A: Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Probes for Molecular Imaging. Ann Biomed Eng 2006; 34: 23-38.

15. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Elst LV, Muller NR: Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterization, and Biological Applications. *Chem. Rev.* 2008; 108: 2064-2110.
16. Faraji M, Yamini Y, Rezaee M: Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. *J Iran Chem Soc* 2010; 1: 1-37.
17. Demas V, Lowery TJ: Magnetic resonance for *in vitro* medical diagnostic. Superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. *New J Phys* 2011; 2-18.
18. Spletni vir: <http://nanos-sci.com/technology.html> (27.08.2014)
19. Hayashi K, Nakamura M, Sakamoto W, Yogo T, Miki H, Ozaki S, Abe M, Matsumoto T, Ishimura K: Superparamagnetic Nanoparticle Clusters for Cancer Theranostic Combining Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia Treatment. *Theranostic* 2013; 3(6): 366-376.
20. Kočevar N, Kristl J: Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi. *Farm vest* 2005; 56: 202-206.
21. Jin R, Lin B, Li D, Ai H: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for imaging and therapy: design consideration and clinical application. *Curr Opin Pharm* 2014; 18: 18-27.
22. Shubayev IV, Pisanic RT, Jin S: Magnetic nanoparticles for theragnostic. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 467-477.
23. Yang HW, Hua MY, Liu HL, Huang CY, Wei KC: Potential of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanotech, Sci Application* 2012; 5: 73-86.
24. Weissig V: *Liposomes Methods and Protocols, Volume 1 Pharmaceutical Nanocarriers*. Springer-Verlag New York 2009.
25. Dua JS, Rana AC, Bhandari AK: Liposome: methods of preparation and application. *IJPSR* 2012; 3: 14-20.
26. Kočevar N, Kristl J: Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi. *Farm vest* 2005; 56: 202-206.
27. Laouini A, Maalej-Jaafar C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H: Preparation, Characterization and Application of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci Biotech* 2012; 1: 147-168.

28. Vemuri S, Rhodes CT: Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv* 1995; 70: 95-111.
29. Laznik J: Stabilnost askorbinske kisline vključene v liposome. *Diplomska naloga* 2013.
30. Ohvo-Rekila H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP: Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* 2002; 41: 66-97.
31. Tikshdeep C, Sonia A, Bharat P, Abshshek C: Liposome Drug Delivery: A Review. *Int J Pharm Chem Sci* 2012; 1(3): 1103-1113.
32. Kulkarni P, Yadav DJ, Vaidya AK: Liposomes: A Novel Drug Delivery system. *Int J Curr Pharm Res* 2011; 3(2): 10-18.
33. Lasic D: Novel application of liposomes. *Tibtech J* 1998; 16: 307-321
34. Spletni vir: [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com) (1.10.2014).
35. Tikshdeep C, Sonia A, Bharat P, Avhishek C: Liposome Drug Delivery: A Review. *Int J Pharm Chem Sci* 2012; 1(3): 1103-1113.
36. Dwivedi C, Yadav R, Tiwari PS, Satapathy T, Roy A: Role of liposome in novel drug delivery system. *J Drug Delv ther* 2014; 4(2): 116-129.
37. Verma S, Singh SK, Syan N, Mathur P, Valecha V: Nanoparticle vesicular systems: A versatile tool for drug delivery. *J Chem Pharm Res* 2010; 2(2): 496-509.
38. Cegnar M, Kerč J: Nanozdravila. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 82-87.
39. Crane J M, Zamm LK: Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes. *Biophys J* 2004; 86: 175-183.
40. Garnier B, Tan S, Miraux S, Bled E, Brisson RA: Optimized synthesis of 100 nm diameter magnetoliposomes with high content of maghemite particles and high MRI effect. *Contrast Media Mol. Imaging* 2012; 7: 231-239.
41. Faria MR, Cruz MM, Gonsalves MC, Carvalho A, Feio G, Martins MBF: Synthesis and characterization of magnetoliposomes for MRI contrast enhancement. *Int J Pharm* 2013; 446: 183-190.
42. Faria MR: Development and characterization of magnetic liposomes for drug delivery applications. *Master's Degree* 2011.
43. Malvern Instruments Lts: *Zetasizer Nano Series User Manual*. 2004; (1)
44. McMullen T, Lewis R, McElhaney R: Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Curr Opin Colloid Interf Sci* 2004. 8: 459-468.

45. Tseng L, Liang H, Chung T, Huang Y, Liu D: Liposomes Incorporated with Cholesterol for Drug Release Triggered by Magnetic Field. *J Med Bio Eng* 2007. 27(1): 29-34.
46. Essa AE: Effect of formulation and processing variables on the particle size of sorbitan monopalmitate niosomes. *Asian J Pharm* 2010. 4: 227-233.
47. Meyer F, Smit B: Effect of cholesterol on the structure of phospholipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci* 2009. 106: 3654-3658.
48. Wagner A, Vorauer-Uhl K: Liposome Technology for Industrial Purposes. *J Drug Deliv* 2011; 1-9.
49. Santhosh BP, Velikonja A, Perutkova Š, Gongadze E, Kulkarni M, Genova J, Eleršič K, Iglič A, Kralj-Iglič V, Ulrih PN: Influence of nanoparticle- membrane electrostatic interactions on membrane fluidity and bending elasticity. *Chem Phys Lipids* 2014; 178: 52-62.
50. Floris A, Sinico C, Fadda AM, Ali F, Marogiu F, Scano A, Pilloni M, Angius F, Vazwuez-Vazquez C, Ennas G: Characterization and Cytotoxicity Studies on Liposome-Hydrophobic Magnetite Hybrid Colloids. *Coll interf sci* 2014. 1-34.
51. Franinović M: Uporaba in priprava liposomov. *Diplomska naloga* 2006.
52. Castile DJ, Taylor MGK, Buckon G: Tje influence of incubation temperature and surfactant concentration on the interaction between symyristoylphosphatidylcholine liposomes poloxamer surfactants. *Int J Pharm* 2001; 221: 187-209.
53. Spletni vir: [http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS\\_derivate\\_000000002344/06\\_7Chapter7.pdf?hosts=](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000002344/06_7Chapter7.pdf?hosts=) (citirano dne:15.9.2014).
54. Spletni vir: [http://www.basf.com.pe/sac/web/peru/es\\_ES/function/conversions:/publish/content/peru/nutrition\\_health/documentos/farmaceutica/excipientes/fichas\\_tecnicas/lutrolf68.pdf](http://www.basf.com.pe/sac/web/peru/es_ES/function/conversions:/publish/content/peru/nutrition_health/documentos/farmaceutica/excipientes/fichas_tecnicas/lutrolf68.pdf) (citirano dne :11.8.2014).
55. Reeve EL: Poloxamers: their chemistry and medical application. *Handbook of Biodegradable Polymers* 1997; 231-250.
56. Pradhan P, Giri J, Banerjee R, Bellare J, Bahadur D: Preparation and characterization of manganese ferrite- based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer. *J Magn Magn Mater* 2007; 1: 203-215.

57. Javornik IP: Modifikacija površine superparamagnetnih nanodelcev železovega oksida z metodo adsorpcije polielektrolitov. Diplomaska naloga 2014.
58. Alonso JM, Llacer C, Vila AO, Figueruelo JE, Molina FJ: Effect of the osmotic conditions on the value of ZP of DMPC multilamellar liposomes. *Colloids Surf* 1995; 11-14.
59. Sabin J, Pierto G, Higaldo-Alvarez R, Sarmiento F.: Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic stress. *Eur Phys J* 2006; 20: 401-408.
60. Gurtovenko A, Vattulainen I: Effect of NaCl and KCl on Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Lipid Membranes: Insight from Atomic-Scale Simulations for Understanding Salt-Induced Effects in the Plasma Membrane. *J Phys Biochem* 2008; 112: 1953-1962.