UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA GORŠAK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA GORŠAK

IZDELAVA IN VREDNOTENJE FORMULACIJE MAGNETOLIPOSOMOV S SKUPKI SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV ŽELEZOVEGA OKSIDA

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MAGNETOLIPOSOME FORMULATION WITH SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLE CLUSTERS

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek in somentorstvom dr. Slavka Kralja. Vzorce skupkov superparamagnetnih nanodelcev iNANOvative[™] so pripravili v podjetju Nanos Scientificae d.o.o. (Nanos SCI), TEM analizo magnetnih skupkov pa je izvedel dr. Slavko Kralj.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Petri Kocbek in somentorju dr. Slavku Kralju za vso usmerjanje pri delu, strokovne nasvete ter vodstvo pri izdelavi magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem Oddelka za sintezo materialov, na Inštitutu »Jožef Stefan«, ki so me tekom izdelave magistrske naloge spodbujali in mi bili vedno na voljo za vprašanja, pomoč ali pogovor.

Posebej bi se zahvalila svoji družini in prijateljem, ki so mi študij omogočili in mi stali ob strani tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Petre Kocbek in somentorja dr. Slavka Kralja

Tanja Goršak

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega

Članica komisije: izr. prof. Mojca Kerec Kos

Vsebina

POV	ZETEK			VI
ABST	RACT			VII
SEZN) KRAJŠ	ŚAV	VIII
1				1
Т	1 1	Linos	omi	- 1 -
	1.1	1 1	Metode izdelave linocomov	- 1 -
	1.	1.1		- 6 -
	1.2	Maa	netizem	7 -
	1.	2.1	Maghemitni magnetni nanodelci	10 -
	1.	2.2	Uporaba magnetnih nanodelcev v biomedicini	10 -
	1.	2.3	Magnetni skupki	11 -
	1.3	Mag	netoliposomi	11 -
	1.4	Izbra	ne metode vrednotenja struktur nanometrske velikosti	12 -
	1.	4.1	Fotonska korelacijska spektroskopija	12 -
	1.	4.2	Laserska Dopplerjeva anemometrija	13 -
	1.	4.3	Presevna elektronska mikroskopija	15 -
2	Ν	AMEN [DELA	16 -
3	N	ATERIA	LI IN METODE	17 -
	3.1	Mate	eriali	17 -
	3.2	Labo	ratorijska oprema	17 -
	3.3	Meto	nde	18 -
	3.	3.1	Funkcionalizacija magnetnih skupkov iNANOvative™	18 -
	3.	3.2	Izdelava liposomov in magnetoliposomov	19 -
	3.	3.3	Poenotenje velikosti liposomov in magnetoliposomov	21 -
	3.	3.4	Ločevanje magnetoliposomov v magnetnem polju	21 -
	3.4	Meto	ode vrednotenja magnetnih skupkov, liposomov in magnetoliposomov	28 -
	3.	4.1	Organoleptično vrednotenje	28 -
	3.	4.2	Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS)	28 -
	3.	4.3	Laserska Dopplerjeva anemometrija (LDA)	28 -
	3.	4.4	Presevna elektronska mikroskopija (TEM)	29 -
4	R	EZULTA	ΓΙ IN RAZPRAVA	29 -
	4.1	Funk	cionalizacija in vrednotenje magnetnih skupkov iNANO	29 -
	4.2	Vpliv	fosfatidilglicerola na lastnosti liposomov	31 -
	4.3	Loče	vanje magnetoliposomov v magnetnem polju	36 -
	4.4	Vpliv	koncentracije magnetnih skupkov na izdelavo magnetoliposomov	38 -
	4.5	Meta	oda čiščenja magnetoliposomov	40 -
	4.6	Vpliv	različno funkcionaliziranih magnetnih skupkov na izdelavo magnetoliposomov	42 -

	4.7	Vpliv deleža anionskega fosfolipida fosfatidilglicerola na vgrajevanje magnetnih skupkov iNA	NO-
	NH_2	v liposome	45 -
	4.8	Vpliv različno funkcionaliziranih magnetnih skupkov na izdelavo anionskih magnetoliposomov	/
	48 -		
	4.9	Vpliv fosfatidilglicerola na stabilnost magnetoliposomov v visokem gradientu magnetnega po	olja -
	49 -		
5	Sł	KLEP	51 -
6	Lr	TERATURA	53 -

POVZETEK

Namen našega raziskovalnega dela je bil z metodo tankih filmov izdelati in ovrednotiti formulacije magnetoliposomov. Liposomi so sferične strukture sestavljene iz enega ali več lipidnih dvoslojev med katere je ujet del disperznega medija. Če v liposome vgradimo magnetne nanodelce dobimo magnetoliposome. Prednost magnetoliposomov je možnost njihovega usmerjanja v gradientu zunanjega magnetnega polja, s čimer lahko dosežemo ciljano dostavo zdravilnih učinkovin. V liposome z različno sestavo smo vgradili funkcionalizirane skupke superparamagnetnih nanodelcev železovega oksida - magnetne skupke. Na komercialne magnetne skupke prevlečene s tanko plastjo amorfnega silicijevega dioksida (silike) smo kemijsko vezali molekule funkcionalnih trialkoksisilanov in tako na površino magnetnih skupkov uvedli amino ali karboksilne skupin. Vzorce smo vrednotili s fotonsko korelacijsko spektroskopijo in presevno elektronsko mikroskopijo ter z lasersko Dopplerjevo anemometrijo. Preučevali smo vpliv dodatka anionskega fosfolipida fosfatidilglicerola na izdelavo, velikost in stabilnost liposomov. Ugotovili smo, da večji kot je dodatek fosfatidilglicerola večji so liposomi in bolje koloidno stabilizirani. Pri izdelavi magnetoliposomov z magnetnimi skupki, ki so imeli na površini amino skupine, smo ugotovili, da je optimalna koncentracija magnetnih skupkov za izdelavo magnetoliposomov 1,25 mg/mL. Z ločevanjem v šibkem gradientu magnetnega polja in na podlagi razlik v izoelektrični točki med magnetnimi skupki in liposomi smo razvili učinkovito metodo za ločevanje magnetoliposomov od praznih liposomov in nevgrajenih magnetnih skupkov. Ugotovili smo, da se stabilnost magnetoliposomov izboljša, če le-ti vsebujejo 5 ali 10 % (m/m) fosfatidilglicerola, zato lahko ločevanje teh formulacij izvedemo v visokem gradientu magnetnega polja. Pri raziskovanju vpliva različnih funkcionalnih skupin na površini magnetnih skupkov na vgrajevanje v liposome smo ugotovili, da so najprimernejši magnetni skupki funkcionalizirani z amino skupinami, saj so se magnetni skupki s silanolnimi in karboksilnimi skupinami v liposome slabše vgrajevali. Zaključimo lahko, da smo uspešno izdelali formulacijo magnetoliposomov z vgrajenimi magnetnimi skupki z amino skupinami.

Ključne besede: superparamagnetni skupki nanodelcev železovega oksida, liposomi, magnetoliposomi, nanodostavni sistemi, metoda tankih filmov

ABSTRACT

The aim of this research was the preparation of magnetoliposomes by thin film method. Liposomes are spherical structures having one or more lipid bilayers, which entrap some dispersion medium. If magnetic nanoparticles are incorporated into the liposomes, magnetoliposomes are formed. The advantage of magnetoliposomes is their ability to be guided in a gradient of external magnetic field, which enables targeted drug delivery. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle clusters i.e. magnetic clusters, with various surface functional groups were incorporated in liposomes with different lipid composition. Functionalized trialkoxysilanes were chemically bound to the surface of commercial magnetic clusters coated with a thin layer of amorphous silicon dioxide (silica) to produce amino or carboxyl surface groups. Characterization of magnetic cluster was carried out by photon correlation spectroscopy, transmission electron microscopy and laser Doppler anemometry. The effect of anionic phospholipid phosphatidylglycerol on preparation, size and stability of liposomes was studied. The size and stability of liposomes increased with increasing amount of phosphatidylglycerol. Preparation of magnetoliposomes with magnetic clusters surface modified with amino groups revealed, that the most appropriate concentration of magnetic clusters for magnetoliposome formation is 1.25 mg/mL. Separation in a weak magnetic field gradient and exploitation of the difference in isoelectric points of magnetic clusters and liposomes enabled development of a method for separation of magnetoliposomes from empty liposomes and free magnetic clusters. It was found that 5 or 10 % (w/w) of phosphatidylglycerol in liposomes increases their stability and enables separation of these formulations in high magnetic field gradient. The incorporation of magnetic clusters with different surface groups in magnetoliposomes showed that the most appropriate for efficient production of magnetoliposomes are magnetic clusters surface modified with amino groups. The incorporation of magnetic clusters with sylanol or carboxyl surface groups in magnetoliposomes was very poor. To sum up, the formulation of magnetoliposomes with magnetic clusters surface modified with amino groups has been prepared successfully.

Keywords: superparamagnetic iron oxide nanoparticle clusters, liposomes, magnetoliposomes, nanodelivery system, thin film method

SEZNAM OKRAJŠAV

FDA – (ang. Food and Drug Administration)

 ΔH – gradient magnetnega polja

iNANO – komercialni skupki superparamagnetnih nanodelcev železovega oksida (magnetni skupki) iNANOvative[™]

LDA – laserska Dopplerjeva anemometrija (ang. laser Doppler anemometry)

ML – magnetoliposomi

MRI – magnetno resonančno slikanje (ang. magnetic resonance imaging)

PC – fosfatidilholin (ang. *phosphatidylcholine*)

PCS – fotonska korelacijska spektroskopija (ang. photon correlation spectroscopy)

PG – fosfatidilglicerol (ang. phosphatidylglicerol)

PDI – polidisperzni indeks

SPIONi – superparamagnetni nanodelci železovega oksida (ang. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*)

TEM – presevna elektronska mikroskopija (ang. transmission electron microscopy)

ZU - zdravilna učinkovina

1 UVOD

Vsako leto se pojavljajo nove tehnologije za izdelavo dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin (ZU), ki izboljšujejo dostavo in sproščanje učinkovin na želenem mestu v organizmu. Idealen dostavni sistem naj bi bil učinkovit in za organizem »neopazen«; torej mora dostaviti ZU na želeno mesto, pri čemer ga bolnikov imunski sistem ne sme prehitro zaznati in izločiti iz sistemskega obtoka. Poleg tega mora biti dostavni sistem biokompatibilen; zaželeno pa je, da je tudi biorazgradljiv. Primer nanodostavnega sistema z velikim potencialom za dostavo ZU in z naštetimi lastnostmi so liposomi.

1.1 Liposomi

Liposomi so sferične strukture sestavljene iz enega ali več lipidnih dvoslojev med katere je ujet del disperznega medija v katerem se le-ti nahajajo (slika 1 (a.)). Lipidni dvosloj sestavljajo amfifilne molekule; to so molekule, ki imajo hidrofilni del – polarno glavo in hidrofobni del – nepolaren rep (slika 1 (a.)). Velikost liposomov se giblje med 20 nm in nekaj μ m pri čemer so le-ti lahko eno ali več slojni. Debelina fosfolipidnega dvosloja je okoli 4 nm (1).



Slika 1: (a.) Shema zgradbe liposoma in (b.) kemijska struktura fosfatidilholina (prirejeno po viru (2)).

Najpomembnejši gradniki liposomov so fosfolipidi. Fosfolipide običajno najdemo v celičnih membranah, pridobivamo pa jih iz različnih naravnih virov (npr. soja, jajčni rumenjak). Sestavljeni so iz dveh maščobnih kislin, ki sta vezani na alkohol, ki je običajno glicerol (glicerofosfolipidi). Na tretjem mestu je glicerol zaestren s fosforjevo kislino na katero je vezan vodik, etanolamin, holin, glicerol, serin ali inozitol (3).

Primeri fosfolipidov so:

• Nevtralni fosfolipidi npr. fosfatidilholin (lecitin), fosfatidiletanolamin in

• Negativno nabiti fosfolipidi npr. fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, **fosfatidilglicerol**. Fosfatidilholin (PC) je najbolj pogost fosfolipid, ki ga najdemo pri živalih in rastlinah, in je najpomembnejši gradnik njihovih celičnih membran. Njegov celokupen naboj je nevtralen oz. je v obliki iona dvojčka (ang. *zwitterion*) pri vseh fizioloških pH-jih. Maščobne kisline zaestrene v PC naravnega izvora so v približno polovici primerov nasičene (na mestu *sn*-1), medtem ko je druga polovica maščobnih kislin nenasičena (na mestu *sn*-2) (najpogosteje je zaestrena oleinska kislina). Na mestu *sn*-3 je glicerol zaestren s fosfatno skupino ta pa s holinom (slika 1 (b.)) Relativno poceni vir PC je soja, vendar so molekule PC sojinega izvora manj nasičene od molekul PC, ki jih pridobivamo iz kokošjega jajčnega rumenjaka (1, 4).

Za uravnavanje fluidnosti fosfolipidnih dvoslojev se pri izdelavi liposomov pogosto dodaja holesterol.



Slika 2: Kemijska zgradba molekule holesterola.

Holesterol (slika 2) sestavlja planaren steroidni skelet - 4 sklenjeni obroči (trije šestčlenski in en petčlenski obroč), -OH skupino na mestu C3 (kar daje molekuli amfifilen značaj), metilni skupini na mestih C18 in C19 ter izooktilna stranska veriga na mestu C17. Holesterol se v fosfolipidnih dvoslojih umesti tako, da je s polarno -OH skupino obrnjen proti vodni fazi, s hidrofobnim steroidnim skeletom pa je »sidran« med verige membranskih fosfolipidov (1, 5). Prisotnost holesterola poveča stabilnost fosfolipidnega dvosloja ter zmanjša mobilnost molekul znotraj dvosloja, s čimer zmanjša njegovo permeabilnost in tako vpliva na fazna stanja membran in prehode med njimi. Membrane so lahko v naslednjih stanjih: tekoča – neurejena faza in gelska – urejena faza. Prehod med tekočo fazo in gelsko fazo se zgodi pri temperaturi T_m (v literaturi se pojavlja tudi oznaka T_c). T_m je odvisna od dolžine verig maščobnih kislin, stopnje nasičenosti in narave polarnih glav v fosfolipidih. V tekoči – urejeni fazi interakcije holesterola z verigami maščobnih kislin povečajo urejenost in gostoto membrane, medtem ko se v gelski fazi verige maščobnih kislin raje povezujejo med seboj in prisotnost holesterola zmanjšuje urejenost lipidnega dvosloja, kar prikazuje slika 3. Zaradi interakcij holesterola s fosfolipidi, njegova prisotnost zavira fazne prehode fosfolipidnega dvosloja in ga s tem stabilizira. Pri vsebnosti holesterola nad 30 % (m/m) praktično ni več opaziti prehodov med gelsko in tekočo - neurejeno fazo, saj nastane tekoča – urejena faza, ki je stabilna v širšem temperaturnem območju (1).



Slika 3: Shematski prikaz stanj lipidnega dvosloja v vodnem mediju (prirejeno po viru (1)).

Fosfolipidi se lahko znotraj lipidnega dvosloja premikajo. Slika 4 prikazuje možne premike molekul fosfolipidov znotraj fosfolipidnega dvosloja: lateralni premiki so pogosti in se zgodijo nekajkrat na sekundo, medtem ko so »flip-flop« premiki redki (6).



Slika 4: Premiki molekul fosfolipidov znotraj membrane (prirejeno po viru (6)).

Poznamo različne vrste liposomov, ki jih lahko razdelimo na več načinov:

- Glede na slojnost ločimo liposome na enoslojne (ang. *unilamellar vesicles*) liposome ter na večslojne liposome (ang. *multilamellar vesicles*), ki so običajno večji od 0,5 µm. Glede na velikost se enoslojni liposomi delijo na majhne enoslojne liposome, z velikostjo med 20 in 100 nm (ang. *small unilamellar vesicles*), in na velike enoslojne liposome, ki so večji od 100 nm (ang. *large unilamellar vesicles*). Med večslojne liposome pa prištevamo tudi večvezikularne liposome z velikostjo nad 1 µm (ang. *multivesicular vesicles*), pri katerih je znotraj večjega lipidnega dvosloja ujetih več manjših liposomov.
- Glede na sestavo lahko ločimo poleg liposomov, ki so zgrajeni iz fosfolipidov, še niosome, ki so zgrajeni iz neionogenih površinsko aktivnih snovi; sfingosome, ki so zgrajeni iz sfingolipidov; etosome, ki imajo v jedru etanol, in virosome, ki posnemajo zgradbo virusov.
- Glede na namen/mesto uporabe pa ločimo dermosome, transferosome in genosome (1, 7).

1.1.1 Metode izdelave liposomov

Poznamo različne metode za izdelavo liposomov, ki jih delimo na:

- Metodo hidratacije lipidnega filma,
- Izdelavo liposomov iz mikroemulzij,
- Injiciranje raztopine fosfolipidov v vodno fazo,
- Izdelavo liposomov iz dvojne emulzije,
- Izdelavo liposomov z metodo reverzno fazne evaporacije (10)

Najbolj razširjena metoda za pripravo večslojnih liposomov je hidratacija lipidnega filma (slika 5). Pri tej metodi raztopimo zmes lipidov v topilu, da dobimo homogeno raztopino. Topilo je običajno kloroform ali mešanica kloroforma in metanola, lahko pa uporabimo tudi druga organska topila, v kolikor lahko v njih dosežemo homogeno raztopino uporabljenih lipidov. Iz pripravljene raztopine nato odparimo topilo, da dobimo tanek lipidni film. Pri manjših volumnih hlapnega topila lahko le-to odparimo z vpihavanjem inertnega plina, pri večjih volumnih pa za odparevanje uporabimo rotacijsko evaporacijo pri znižanem tlaku (rotavapiranje). Dobljen lipidni film nato hidratiramo s primerno količino hidratacijskega medija, ki je lahko voda, puferske raztopine, raztopine soli in neelektrolitov kot npr. sladkorne raztopine. Temperatura hidratacijskega medija mora biti nad temperaturo T_m in jo vzdržujemo ves čas hidratacije, pri čemer bučko z lipidnim filmom in medijem kontinuirano stresamo ali vrtimo. Med hidratacijo tvorijo lipidi različne strukture, ki so odvisne od njihove sestave in koncentracije (1, 8).



Slika 5: Shema priprave liposomov z metodo hidratacije lipidnega filma: (a.) Pripravljen tanek film lipidov prelijemo s hidratacijskim medijem in (b.) vzorec previdno stresamo. (c.) Med stresanjem lipidni film nabreka in zajame del hidratacijskega medija, tako da (d.) nastanejo liposomi.

Tako pripravljeni liposomi so običajno večslojni in zelo heterogenih velikosti, zaradi česar se v naslednjem koraku običajno poslužimo ene od metod zmanjševanja in poenotenja

velikosti liposomov. Najbolj pogosto uporabljeni metodi sta ekstruzija in soniciranje. **Ekstruzija** je metoda pri kateri vnesemo mehansko energijo za zmanjševanje velikosti liposomov. Disperzijo liposomov potisnemo (npr. pritisk z roko na injekcijsko brizgo) skozi pore znane velikosti, pri čemer se liposom deformira, »poči« ter tvori manjše vezikle običajno primerljive ali manjše od velikosti por v membrani. Postopek ekstrudiranja skozi membrano običajno ponovimo v več ciklih. Prednosti te metode so ponovljivost in možnost uporabe za občutljive, manj stabilne liposome. Slabost te metode pa so izgube vzorca ter dolgotrajna izvedba. Pri **soniciranju** vnesemo ultrazvočno energijo s katero povzročimo odpiranje večslojnih liposomov in nastanek manjših veziklov. Velikost in porazdelitev velikosti liposomov v disperziji po soniciranju sta odvisni od sestave liposomov, njihove koncentracije, volumna in temperature vzorca ter jakosti in časa soniciranja. Metoda je hitrejša od ekstrudiranja, vendar pa lahko povzroči nestabilnost vzorca zaradi velikega vnosa energije v sistem (segrevanje vzorca) (1, 8).

1.1.2 Uporaba liposomov

Sredi 60ih let prejšnjega stoletja je dr. Banghman s svojo skupino ugotovil, da delci, ki nastanejo pri hidrataciji tankih lipidnih filmov, ujamejo v svojo sredico del medija in s tem tvorijo delno permeabilne vezikle (1). To spoznanje je sprožilo intenzivno raziskovanje liposomov, ki je vodilo v njihovo široko uporabo: v tekstilni industriji kot dostavni sistem za pigmente, v agronomiji kot dostavni sistem za pesticide, v prehranski industriji za pripravo encimskih in vitaminskih dodatkov ter mnoge aplikacije v kozmetični industriji (9). Najbolj zanimiva iz našega vidika pa je uporaba liposomov v farmacevtsko – medicinske namene. Takšni primeri uporabe so: kemoterapija raka (npr. liposomi z doksorubicinom), genska terapija (npr. liposomi za zdravljenje cistične fibroze), liposomi kot nosilci za cepiva (npr. formulacija liposomov proti malariji), liposomi kot nosilci pri peroralni uporabi ZU (npr. liposomi z ampicilinom), liposomi za dermalno uporabo (npr. liposomi z amfotericinom), liposomi kot dostavi sistemi ZU za zdravljenje pljučnih bolezni, liposomi za zdravljenje bolezni, ki so posledica motenj shranjevanja železa, liposomi kot dostavni sistem v oftalmologiji (npr. liposomi z verteporfinom) (10). Tako široka uporaba liposomov je mogoča zaradi mnogih prednosti liposomov; kljub temu pa se moramo zavedati, da se z uporabo liposomov pojavijo tudi svojevrstni izzivi. Tako prednosti kot slabosti uporabe liposomov so navedene v preglednici I.

Preglednica I: Prednosti in slabosti liposomov (10).	
--	--

Prednosti liposomov	Slabosti liposomov
Liposomi izboljšajo delovanje in terapevtski indeks ZU (npr. aktinomicin D)	Kratka razpolovna doba v krvnem obtoku
Liposomi izboljšajo stabilnost vgrajenih ZU	Nestabilnost zaradi oksidacije ali hidrolize fosfolipidov
Liposomi so netoksični, fleksibilni, biokompatibilni, biorazgradljivi, neimunogeni in primerni za sistemsko in nesistemsko zdravljenje	Prezgodnje sproščanje vgrajenih ZU zaradi nestabilnosti liposomov
Liposomi zmanjšajo sistemsko toksičnost vgrajenih ZU (npr. amfotericin B, paklitaksel)	Visoka cena izdelave
Liposomi zmanjšajo izpostavljenost občutljivega tkiva toksičnim ZU	
Možnost vezave ligandov na površino liposomov, ki omogočajo aktivno ciljanje	

Eden od glavnih ciljev pri uporabi liposomov je doseči ciljano dostavo ZU na tarčno mesto v organizmu. Poseben primer liposomov, ki so namenjeni za ciljano dostavo ZU, so tudi magnetoliposomi (ML). To so liposomi, ki imajo v lipidnem dvosloju ali v jedru liposoma magnetne delce, ki omogočajo vodljivost ML v gradientu zunanjega magnetnega polja.

1.2 Magnetizem

Preden se lahko posvetimo lastnostim ML, moramo nekaj besed nameniti magnetizmu ter magnetnim materialom za uporabo v farmaciji.

V vsaki snovi, ki jo postavimo v zunanje magnetno polje, se pojavi magnetni dipolni moment, ki je odvisen od atomske sestave in kristalne strukture snovi.. Magnetni dipolni moment na enoto volumna imenujemo magnetizacija (M). Vsi materiali so do določene mere magnetni; njihov odziv v zunanjem magnetnem polju pa je odvisen od atomov, ki jih vsebujejo, atomske strukture in temperature.

Razvrstimo jih lahko glede na njihovo magnetno susceptibilnost $-\chi$,

Magnetizacijo – M, v materialu inducira magnetno polje – H (enačba 1). Večina materialov izkazuje zelo šibek magnetni odziv v prisotnosti zunanjega magnetnega polja in jim, zaradi majhne magnetne susceptibilnosti, v praksi pravimo nemagnetni materiali. Takšnim nemagnetnim materialom pravimo strokovno paramagnetni (zelo majhna pozitivna magnetna susceptibilnost) in diamagnetni (zelo majhna negativna magnetna susceptibilnost). Magnetni materiali izkazujejo urejeno stanje spinov in so magnetni tudi brez prisotnega zunanjega magnetnega polja. Takšnim materialom pravimo feromagnetni in ferimagnetni materiali. Predpona fero-/feri- se nanaša na naravo sklopitvenih interakcij elektronov atomov znotraj materiala. Orientacija spinov glede na »vrsto« magnetnega material je predstavljena v preglednici II. Zaradi interakcij med magnetnimi atomi v materialu se njihovi magnetni momenti uredijo, kar lahko privede do velikega magnetnega momenta materiala. Pri Curiejevi temperaturi (T_c) termična energija prevlada nad interakcijami, ki usmerjajo magnetne momente in material postane paramagneten (11,12, 13).

Feromagneten material $\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$	Pod T _c so spini urejeni paralelno.
Antiferomagneten material $\downarrow \uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow$	Pod T _c so spini urejeni antiparalelno.
Ferimagneten material	Pod T _c so spini urejeni antiparalelno, vendar se
$\uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow$	ne izničijo.
Paramagneten material	Spini so naključno orientirani. Takšna ureditev
$\downarrow \uparrow \uparrow \downarrow \downarrow \uparrow \downarrow \downarrow \uparrow \uparrow$	se pojavi pri vseh materialih nad T _C .

Preglednica II: Prikaz ureditve spinov v različnih materialih.

Pomemben pojav, ki se pojavlja pri magnetnih delcih nanometrske velikosti je **superparamagnetizem**. V superparamagnetnem stanju magnetni moment celotnega delca prosto rotira zaradi termičnih fluktuacij, medtem ko so posamezni magnetni momenti atomov med seboj urejeni. Superparamagnetizem je pojav, ko se feromagnetni oziroma

ferimagnetni materiali obnašajo kot paramagnetni v odsotnosti zunanjega magnetnega polja. Superparamagnetnim nanodelcem se njihova magnetizacija zelo hitro poveča že pri majhnih vrednostih zunanjega magnetnega polja in se po umiku zunanjega magnetnega polja povrne na vrednost nič ter se tako v odsotnosti zunanjega magnetnega polja obnašajo kot nemagnetni materiali (paramagnetizem). Zaradi visoke magnetizacije (super) in paramagnetnih oz. nemagnetnih lastnosti v odsotnosti zunanjega magnetnega polja so materiali dobili ime superparamagnetni. Superparamagnetizem se pojavlja pri fero-/ferimagnetnih nanodelcih pod določeno kritično velikostjo nanodelcev, ki znaša za železove okside približno 15-20 nm (11, 13, 14). Pomembna prednost superparamagnetnih materialov pred ostalimi magnetnimi materiali je v relativno enostavni pripravi koloidno stabilnih suspenzij, saj se superparamagnetni nanodelci magnetno ne aglomerirajo.

Magnetni materiali imajo v svoji sestavi lahko železo (γ -Fe₂O₃, Fe₃O₄), nikelj (NiO, NiFe₂O₄), kobalt (Co₃O₄, CoFe₂O₄) ali mangan (Mn₃O₄, MnO₂). Majhen nabor materialov in omejujoči dejavniki za uporabo v medicino (magnetna aglomeracija) so privedli do tega, da je danes veliko raziskav usmerjenih v proučevanje superparamagnetnih nanodelcev železovega oksida (SPIONov, ang. superparamagnetic iron oxide nanoparticles). SPIONi so edini superparamagnetni nanodelci, ki jih je **FDA** (ang. Food and Drug Administration) odobrila za uporabo v biomedicini kot kontrastno sredstvo pri slikanju z magnetno resonanco. Železo je za človeka pomemben element, kljub temu pa je na celični ravni lahko citotoksično zaradi tvorbe reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti z nesparjenimi elektronskimi pari, ki v telesu povzročajo oksidativni stres (Fentonova reakcija). Zaradi tega in zaradi izboljšane koloidne stabilnosti v kompleksnih bioloških medijih magnetne nanodelce za biomedicinske namene v večini primerov pripravljamo v obliki »jedrolupina« (ang. core-shell), pri čemer je jedro kristal železovega oksida (običajno maghemita $-\gamma$ -Fe₂O₃ ali magnetita - Fe₃O₄), »lupina« oz. prevleka, ki jo nanesemo na jedro pa je lahko organska snov (npr. površinsko aktivne snovi, polimeri) ali anorganski material (npr.: silika, ogljik, zlato ali kovinski oksidi). Takšna zaščita jedra ima številne prednosti: zaščiti magnetno jedro pred oksidacijo, zmanjša oz. prepreči delovanje privlačnih sil med delci (van der Waalsove sile, hidrofobne interakcije, magnetna aglomeracija pri fero-/feri magnetnih materialih), s čimer se omeji aglomeriranje nanodelcev. Izbira snovi, ki jo nanesemo na magnetno jedro, določa površinske lastnosti kot so hidrofilnost in naboj površine, s tem pa v veliki meri vpliva na biokompatibilnost magnetnih nanodelcev. Za uporabo v biomedicini magnetne delce pogosto pripravimo v obliki magnetnih tekočin.

Magnetna tekočina je stabilna koloidna suspenzija magnetnih nanodelcev (običajno γ -Fe₂O₃, Fe₃O₄) v nosilni tekočini. Delci so običajno veliki ~ 15 nm, kar je dovolj majhna velikost, da le-ti ostanejo dispergirani zaradi Brownovega gibanja oz. termičnih fluktuacij. Nanodelce lahko še dodatno stabiliziramo z nabitimi molekulami na njihovi površini (npr. nabite površinsko aktivne snovi), kar preprečuje aglomeriranje delcev in ohranja koloidno stabilnost magnetne tekočine tudi v prisotnosti močnega zunanjega magnetnega polja (15, 16, 17).

1.2.1 Maghemitni magnetni nanodelci

Maghemit je spinelni ferit, ki je ferimagneten (močno magneten) in ima kubično kristalno strukturo (18). Obstajajo številne metode priprave magnetnih nanodelcev maghemita: hidrotermalna sinteza, sol-gel sinteza, metoda z uporabo citratnega prekurzorja, mehansko mletje in sonokemijska sinteza. Najbolj pogosto uporabljena metoda je obarjanje (precipitacija). Pri obarjanju z dodajanjem reagenta pretvorimo dobro topen kation železa v slabo topno trdno snov. Maghemitne nanodelce običajno oborimo z dodajanjem baze k vodni raztopini Fe²⁺/Fe³⁺ ionov. Velikost nastalih delcev je v območju nekaj nanometrov do nekaj mikrometrov. Na velikost, morfologijo in strukturo delcev vplivajo reakcijski pogoji (15).

Maghemitne nanodelce pogosto prevlečejo s plastjo silike, ki je biokompatibilen anorganski material. Silika je kemijsko in mikrobiološko stabilna, ne nabreka in se ob spremembi pH vrednosti medija njena poroznost ne spreminja. Silika na površini nanodelcev izboljša hidrofilnost in koloidno stabilnost nanodelcev. Prisotnost silanolnih – OH skupin na njeni površini omogoča nadaljno funkcionalizacijo nanodelcev in pripravo dostavnih sistemov za pasivno in aktivno ciljanje specifičnih tarčnih tkiv v telesu (19, 20).

1.2.2 Uporaba magnetnih nanodelcev v biomedicini

Magnetne nanodelce v medicini uporabljamo v diagnostiki in terapiji.

- Diagnostika (npr. magnetno resonančno slikanje, MRI):
 - diagnoza rakavih obolenj (EndoremTM, Sienna+[®]),
- Terapija:
- magnetna hipertermija (NanoThermTM),
- zdravljenje anemij pri bolnikih s kronično boleznijo jeter (Feraheme®) (11, 21).

Velik potencial pa imajo magnetni nanodelci pri razvoju metod za ciljano dostavo ZU.

1.2.3 Magnetni skupki

Ena izmed prednosti uporabe magnetnih nanodelcev v medicini je možnost njihove magnetne »vodljivosti« do želenega mesta. Za takšno usmerjanje je potrebna močna magnetna sila – F_M , ki deluje na posamezen delec v gradientu magnetnega polja – ΔH . Magnetna sila je sorazmerna magnetizaciji – M in volumnu – V delca, kar prikazuje enačba 2.

Enačba 2: $F_M = \mu_0 M V \Delta H$

kjer je μ_0 – permeabilnost zraka in H – magnetno polje.

Velikost nanodelcev ima le majhen vpliv na magnetizacijo, saj je ta odvisna predvsem od sestave materiala. Velikost delcev ima velik vpliv na magnetno silo, saj magnetna sila narašča eksponentno, in sicer s tretjo potenco premera delca.

Za lažje usmerjanje magnetnih nanodelcev v telesu bi si torej želeli, da imajo le-ti večji volumen, kar pa je v nasprotju z zahtevo po ohranitvi superparamagnetnih lastnosti, saj nanodelci v velikosti nad 15-20 nm preidejo iz superparamagnetnega stanja v feri-/fero magnetno. Izziv so rešili z izdelavo kontroliranih skupkov superparamagnetnih nanodelcev, katerih velikost mora biti vsaj 50 nm, da so primerni za učinkovito manipulacijo z gradientom magnetnega polja. Takšni skupki so torej sestavljeni iz posameznih majhnih superparamagnetnih kristalov oz. nanodelcev pri čemer so ohranjene superparamagnetne lastnosti celotnega skupka, hkrati pa je povečan volumen delca. Takšne magnetne skupke je mogoče voditi v gradientu magnetnega polja in jih na ta način pripeljati in zadržati na želenem mestu v telesu (22, 23).

1.3 Magnetoliposomi

Prve magnetoliposome so pripravili že leta 1986 tako, da so dispergirali nanodelce magnetita v suspenzijo lipidov in tako izdelali liposome s povprečno velikostjo 1,54 μm (24, 25). Magnetoliposomi združujejo prednosti magnetnih nanodelcev (ciljana dostava ZU) in liposomov (vgrajevanje ZU). SPIONe lahko vgradimo v različne dele liposomov. Lahko uporabimo hidrofobne nanodelce (oplaščeni npr. z oleinsko kislino), ki se vgradijo v hidrofobni lipidni dvosloj. Na ta način ostane hidrofilna sredica liposoma prosta za vgrajevanje hidrofilnih ZU. Hidrofilni SPIONi (npr. SPIONi oplaščeni s siliko) se vgradijo

v notranjost liposoma, kjer je vodno okolje. Takšni magnetoliposomi so primerni predvsem za vgrajevanje amfifilnih in hidrofobnih ZU. Magnetoliposome lahko uporabimo v različne namene npr. za:

- Magnetno hipertermijo,
- Kontrastno sredstvo pri MRI,
- Ciljano dostavo ZU s protitumornim delovanjem,
- Bimodalno kontrastno sredstvo (npr. MRI in fluorescenčno detektiranje, če so v sloju silike na površini magnetnih skupkov vgrajene fluorescentne molekule), kar omogoča večjo občutljivost detekcije (21, 26).

Ena izmed najbolj zanimivih aplikacij ML je uporaba v teranostiki. Teranostik je napredni dostavno-diagnostični sistem za uporabo v medicini. Združuje terapevtsko in diagnostično komponento ter omogoča sočasno diagnostiko in zdravljenje (27). Tako lahko z MRI spremljamo razporeditev dostavnega sistema (ML) po telesu, z gradientom zunanjega magnetnega polja pa magnetoliposome skoncentriramo na želenem mestu ter nato izvedemo zdravljenje z magnetno hipertermijo ali s sproščanjem ZU na tarčnem mestu npr. z uporabo termolabilnih liposomov (24, 25).

1.4 Izbrane metode vrednotenja struktur nanometrske velikosti

1.4.1 Fotonska korelacijska spektroskopija

Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS) oz. dinamično sipanje svetlobe je pomembna metoda določanja hidrodinamske velikosti delcev v emulziji ali suspenziji, saj deluje v širokem območju velikosti (med 0,6 nm do 6 µm). Metoda meri velikost delcev na podlagi detekcije intenzitete fluktuacij laserske svetlobe, ki se siplje na koloidnih delcih. Delci so podvrženi Brownovemu gibanju, ki je definirano kot naključno gibanje delcev zaradi trkov delcev z molekulami disperznega medija. Ko delce osvetlimo z laserjem, se svetloba na koloidnih delcih siplje. Intenziteta sipane svetlobe, ki jo detektiramo, se spreminja glede na hitrost gibanja delcev v vzorcu; le-ta pa je odvisna od velikosti delcev. Majhni delci se gibljejo hitreje, večji pa počasneje. Odnos med velikostjo in hitrostjo Brownovega gibanja je definirana s Stokes-Einsteinovo enačbo (enačba *3*).

Enačba 3: $\boldsymbol{D}_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$

Kjer je D_h – hidrodinamski premer delca, D_t – translacijski difuzijski koeficient, k_B – Boltzmannova konstanta, T – absolutna temperatura in η – dinamična viskoznost.

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 (28, 29).

1.4.2 Laserska Dopplerjeva anemometrija

Vrednosti ζ -potenciala določamo z metodo laserske Dopplerjeve anemometrije (LDA) (ang. *laser Doppler anemometry*). LDA je uveljavljena metoda pri raziskavah toka tekočin oz. hitrosti gibanja delcev znotraj tekočine. Z laserjem posvetimo na delce v vzorcu, kar povzroči sipanje svetlobe na delcih v disperziji. Delci se gibljejo v električnem polju proti nasprotno nabiti elektrodi - elektroforezna mobilnost delcev, kar povzroči spremembo frekvence sipane svetlobe (Dopplerjev efekt), ki jo naprava izmeri. Sprememba frekvence sipane svetlobe je sorazmerna hitrosti delca (oz. njegovi elektroforezni mobilnosti). S tem podatkom lahko s Henry-jevo enačbo (enačba 4) izračunamo ζ -potencial delcev(30).

Enačba 4:
$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(K_a)}{3\eta}$$

Kjer je z – ζ -potencial, U_E – elektroforezna mobilnost, ε – dielektrična konstanta disperznega medija, η – viskoznost medija in $f(K_a)$ Henry-jeva funkcija (30).

 ζ -potencial je elektrokinetični potencial, ki določa stanje in velikost površinskega naboja na mejni strižni površini delca in tekočine, kot je prikazano na sliki 6. Shema prikazuje negativno nabit delec v tekočini. Notranji sloj tekočine od delcu imenujemo Sternov sloj, v tem delu so pozitivno nabiti ioni močno vezani na delec. Zunanji sloj imenujemo difuzni sloj, kjer so ioni manj močno vezani. Znotraj difuznega sloja obstaja meja znotraj katere delec in ioni, ki ga obdajajo, tvorijo stabilno enoto. Ko se delec premika zaradi Brownovih ali gravitacijskih sil, se ioni znotraj te meje premikajo skupaj z delcem (hidrodinamski premer delca). To mejo imenujemo tudi strižna plast ter potencial, ki obstaja na tej meji, ζ potencial (31).



Slika 6: Shema elektrostatskega dvosloja v okolici negativno nabitega delca (prirejeno po viru (31)).

Najbolj pomemben dejavnik, ki vpliva na ζ -potencial, je pH vrednost disperznega medija. Vrednost ζ -potenciala brez podane pH vrednosti pri kateri je bil določen je številka brez pomena. Npr. če imamo suspenzijo z delci, ki imajo negativen ζ -potencial in to suspenzijo naalkalimo, bodo delci lahko dobil še bolj negativen ζ -potencial. Lahko pa v suspenzijo dodamo kisel medij, tako bomo pri določenem pH medija nevtralizirali negativen naboj na delcih. Nadaljnje dodajanje kislega medija bo povzročilo pozitiven naboj na delcih. V tem primeru bi bil torej ζ -potenciala pri nizkih vrednostih pH pozitiven ter negativen pri visokih pH rednostih. pH vrednost pri kateri ζ -potencial doseže vrednost 0 se imenuje izoelektrična točka in ima v praksi pomembno vlogo, saj je v tej točki sistem najmanj koloidno stabilen (30). Primer spreminjanja ζ -potenciala v odvisnosti od pH vrednosti disperznega medija prikazuje slika 7.



Slika 7: Spreminjanje ζ-potenciala delcev v odvisnosti od pH vrednosti disperznega medija (prirejeno po viru (32)).

1.4.3 Presevna elektronska mikroskopija

Elektronska mikroskopija je najbolj pogosta in neposredna metoda za analizo nanodelcev. Presevna elektronska mikroskopija (TEM) je metoda, pri kateri elektronski snop preseva zelo tanek vzorec (do največ ~ 100 nm pri kristaliničnem materialu). Na vrhu mikroskopa je vir elektronov - elektronska puška (kovinski filament ali katoda), ki elektrone skozi konveksno magnetno lečo usmeri na vzorec. Leče so postavljene tako, da spremenijo zorni kot, pod katerim vidimo vzorec. Za lečo je vzorec, ki ga presevajo elektroni. Tik pod vzorcem je postavljen objektiv. Iz objektiva elektroni potujejo v projektorsko lečo, ki projicira sliko na fluorescenten zaslon, ki sveti na mestih, kjer ga zadevajo elektroni. Na zaslonu vidimo sliko elektronov prepuščenih skozi vzorec. Slika je močno povečana, saj so zaradi kratke valovne dolžine elektronov gorišča leč lahko krajša in s tem dosežemo veliko povečavo v primerjavi z optičnim mikroskopom. Zaslon, na katerega padejo elektroni je CCD detektor. Detektor pošlje sliko na zaslon računalnika. S TEM analizo lahko dobimo podatke o površini, morfologiji, kristalni strukturi in sestavi vzorca (33, 34).

2 NAMEN DELA

Cilj našega raziskovalnega dela je izdelati magnetoliposome z metodo tankega filma. Takšni magnetoliposomi so potencialno uporabni pri ciljani dostavi ZU ali kot teranostiki. Za izdelavo liposomov bomo uporabili fosfatidilholin, fosfatidilglicerol in holesterol. V liposome bomo vgradili magnetne skupke z različnimi funkcionalnimi skupinami na površini in tako pripravili magnetoliposome.

V prvem delu raziskovalnega dela bomo funkcionalizirali komercialno dostopne magnetne skupke in tako pripravili magnetne skupke, ki bodo imeli na površini amino skupine ali karboksilne skupine.

V drugem koraku raziskovalnega dela bomo preučili vpliv sestave liposomov (prisotnost fosfatidilglicerola) na njihovo velikost in stabilnost.

V tretjem delu raziskav bomo:

- Preučili vpliv koncentracije magnetnih skupkov na izdelavo magnetoliposomov.
- Postavili metodo ločevanja magnetoliposomov od praznih liposomov in nevgrajenih magnetnih skupkov. Ločevanje bomo izvedli v gradientu zunanjega magnetnega polja.
- Preučili vpliv funkcionalnih skupin na površini magnetnih skupkov na izdelavo magnetoliposomov.
- Raziskali, ali prisotnost fosfatidilglicerola v lipidnem dvosloju vpliva na izdelavo magnetoliposomov z različno funkcionaliziranimi magnetnimi skupki (na njihovo velikost in stabilnost).

Liposomom in magnetoliposomom bomo z metodama PCS izmerili povprečno velikost in polidisperznost ter z LDA metodo njihov ζ -potencial. Magnetne skupke bomo analizirali tudi s TEM. Vzorce liposomov, magnetoliposomov in magnetnih skupkov bomo vrednotili tudi organoleptično. Spremljali bomo barvo, izgled vzorca ter spremljali morebitni pojav agregacije in sedimentacije delcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

- (3-aminopropil)trietoksisilan, 97 % (Alfa Aesar)
- Etanol (96 %, Merck, Nemčija)
- Hidroksi(propiletilenoksil)propiltrietoksisilan, 97 % (Alfa Aesar)
- Holesterol (Lex d.o.o, Slovenija)
- Klorovodikova kislina (Sigma-Aldrich)
- Lipoid E PG: jajčni fosfatidilglicerol (Lipoid GmbH, Nemčija)
- Lipoid S 100: nehidrogeniran sojin fosfatidilholin (Lipoid GmbH, Nemčija)
- Lipoid S PC-3: hidrogeniran sojin fosfatidilholin (Lipoid GmbH, Nemčija)
- Magnetni skupki iNANOvative[™] podjetja Nanos Scientificae d.o.o. (Nanos SCI) (Ljubljana, Slovenija)
- Natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich)
- Polivinilpirolidon M.W. 40.000 (Alfa Aesar)
- Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija)
- Trietoksisililpropilmaleamska kislina, 97 % (Alfa Aesar)

3.2 Laboratorijska oprema

- Analitska tehtnica Mettler Toledo AG245 (Mettler toledo, Nemčija)
- Celica za merjenje ζ-potenciala (DTS1060, Malvern, Velika Britanija)
- Mehanske pipete 10-100, 100-1000 in 1000-5000 µL (Biohit, Helsinki, Finska)
- Mikroepruvete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Nastavki za pipete (Biohit, Helskinki, Finska)
- Neodimski permanentni magnet (N 42 NdFeB Block Magnet NiCuNi, Neotexx, Nemčija)
- Plastične centrifugirke z navojem in pokrovčkom (Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- Polistirenska kiveta (Sarstedt Numbrecht, Nemčija)
- Rotavapor (Rotavapor R-114, Büchi, Švica)
- TEM mikroskop (Jeol 2100, Japonska)
- Ultrazvočna sonda (Ultrasonic processor, Illinois, ZDA)

- Vibracijsko mešalo Vibramix10 Vortex (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Vodna kopel (B-721, Büchi, Švica)
- ZetaPALS (Brookhaver Instruments Corporation, New York, ZDA)
- Zetasiter Nano ZS (Malvern instruments, Malvern, Velika Britanija)

3.3 Metode

3.3.1 Funkcionalizacija magnetnih skupkov iNANOvativeTM

Kot izhoden material smo uporabljali magnetne skupke iNANOvativeTM (iNANO) podjetja Nanos Scientificae d.o.o. s koncentracijo 7 mg/mL. Le-ti imajo na površini silanolne -OH skupine. Površino delcev iNANO smo funkcionalizirali tako, da smo na površino delcev uvedli amino skupine (iNANO-NH₂) ali karboksilne skupine (iNANO-COOH). Reakcijo funkcionalizacije smo izvedli po naslednjem postopku: v 60 mL etanola smo raztopili 100 mg polivinilpirolidona ter dodali 100 µL hidroksi(propiletilenoksil)propiltrietoksisilan in 200 µL (3-aminopropil)trietoksisilan pri fukcionalizaciji z amino skupinami oz. 200 µL trietoksisilpropilmaleamske kisline pri funkcionalizaciji s karboksilnimi skupinami. Tako pripravljeni raztopini smo dodali 20 mL suspenzije delcev iNANO s koncentracijo 7 mg/mL ter reakcijske zmesi segreli na 80 °C. Reakcijo smo vodili 5 h pod refluksom, na kar smo suspenzijo ohladili do sobne temperature in magnetne delce posedli na permanentnem magnetu. Posedene delce smo dvakrat sprali z 20 mL prečiščene vode in jih nato dispergirali v 20 mL prečiščene vode. Suspenziji magnetnih skupkov iNANO-NH₂ smo pH uravnali na 4 ter določili končno koncentracijo disperzije 7,9 mg/mL. Suspenziji iNANO-COOH pa smo pH uravnali na 10 in določili končno koncentracijo suspenzije 7,6 mg/mL. Masno koncentracijo končne disperzije smo določili termogravimetrično tako, da smo odpipetirali znano količino vzorca, disperzijo posušili pri 80 °C in nato stehtali maso suhe snovi. Sheme kemijskih reakcij funkcionalizacije iNANO so prikazane na sliki 8. Učinkovitost funkcionalizacije smo preverili z meritvami ζ-potencialov delcev v suspenzij v pH območju od 3 do 10. Velikost magnetnih skupkov po funkcionalizaciji smo analizirali s PCS. Izhodne delce (iNANO) smo analizirali in ovrednotili še s TEM ter z analizo slik s programom Gatan Digital Micrograph določili povprečno velikost delcev in njihovo porazdelitev velikosti v vzorcu.



Slika 8: Shema kemijskih reakcij funkcionalizacije iNANO.

3.3.2 Izdelava liposomov in magnetoliposomov

Liposome in ML smo pripravili z metodo tankih filmov iz zmesi nehidrogeniranega (Lipoid S 100) in hidrogeniranega (Lipoid S PC-3) sojinega fosfatidilholina, holesterola ter fosfatidilglicerola (PG) (Lipoid E PG) (v primeru izdelave anionskih (negativno nabitih) liposomov).

Celotna masa zmesi lipidov je bila 125 mg. Le-ta je vedno vsebovala 15 % (m/m) holesterola oz. 18,75 mg, medtem ko smo sestavo fosfolipidov spreminjali. Delež PG je bil 0, 1, 5 ali 10 % (m/m); pri čemer smo obdržali masno razmerje med hidrogeniranim in nehidrogeniranim PC konstantno (10 : 90).

Pri izdelavi ML smo uporabili različno funkcionalizirane iNANO magnetne skupke ter spreminjali masno koncentracijo magnetnih skupkov v mediju za hidratiranje lipidnega filma; pri čemer nismo spreminjali volumna hidratacijskega medija (2,5 mL). Sestave vzorcev liposomov in ML so podane v preglednici III.

Ime vzorca	m (Lipoid S 100) [mg]	m (Lipoid S PC-3) [mg]	m (Lipoid E PG) [mg]	Magnetni skupki / masa koncentracija [mg/mL]
LIPO-1	95.6	10.6	X	X
anion-LIPO-9	84,4	9,4	12,5 (10 %)	X
anion-LIPO-10	90,1	10,0	6,25 (5 %)	Х
anion-LIPO-11	94,5	10,6	1,25 (1 %)	Х
LIPO-2-iNANO	95,6	10,6	X	iNANO / 0,125
LIPO-3/1- iNANO-NH ₂	95,6	10,6	Х	iNANO-NH ₂ /0,125
LIPO-3/2- iNANO-NH ₂	95,6	10,6	Х	iNANO-NH ₂ /0,125
LIPO-4-iNANO- COOH	95,6	10,6	Х	iNANO-COOH / 0,125
LIPO-5/1- iNANO-NH ₂	95,6	10,6	Х	iNANO-NH ₂ / 1,25
LIPO-5/2- iNANO-NH ₂	95,6	10,6	Х	iNANO-NH ₂ / 1,25
LIPO-6-iNANO- NH ₂	95,6	10,6	Х	iNANO-NH ₂ / 3,125
LIPO-7-iNANO	95,6	10,6	Х	iNANO / 1,25
LIPO-8-iNANO- COOH	95,6	10,6	Х	iNANO-COOH / 1,25
anion-LIPO-12- iNANO-NH ₂	84,4	9,4	12,5 (10 %)	iNANO-NH ₂ / 1,25
anion-LIPO- 12/2- iNANO- NH ₂	84,4	9,4	12,5 (10 %)	iNANO-NH ₂ / 1,25
anion-LIPO-13- iNANO-NH ₂	90,1	10,0	6,25 (5 %)	iNANO-NH ₂ /1,25
anion-LIPO-14- iNANO-NH ₂	94,5	10,6	1,25 (1 %)	iNANO-NH ₂ /1,25
anion-LIPO-15- iNANO	84,4	9,4	12,5	iNANO / 1,25
anion-LIPO-16- iNANO-COOH	84,4	9,4	12,5	iNANO-COOH / 1,25

Preglednica III: Sestave vzorcev liposomov in magnetoliposomov

Vzorca: LIPO-3/1-iNANO-NH₂ in LIPO-3/2-iNANO-NH₂, sta po sestavi enaka, razlike med njima se pojavijo pri čiščenju ML. Enako velja za vzorca: LIPO-5/1-iNANO-NH₂ in LIPO-5/2-iNANO-NH₂ ter vzorca: anion-LIPO-12-iNANO-NH₂ in anion-LIPO-12/2-iNANO-NH₂.

V stekleno 100 mL bučko z okroglim dnom smo natehtali Lipoid S 100, Lipoid S PC-3 in holesterol ter dodali 5 mL etanola. Kadar smo izdelovali anionske liposome (formulacije s predpono anion) smo dodali še ustrezno količino etanolne raztopine PG. Zmes smo stresali na vodni kopeli pri 40 °C tako dolgo, da so se lipidi popolnoma raztopili. Raztopino smo pustili stati pri sobni temperaturi najmanj 1 h ter največ 1 dan, nato smo odparili etanol z rotacijsko evaporacijo (rotavaporjem) pri podtlaku 160 mbar, temperaturi 40 °C ter hitrosti rotacije ~ 120 obratov/min. Po končanem izhlapevanju etanola je na steni bučke nastal tanek homogen lipidni film.

Medij za hidratiranje lipidnega filma smo pripravili tako, da smo izhodno disperzijo magnetnih skupkov najprej mehansko premešali z vorteksiranjem in nato z redčenjem pripravili medij z ustrezno koncentracijo magnetnih skupkov. Ločeno smo na vodni kopeli (40 °C) segreli bučko z vnaprej pripravljenim lipidnim filmom in medij za hidratiranje (suspenzijo magnetnih skupkov oz. prečiščeno vodo), nato pa smo medij prelili v bučko. Lipidni film smo z ročnim stresanjem hidratirali z 2,5 mL vode oz. vodne disperzije magnetnih skupkov pri 40 °C. Ko se je ves film s stene bučke dispergiral v mediju, smo disperzijo pustili v vodni kopeli še 30 min pri 40 °C. Tako so spontano nastali večslojni liposomi.

3.3.3 Poenotenje velikosti liposomov in magnetoliposomov

2,5 mL disperzije (magneto)liposomov smo v plastični centrifugirki neprekinjeno sonicirali z ultrazvočno sondo (amplituda 30 %) 10 min pri čemer smo vzorec hladili na ledeni kopeli. Temperatura vzorca po zaključenem soniciranju je bila med 40 in 45 °C.

Do te stopnje so bile vse formulacije (navedene v preglednici III) pripravljene po opisanem postopku. Formulacije liposomov, brez vključenih magnetnih skupkov (LIPO-1, anion-LIPO-11, anion-LIPO-10, anion-LIPO-9), smo na tej stopnji ovrednotili z meritvami velikosti s PCS in z meritvami ζ -potenciala. Formulacije ML z vključenimi magnetnimi skupki pa smo čistili po naslednjih postopkih.

3.3.4 Ločevanje magnetoliposomov v magnetnem polju

Po soniciranju smo želeli ločiti ML od magnetnih skupkov, ki se niso vgradili v notranjost liposomov in praznih liposomov.

Prvi poskus ločevanja smo izvedli tako, da smo sonicirane vzorce s sestavo LIPO-2iNANO, LIPO-3/1-iNANO-NH₂ in LIPO-4-iNANO-COOH (koncentracija magnetnih skupkov 0,125 mg/mL) postavili neposredno na magnet za 90 min, pri čemer se je na magnet posedla večina magnetnega materiala, supernatant pa smo previdno odpipetirali. Supernatant je ostal rahlo rjavo obarvan (rjav sij na svetlobi). Posedene magnetne delce (magnetni skupki vključno z magnetoliposomi) smo redispergirali v 2 mL svežega medija (prečiščene vode). Tako pripravljene suspenzije smo čez noč pustili stati pri sobni temperaturi (oddaljeno od magneta). V vseh treh proučevanih vzorcih se je pojavila sedimentacija delcev. Sediment je bil svetlo rjave barve in odziven na magnet. Supernatant je bil prav tako obarvan rjavo. Previdno smo odpipetirali supernatant. Najbolj obarvan supernatant je bil pri vzorcu LIPO-2-iNANO in najmanj pri LIPO-3/1-iNANO-NH₂. Sedimente smo redispergirali v 0,5 mL prečiščene vode ter ponovno postavili na magnet. Že po 15 min se je pri vseh treh vzorcih posedel ves magnetni material, medtem ko so bili supernatanti (po 15 min) izrazito belo obarvani. S PCS smo izmerili velikosti delcev v vzorcih: po soniciranju, supernatant redispergiranega sedimenta, ki je čez noč ostal stabilen.



Slika 9: Shema ločevanja magnetnih delcev v magnetnem polju.

V naslednjem koraku smo ločevanje ML od nevgrajenih magnetnih skupkov in praznih liposomov izvedli tako, da smo pH disperznega medija uravnali na pH vrednost izoelektrične točke uporabljenih iNANO magnetnih skupkov ter nato disperzijo postavili nad magnet na razdaljo 3,2 cm kjer je majhen gradient magnetnega polja (jakost magnetnega polja ~ 40 mT) za 70 min (slika 9).

Čas posedanja smo določili s poskusom v katerem smo pripravili suspenzije iNANO, iNANO-NH₂ in iNANO-COOH s koncentracijo 0,125 mg/mL (oz. 0,312 mg magnetih skupkov v 2,5 mL prečiščene vode) in suspenzijam uravnali pH vrednost disperznega medija na pH izoelektrične točke posameznih magnetnih skupkov. pH smo uravnavali z 0,01 M raztopino NaOH ali HCl. Tako pripravljene suspenzije smo v 5 mL viali postavili nad magnet na razdaljo 3,2 cm ter določili čas v katerem so se posedli vsi magnetni delci tj. 70 min. Graf, ki predstavlja spreminjanje ζ -potenciala uporabljenih magnetnih skupkov v odvisnosti od pH vrednosti disperznega medija je prikazan med rezultati na sliki 13.

Kot model za razvoj metode ločevanja ML od nevgrajenih magnetnih skupkov in praznih liposomov smo uporabili suspenzijo ML pripravljenih z magnetnimi skupki iNANO-NH₂, saj so imeli le-ti izoelektrično točko najbolj oddaljeno od izoelektrične točke praznih liposomov. Z istimi magnetnimi skupki smo raziskali tudi vpliv koncentracije magnetnih skupkov na izdelavo magnetoliposomov ter učinkovitost ločevanja ML od nevgrajenih skupkov in praznih liposomov.

Suspenziji magnetoliposomov po soniciranju smo pH uravnali v vrednost izoelektrične točke iNANO-NH₂ (pH 7-8) ter disperzijo postavili nad magnet na razdaljo 3,2 cm za 70 min. Na dnu viale se je v tem času pojavila rjava usedlina, supernatant pa je bil rjavo-bele barve. Supernatant smo po 70 min odpipetirali, sediment pa redispergirali v 2 mL prečiščene vode zgolj za nadaljnjo karakterizacijo. Sklepali smo, da se v suspenziji supernatanta, nahajajo prazni liposomi in ML. Za ločitev ML od praznih liposomov smo supernatant (pri pH vrednosti 7-8) ponovno izpostavili magnetnemu polju na definirano razdaljo ter za potreben čas, da so se ML posedli, medtem ko so prazni liposomi ostali dispergirani v supernatantu, ki smo ga previdno odpipetirali. Čas in razdalja, ki sta bila potrebna za posedanje ML, sta bila odvisna od koncentracije magnetnih skupkov iNANO-NH₂ (vzorci: LIPO-3/2-iNANO-NH₂, LIPO-5/1-iNANO-NH₂, LIPO-6-iNANO-NH₂), ki smo jih uporabili za pripravo ML. Pri izbrani oddaljenosti od magneta smo posedene ML še 2-krat sprali s prečiščene vode. Spiranje smo izvedli tako, da smo posedene ML redispergirali v 2 mL prečiščene vode, nato smo vzorcu uravnali pH vrednost na pH 7–8 z 0,01 M NaOH in vzorec postavili nad magnet za čas v katerem so se posedli ML.

Oddaljenost od permanentnega magneta, ki smo jo uporabili pri ločevanju ML od praznih liposomov, in čas, ki je bil potreben za njihovo ločevanje, sta navedena v preglednici IV.

Preglednica IV: Oddaljenost vzorca od permanentnega magneta pri ločevanju ML od
nevgrajenih magnetnih skupkov ter praznih liposomov in čas, ki je bil potreben za njihovo
ločevanje.

Vpliv koncentracije magnetnih skupkov iNANO-NH ₂									
Ime vzorca	Masna koncentracija magnetnih skupkov iNANO-NH ₂ (mg/mL)	oddaljenost vzorca od magneta pri ločevanju ML od nevgrajenih magnetnih skupkov (cm)	čas ločevanja (h:min)	oddaljenost od magneta pri ločevanju ML od praznih liposomov (cm)	čas ločevanja (h)	oddaljenost od magneta pri spiranju (cm)	čas ločevanja pri prvem in drugem spiranju (h)		
LIPO-3/2- iNANO-NH ₂	0,125	3,2	1:10	3,2	24	3,2	24		
LIPO-5/1-	1.25	25 2.2	1:10	3,2	49	2.0	Prvo spiranje: 96		
iNANO-NH ₂	2 1,25	H ₂ 1,25 5,2			48	3,2	Drugo spiranje: 48		
LIPO-6- iNANO-NH ₂	3,125	3,2	72	2	24	2	24		

Učinkovitost ločevanja ML od praznih liposomov in nevgrajenih magnetnih skupkov smo ocenili z meritvami PDI in povprečne velikosti ML ter z meritvami ζ -potenciala pri pH vrednostih 5–5,5 kjer so liposomi negativno nabiti, magnetni skupki iNANO-NH₂ pa močno pozitivno nabiti.

Glede na učinkovitost čiščenja ML ter okvirne količine izdelanih ML (ki smo jo ocenili glede na rjavo obarvanost disperzije ML) smo se odločili, da je najbolj primerna masna koncentracija magnetnih skupkov za izdelavo ML 1,25 mg/mL (3,125 mg v 2,5 mL hidratacijskega medija). To koncentracijo smo uporabili v vseh nadaljnjih poskusih.

Čiščenje ML smo želeli skrajšati, zato smo pri vzorcu LIPO-5/2-iNANO-NH₂, razvili bolj učinkovito metodo ločevanja ML od praznih liposomov. Formulaciji po soniciranju smo pH uravnali v vrednost izoelektrične točke uporabljenih magnetnih skupkov ter disperzijo postavili nad magnet na razdaljo 3,2 cm za 70 min. Na dnu viale se je v tem času pojavila rjava usedlina, supernatant pa je bil rjavo-bele barve. Sklepali smo, da se v supernatantu, nahajajo prazni liposomi in ML. Za ločitev ML od praznih liposomov smo pH supernatanta uravnali na vrednost 7-8, kjer so liposomi stabilni, ter ločevali in spirali ML v več frakcijah (slika 10), tako da smo vzorec približali permanentnemu magnetu in ga s tem izpostavili večjemu magnetnemu gradientu. Takšno ločevanje smo izvedli v dveh stopnjah na oddaljenosti 1,5 cm (~ 115 mT) in 1 cm (~ 160 mT) od magneta. Po prvi stopnji (1,5 cm od magneta) smo posedene ML ločili od supernatanta, katerega smo nato postavili bliže magnetu (v še večji gradient magnetnega polja tj. 1 cm od magneta), da so se posedli preostali ML. Po vsaki stopnji posedanja smo posedene ML dispergirali v 1 mL prečiščene vode in tako dobili dve frakciji, ki smo ju pred naslednjim korakom (naslednjim spiranjem) združili. Po tako razvitem postopku smo čistili še naslednje formulacije ML: anion-LIPO-12-iNANO-NH₂, anion-LIPO-13- iNANO-NH₂ in anion-LIPO-14- iNANO-NH₂, kjer smo ugotavljali vpliv dodatka PG (10, 5 ali 1 % (m/m)).



Slika 10: Ločevanje in spiranje ML v magnetnem polju.

Postopek ločevanja ML pri ostalih vzorcih je temeljil na postopku ločevanja vzorca LIPO-5/2-iNANO-NH₂, čeprav smo postopek ločevanja po potrebi prilagodili posameznemu poskusu kot je prikazano v preglednici V. Pri raziskovanju vpliva funkcionaliziranih magnetnih skupkov smo pri formulacijah LIPO-7-iNANO in LIPO-8-iNANO-COOH ločevanje prekinili po prvi stopnji magnetne separacije v šibkem gradientu magnetnega polja pri vrednosti izoelektrične točke posameznih magnetnih skupkov (iNANO v pH območju 4,2–4,7, iNANO-COOH pa v pH območju 4,5–5), zaradi zelo majhen količine ML. Pri formulacijah, ki so imele dodan PG (10 % (m/m)) in magnetne skupke iNANO (anion-LIPO-15-iNANO) ali magnetne skupke iNANO-COOH (anion-LIPO-16-NANO-COOH) smo ML ločevali od praznih liposomov v gradientu magnetnega polja na razdalji 1,5 cm od magneta daljši čas (1,5 h), da bi se izognili izgubam že tako majhne količine ML.

Pri raziskovanju vpliva dodatka PG na stabilnost formulacija ML smo pri vzorcu anion-LIPO-12/2-iNANO-NH₂, ki je vseboval 10 % (m/m) PG, ločili nevgrajene magnetne skupke iNANO-NH₂ v šibkem gradientu magnetnega polja (3,2 cm od magneta), pri nadaljnjem ločevanju praznih liposomov od ML pa smo vzorec izpostavili visokemu magnetnemu gradientu (neposredno ob magnetu).

Preglednica V: Oddaljenost vzorca od permanentnega magneta pri ločevanju ML od nevgrajenih magnetnih skupkov ter praznih liposomov in čas, ki je bil potreben za njihovo ločevanje pri koncentraciji magnetnih skupkov 1,25 mg/mL.

Ime vzorca		Oddaljenost vzorca od magneta pri ločevanju ML od nevgrajenih magnetnih skupkov (cm)	čas ločevanj a (h:min)	oddaljenost vzorca od magneta pri ločevanju ML od praznih liposomov (cm)	čas ločevanja (h)	oddaljenost vzorca od magneta pri spiranju (cm)	čas ločevanja pri spiranju (2X) (h)
	V	pliv različno fu	inkcionalizira	anih magnetnih	skupkov		
LIPO-5/2-	magnetni	3,2	1:10	1. fr: 1,5	1. fr: 0,5	1. fr:1,5	1. fr: 0,5
iNANO-NH ₂	iNANO-NH ₂			2. fr: 1	2. fr: 0,5	2. fr: 1	2. fr: 0,5
LIPO-7- iNANO	magnetni skupki iNANO	3,2	1:10	/	/	/	/
LIPO-8- iNANO- COOH	magnetni skupki iNANO- COOH	3,2	1:10	/	/	/	/
	Vŗ	oliv deleža anio	nskega fosfol	lipida (fosfatidi	ilglicerola)	1	1
anion-LIPO-	10 % (m/m) PG	3.2	1.10	1. fr: 1,5	1. fr: 0,5	1. fr:1,5	1. fr: 0,5
NH ₂		5,2	1.10	2. fr: 1	2. fr: 0,5	2. fr: 1	2. fr: 0,5
anion-LIPO- 12/2- iNANO-NH ₂	10 % (m/m) PG	3,2	1:10	0	0,5	0	1,5
anion-LIPO-	5 % (m/m)	3.2	1.10	1. fr: 1,5	1. fr: 0,5	1. fr:1,5	1. fr: 0,5
NH ₂	PG	5,2	1.10	2. fr: 1	2. fr: 0,5	2. fr: 1	2. fr: 0,5
anion-LIPO-	1 % (m/m)		1.10	1. fr: 1,5	1. fr: 0,5	1. fr:1,5	1. fr: 0,5
NH ₂	PG	3,2	1:10	2. fr: 1	2. fr: 0,5	2. fr: 1	2. fr: 0,5
Vpliv različno funkcionaliziranih magnetnih skupkov na vgrajevanje v anionske magnetoliposome							me
anion-LIPO- 15-iNANO	magnetni skupki iNANO	3,2	1:10	1,5	1,5	1,5	0,5
anion-LIPO- 16-NANO- COOH	magnetni skupki iNANO- COOH	3,2	1:10	1,5	1,5	1,5	0,5

Postopek ločevanja ML v magnetnem polju smo spremljali z opazovanjem organoleptičnih lastnosti, merjenjem povprečne velikosti delcev, PDI in ζ -potenciala v različnih stopnjah ločevanja in spiranja (analiza supernatanta in sedimenta tj. magnetnih delcev).

3.4 Metode vrednotenja magnetnih skupkov, liposomov in magnetoliposomov

3.4.1 Organoleptično vrednotenje

Vzorce smo organoleptično vrednotili pri vseh stopnjah izdelave ML ter opisali morebitne spremembe. Opazovali smo:

- osnovne disperzije magnetnih skupkov (potencialno sedimentiranje delcev),
- izgled/vonj tankega filma (prisotnost kristalov in morebitna prisotnost znatnih zaostankov topila),
- disperzijo ML pred in po soniciranju (barva, viskoznost, pojav agregacije in sedimentacije delcev) in
- vzorce pri ločevanju/spiranju v magnetnem polju (barva, pojav ločenih faz in sedimentacije delcev).

3.4.2 Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS)

Meritve povprečne hidrodinamske velikosti smo izvedli z Zetasizerjem Nano ZS. Vzorce smo merili nerazredčene oz. v primeru zelo koncentriranih vzorcev smo le-te pred meritvijo 10-20-krat razredčili. Disperzijo (~1 mL) smo s kapalko prenesli v polistirensko kiveto ter s PCS metodo izmerili povprečno velikost in PDI delcev pri naslednjih pogojih: temperatura 25 °C, viskoznost disperznega medija 0,8872 mPas, lomni količnik disperznega medija (RI) 1,330 in kot merjenja 173°.

3.4.3 Laserska Dopplerjeva anemometrija (LDA)

Z metodo LDA smo izmerili ζ-potencial delcev v disperziji tako, da smo vzorec (~1 mL) z injekcijsko brizgo prenesli v elektroforezno celico. Meritve smo izvedli pri pogojih: temperatura 25 °C, viskoznost disperznega medija 0,8872 mPas in lomni količnik disperznega medija (RI) 1,330.

3.4.4 Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

Pri raziskavah smo uporabili TEM (JEOL 2100), opremljen z analizatorjem karakterističnih rentgenskih žarkov (EDXS,Oxford Instruments). TEM analizo slik smo izvedli s programom Gatan Digital Micrograph ter tako določili povprečno velikost delcev in njihovo porazdelitev velikosti v vzorcu.

Vzorce za TEM analizo smo pripravili s sušenjem suspenzij na amorfni ogljikovi foliji nosilne bakrene mrežice.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Funkcionalizacija in vrednotenje magnetnih skupkov iNANO

Prvi korak raziskave vpliva različno funkcionaliziranih magnetnih skupkov iNANO na izdelavo magnetoliposomov je bila njihova priprava in vrednotenje. TEM slike magnetnih skupkov in meritve velikosti so pokazale, da so magnetni skupki sferične oblike tipa »jedro-lupina«. Magnetni skupki iNANO so obdani s plastjo amorfnega silicijevega dioksida (silike) debeline ~ 10 nm kar lahko vidimo na sliki 11. Povprečna velikost magnetnih skupkov iNANO določena iz analize TEM slik je ~ 96 nm, porazdelitev velikosti pa se giblje med 60 in 160 nm kar prikazuje slika 12. Povprečna hidrodinamska velikost magnetnih skupkov iNANO, ki smo jo izmerili s PCS metodo (preglednica VI), je ~161 nm. PDI vseh treh vzorcev je bil zelo nizek (< 0,1), kar pomeni, da so vzorci magnetnih skupkov zelo monodisperzni (homogena velikost delcev v vzorcih). Hidrodinamska premera magnetnih skupkov iNANO-NH₂ in iNANO-COOH sta bila za ~20 oz. 10 nm večja od hidrodinamske velikosti nefunkcionaliziranih magnetnih skupkov, kar nakazuje, da se na površini delcev nahajajo dodatne molekule. To so potrdile tudi meritve ζ-potenciala magnetnih skupkov v pH območju 2,5-10 (slika 13). Skupki iNANO in iNANO-COOH imajo izoelektrično točko v kislem pH območju (iNANO v pH območju 4,2–4,7, iNANO-COOH pa v pH območju 4,5–5), medtem ko imajo iNANO-NH₂ izoelektrično točko v nevtralnem pH območju (pH 7-7,5). Različno spreminjanje (potenciala funkcionaliziranih in nefunkcionaliziranih magnetnih skupkov v odvisnosti od pH vrednosti disperznega medija in razlike v pH vrednostih izoelektričnih točk magnetnih skupkov kažejo, da je bila funkcionalizacija površine magnetnih skupkov uspešna.



Slika 11: TEM slika magnetnih skupkov iNANO.



Slika 12: Porazdelitev velikosti magnetnih skupkov iNANO.

Ime	Velikost delcev (nm)	PDI
iNANO	161	0,041
iNANO-COOH	184	0,014
iNANO-NH ₂	171	0,070

Preglednica VI: Povprečna hidrodinamska velikost in polidisperzni indeks magnetnih skupkov.



Slika 13: ζ-potencial magnetnih skupkov v odvisnosti od pH vrednosti disperznega medija.

4.2 Vpliv fosfatidilglicerola na lastnosti liposomov

V prvi stopnji smo pripravili tri ponovitve izdelave liposomov s sestavo LIPO-1 v kateri ni bilo dodanega PG. Pri hidrataciji tankega lipidnega filma s prečiščeno vodo je nastala mlečno bela disperzija v kateri so bili s prostim očesom vidni kosmiči – delci, ki so se hitro posedli na dno bučke. Po soniciranju je bila disperzija mlečno belo obarvana. Tako pripravljenim disperzijam smo izmerili velikost delcev s PCS (preglednica VII) ter enemu izmed vzorcev odvisnost ζ -potenciala liposomov od pH vrednosti disperznega medija (slika 14). Povprečna velikost liposomov s sestavo LIPO-1 je bila (69 ± 3) nm in PDI ~ 0,4, zato lahko trdimo, da je bila porazdelitev velikosti delcev v vzorcu sorazmerno monodisperzna, kljub temu pa se je lahko v vzorcu nahajal manjši delež znatno večjih oz. manjših delcev.

V naslednjih stopnjah raziskav smo del PC nadomestili s PG. Delež le-tega je bil 10 %, 5 %, ali 1 % (m/m). Po hidrataciji lipidnega filma se je sestava formulacije anion-LIPO-9 z 10 % (m/m) deležem negativno nabitega fosfolipida zelo razlikovala od osnovne formulacije LIPO-1. Disperzija je bila zelo viskozna (skoraj gel), transparentna z rahlo rožnatim sijajem. Izgled vzorcev s sestavo LIPO-1 in anion-LIPO-9 je prikazan na sliki 15. Pri sestavi s 5 % (m/m) vsebnostjo PG (anion-LIPO-10) je bila razlika v izgledu prav tako izrazita, le viskoznost disperzije je bila manjša. Pri vzorcu z 1 % (m/m) PG (anion-LIPO-11) smo opazili le manjše razlike tj. malce manj obarvana, vendar vseeno mlečno bela disperzija. Po soniciranju sta tako formulacija s 5 % masnim deležem PG kot tista z 10 % masnim deležem PG postali manj viskozni, na oko primerljivi osnovni formulaciji LIPO-1, vendar brez bele obarvanosti disperzije. Vsem štirim sestavam smo izmerili tudi odvisnost ζ-potenciala od pH vrednosti disperznega medija (slika 14). Iz meritev velikosti lahko vidimo, da prisotnost PG vpliva na hidrodinamski premer liposomov (preglednica VII). Prisotnost 1 % (m/m) PG v sestavi liposomov je povzročila, da so bili pripravljeni liposomi skoraj polovico manjši od liposomov pripravljenih brez fosfatidilglicerola, medtem ko so bili liposomi z 10 % masnim deležem PG za skoraj 40 % večji. Ko smo masni delež PG zmanjšali iz 10 % na 5 %, se je tudi povprečni hidrodinamski premer liposomov zmanjšal za polovico; zmanjšanje masnega deleža PG na 1 % pa je povzročilo še dodatno zmanjšanje povprečne velikosti (za dodatnih 20 %).

Dodatek PG formulaciji je povzročil tudi spremembo ζ -potenciala liposomov (slika 14). V primeru 1 % (m/m) deleža PG je bila ta sprememba manjša in opazili smo predvsem premik izoelektrične točke k nižji pH vrednosti, in sicer iz pH ~ 4,9 na pH ~ 3,5. Opazili smo tudi nekoliko bolj negativen ζ -potencial liposomov v nevtralnem in alkalnem pH območju v primerjavi z liposomi pripravljenimi le iz PC. Pri dodatku 5 % oz. 10 % (m/m) PG je bila razlika večja, in sicer izoelektrična točka se je pomaknila k pH vrednosti okoli 3 in meritve so pokazale, da postane ζ -potencial liposomov močno negativen (med -50 mV in -80 mV) v območju pH vrednosti disperznega medija nad ~ 4.



Slika 14: Odvisnost ζ-potenciala liposomov z različno vsebnostjo fosfatidilglicerola od pH vrednosti disperznega medija.

Preglednica VII: Povprečna velikost in polidisperzni indeks liposomov z različnim deležem fosfatidilglicerola.

Ime vzorca	Masni delež fosfatidilglicerola (%)	d [nm]	PDI	
LIPO-1	/	67	0,390	
LIPO-1	/	69	0,335	
LIPO-1	/	72	0,410	
anion-LIPO-9	10	111	0,259	
anion-LIPO-10	5	56	0,445	
anion-LIPO-11	1	36	0,266	



Slika 15: Izgled formulacij z dodanim fosfatidilglicerolom (anion-LIPO-9, levo) in brez fosfatidilglicerola (LIPO-1, desno).

Možna razlog za razliko v lastnostih formulacij s sestavama LIPO-1 in anion-LIPO-9 bi lahko bil nastanek gelske prepletene faze - $L_{\beta}I$ (ang. *interdigitated gel phase*) pri vzorcu anion-LIPO-9. To je faza, ki jo lahko tvorijo predvsem nasičeni fosfolipidi. Slika 16 prikazuje razliko med neprepletajočim lipidnim dvoslojen in prepletajočim lipidnim dvoslojem (35).



Slika 16: Shema različne zgradbe lipidnega dvosloja: (a) neprepletajoča faza in (b) prepletajoča faza (prirejeno po viru (35)).

Kot lahko vidimo na sliki 16 (a) ima »običajen« lipidni dvosloj izrazito definiran hidrofoben sloj, polarne glave pa se tesno stikajo. V prepletajoči gelski fazi (slika 16 (b) je debelina fosfolipidnega dvosloja manjša, polarne glave so bolj oddaljene ena od druge, kar povzroči, da so hidrofobni repi bolj izpostavljeni vodnemu okolju. Gelska prepletajoča faza lahko nastane spontano ali pa je lahko vzbujena. Najbolj pogost način za vzbujanje gelske prepletajoče faze je dodajanje etanola. V neprepletajoči fazi se etanol preko vodikovih vezi s prostimi elektronskimi pari kisikovih atomov v glicerolu veže na polarne glave molekul fosfolipida, kar povzroči povečanje volumna polarne glave in s tem spremembe v položaju (naklonu) hidrofobnih repov. Na ta način nastanejo v hidrofobnem delu membrane praznine, ki so energetsko neugodne, kar vzpodbudi nastanek L_{β} I faze. Ob nastanku prepletajoče gelske faze se etanol veže na izpostavljene ogljikovodikove repe in s tem prepreči stik lipofilnih repov z vodno fazo. Anionski lipidi, kot je PG, imajo veliko afiniteto do tvorjenja L_{β} I faze, saj ta faza omogoča večjo oddaljenost med negativno nabitimi polarnimi glavami in s tem zmanjša odboj med njimi. Nastanek L_{β} I faze pa zavirajo nenasičene maščobne kisline v fosfolipidni strukturi ter dodatek holesterola, ki v neprepletajoči fazi poveča fluidnost lipidnega dvosloja (35, 36).

V naših sistemih smo imeli fosfolipida PC in PG, ki lahko tvorita $L_{\beta}I$ fazo. Uporabili smo zmes PC, ki ima v strukturi nasičene maščobne kisline, ki omogočajo nastanek $L_{\beta}I$ faze, in PC z nenasičenimi maščobnimi kislinami, ki nastanek $L_{\beta}I$ faze zavirajo. Nastanek $L_{\beta}I$ faze zavira tudi holesterol, ki smo ga prav tako dodali. Sklepamo, da je končna formulacija imela v sestavi tudi nekaj rezidualnega topila tj. etanola. V formulacijah smo imeli torej tako sestavine, ki vzpodbujajo nastanek gelske prepletene faze, in tiste, ki njen nastanek zavirajo. Predvidevamo, da je v formulacijah, ki ne vsebujejo PG, vpliv sestavin, ki zavirajo nastanek $L_{\beta}I$ faze prevladujoč in zaradi tega nastane po hidrataciji tankega lipidnega filma neprepletajoča lipidna faza, ki je gradnik večslojnih liposomov. Z dodatkom PG pa prevlada vpliv promotorjev $L_{\beta}I$ faze, predvsem zaradi močnega negativnega naboja polarnih glav (kar so potrdile tudi meritve ζ -potenciala), in tako je po hidrataciji lipidnega filma nastala prepletena gelska faza. Takšno domnevo potrjuje tudi dejstvo, da se z zmanjševanjem deleža PG v sestavi zmanjšuje viskoznost formulacije oz. pri 1 % (m/m) PG ni na oko opaznih razlik v viskoznosti v primerjavi s formulacijo brez PG, kar kaže, da verjetno ni prisotne $L_{6}I$ faze.

Delež PG v formulaciji vpliva na velikost nastalih liposomov. Domnevamo, da nastanek $L_{\beta}I$ faze pri 5 in 10 % masnem deležu PG v formulaciji zagotovi homogeno razporeditev PG na obeh straneh lipidnega dvosloja; takšna razporeditev pa se ohrani tudi po poenotenju velikosti liposomov s soniciranjem. Energija, ki jo vnesemo v vzorec z ultrazvočno sondo (dvig temperature vzorca), povzroči izhlapevanje rezidualnega etanola in s tem nastanek »običajnega« neprepletajočega lipidnega dvosloja. Negativen naboj polarnih glav PG pa povzroči, da so pripravljeni liposomi (z 10 % masnim deležem PG) večji zaradi odboja

polarnih glav, ki se pojavi znotraj liposoma. Pri 5 % masnem deležu PG pa je ta odboj manjši in so posledično tudi liposomi manjši.

Zanimivo je, da so bili liposomi s sestavo, ki je imela 1 % masni delež PG, približno za polovico manjši ob liposomov, ki v sestavi niso imeli PG. Ostale razlike med obema formulacijama niso bile tako izrazite, izgled formulacij pred in po poenotenju velikosti je bil zelo podoben, tudi krivulji spreminjanja ζ-potenciala s pH medija se nista bistveno razlikovali kot je bilo to v primeru formulacij s 5 oz. 10 % masnim deležem PG. Možna je razlaga, da je pri poenotenju velikosti s soniciranjem (vnos relativno velike energije) prišlo poleg zmanjšanja velikosti liposomov tudi do »flip-flop« premika PG, bolj natančno do premika pri katerem se negativno nabite glave PG postavijo na zunanjo stran membrane liposoma in s tem zmanjšajo velik odboj, ki bi se pojavil znotraj liposoma, s čimer se zmanjša povprečna velikost liposomov. Velikost liposomov pa se ne more zmanjšati pod neko kritično velikost, saj bi to povzročilo pretirano približevanje nabitih polarnih glav na zunanji strani lipidnega dvosloja. To je lahko tudi razlog, da se »flip-flop« premiki PG verjetno ne zgodijo pri formulacijah s 5 in 10 % masnim deležem PG, saj bi to na zunanjih površinah liposomov vodilo v pretirano približanje močno nabitih polarnih glav PG, zato le-ta ostane enakomerno razporejen na obeh straneh membrane liposoma.

V nadaljevanju smo v liposome vgradili magnetne skupke iNANO, iNANO-NH₂ in iNANO-COOH. Prve poskuse izdelave ML smo izvedli s formulacijami liposomov brez PG, saj smo želeli razviti postopek izdelave ML na sistemu, ki je manj kompleksen.

4.3 Ločevanje magnetoliposomov v magnetnem polju

Jakost magnetnega polja (tudi gradient magnetnega polja) je največja neposredno ob permanentnem magnetu ter pada z oddaljevanjem od magneta. Slika 17 prikazuje izmerjeno jakost magnetnega polja v odvisnosti od oddaljenosti od magneta, ki smo ga uporabljali za ločevanje ML.





Kot smo opisali v metodah smo prvi poskus ločevanja ML od praznih liposomov izvedli neposredno ob magnetu (jakost magnetnega polja ~ 300 mT) v visokem gradientu magnetnega polja ter izmerili velikosti delcev posameznih vzorcev (LIPO-2-iNANO, LIPO-3/1-iNANO-NH₂, LIPO-4-iNANO-COOH): soniciran vzorec, supernatant po 90 min ločevanja v magnetnem polju, redispergiran sediment (90 min) in supernatant redispergiranega sedimenta, ki je čez noč ostal stabilen (preglednica VIII).

ime vzorca	LIPO-2-iNANO		LIPO-3/1-iNANO- NH ₂		LIPO-4-iNANO- COOH	
	d _{av} [nm]	PDI	d _{av} [nm]	PDI	d _{av} [nm]	PDI
soniciran vzorec	75	0,428	66	0,386	69	0,345
supernatant (90 min)	58	0,366	53	0,326	64	0,394
redispergiran sediment (90 min)	316	0,578	622	0,827	167	0,447
supernatant redispergiranega sedimenta	188	0,321	137	0,297	230	0,536

Preglednica VIII: Povprečna velikost in polidisperzni indeks vzorcev pred in po ločevanju v močnem gradientu magnetnega polja.

Glede na meritev povprečne velikosti delcev v vzorcih po soniciranju lahko trdimo, da je bila v vseh treh vzorcih prisotna zmes praznih liposomov (sorazmerno majhne povprečne velikosti) ter ML in/ali nevgrajenih magnetnih skupkov. Izmerjeni hidrodinamski premer magnetnih skupkov je bil namreč večji od 150 nm, povprečne velikosti delcev v vzorcih po soniciranju pa so bile med 65 in 75 nm. Po ločevanju v magnetnem polju se je večina magnetnih delcev ločila iz supernatanta. Izmerjene povprečne velikosti delcev v supernatantih so bile manjše od povprečne velikosti delcev v izhodnih vzorcih zaradi česar lahko sklepamo, da so v supernatantih ostali predvsem prazni liposomi. Meritve velikosti delcev v vzorcih redispergiranih sedimentov po ločevanju v magnetnem polju kažejo, da so vzorci glede na velikost delcev zelo heterogeni, saj so izmerjeni PDI vzorcev visoki. Iz meritev ne moramo sklepati, ali so v vzorcih ML ali nevgrajeni magnetni skupki oz. zmes obeh. Ko smo postavili redispergirane sedimente delcev po spontanem posedanju ponovno v magnetno polje, je ves magnetni material hitro sedimentiral, supernatant pa je bil močno belo obarvan. Obstaja velika verjetnost, da je velik gradient magnetnega polja magnete skupke »potegnil« iz liposomov, v supernatantu pa so ostali prazni liposomi. To je razlog, da potrebujemo boljšo metodo ločevanja nevgrajenih magnetnih skupkov od ML, saj je gradient magnetnega polja tik ob magnetu prevelik in lahko »iztrga« magnetne skupke iz notranjosti liposomov. Prav tako po ločevanju praznih liposomov od ML nismo vedeli, ali so magnetni skupki vgrajeni v liposome oz. v kakšnem deležu so vgrajeni, saj se v tako velikem gradientu magnetnega polja posedejo vsi magnetni delci.

Zaradi opisanih težav smo se v naslednji stopnji odločili izkoristiti razlike v ζ -potencialu liposomov in magnetnih skupkov pri ločevanju nevgrajenih magnetnih skupkov od ML. Za izdelavo ML smo tako uporabili suspenzijo magnetnih skupkov iNANO-NH₂, saj imajo leti najbolj oddaljeno izoelektrično točko glede na liposome LIPO-1. Raziskali smo vpliv koncentracije magnetnih skupkov na izdelavo ML ter učinkovitost ločevanja ML od nevgrajenih skupkov in praznih liposomov.

4.4 Vpliv koncentracije magnetnih skupkov na izdelavo magnetoliposomov

Pri ločevanju ML od nevgrajenih magnetnih skupkov (formulacija LIPO-3/2-iNANO-NH₂ s koncentracijo magnetnih skupkov 0,125 mg/mL) se je med posedanjem v mediju s pH v izoelektrični točki magnetnih skupkov v šibkem magnetnem polju posedlo precej magnetnega materiala. Tudi supernatant je ostal belo-rjavo obarvan, kar kaže, da so bili v njem prisotni magnetni skupki, verjetno vgrajeni v liposome. Iz supernatanta smo z ločevanjem v šibkem gradientu magnetnega polja (jakost magnetnega polja 40 mT) nato izolirali in sprali ML. Končni disperziji smo uravnali pH na 5,1 pri katerem so liposomi negativno nabiti, magnetni skupki iNANO-NH₂ pa močno pozitivno nabiti. Na podlagi

rezultata meritve ζ -potenciala (-18,8 mV) in rjave obarvanosti disperzije lahko sklepamo, da so bili v disperziji prisotni ML. Z danim postopkom smo uspešno izolirali ML od nevgrajenih magnetnih skupkov in praznih liposomov, vendar je bil izkoristek glede na izgled vzorca zelo majhen (disperzija je bila le rahlo rjavo obarvana). Zaradi tega smo pri naslednjih dveh poskusih masno koncentracijo magnetnih skupkov iNANO-NH₂ v hidratacijskem mediju povečali iz koncentracija 0,125 mg/mL na 1,25 mg/mL, torej za 10krat (LIPO-5/1-iNANO-NH₂) in na 3,125 mg/mL, torej za 25-krat (LIPO-6-iNANO-NH₂).

Pri ločevanju vzorca LIPO-5/1-iNANO-NH₂, z 10-krat večjo koncentracijo magnetnih skupkov (1,25 mg/mL), smo v prvi stopnji opazili, da je bil supernatant izrazito rjavo obarvan, vendar pa se je nadaljnje ločevanje ML od praznih liposomov in spiranje izkazalo za zelo dolgotrajno (8 dni). Končna meritev ζ -potenciala (-2,8 mV) ter izrazito rjava obarvanost disperzije kažeta, da so bili v vzorcu prisotni ML in da lahko s povečanjem koncentracije magnetnih skupkov iNANO-NH₂ pri hidrataciji lipidnega filma povečamo izkoristek priprave ML. Težava pri povečanju koncentracije magnetnih skupkov pa je dolgotrajno ločevanje v magnetnem polju med katerim lahko pride tudi do mikrobiološke kontaminacije.

Povečanje koncentracije magnetnih skupkov za 25-krat, pri vzorcu LIPO-6-iNANO-NH₂ (3,125 mg/mL), se je izkazalo za neuspešno, predvsem zaradi težavnosti pri ločevanju ML v gradientu zunanjega magnetnega polja. V prvi stopnji nismo opazili posedanja magnetnih skupkov, zato smo vzorcu izmerili ζ-potencial (pH 5,2), ki je bil pozitiven, zaradi česar sklepamo, da je bil v vzorcu večji del magnetnih skupkov iNANO-NH₂, ki se niso posedli. Zato smo vzorec LIPO-6-iNANO-NH₂ pustili v magnetnem polju daljši čas in ga izpostavili večjemu gradientu magnetnega polja. Takšen način ločevanja se je izkazal za neuspešnega, saj je končna meritev pokazala ζ-potencial 16,1 mV pri pH 5, zaradi česar lahko sklepamo, da so bili v vzorcu predvsem nevgrajeni magnetni skupki iNANO-NH₂. Ne moramo pa z gotovostjo trditi, ali je bila separacija neuspešna ali smo z daljšo izpostavljenostjo večjemu gradientu magnetnega polja magnetne skupke »iztrgali« iz liposomov. V preglednici IX so navedene izmerjene velikosti delcev, PDI in njihov ζ-potencial.

Iz meritev velikosti vidimo, da s povečevanjem koncentracije magnetnih skupkov iNANO-NH₂ narašča povprečna velikost delcev v soniciranih vzorcih, kar je smiselno, saj smo v predhodnih poskusih določili velikost praznih liposomov ~ 69 nm. S povečevanjem koncentracije magnetnih skupkov, katerih velikost je 170 nm, se je povečal delež večjih delcev v vzorcu in s tem povprečna velikost delcev. Povprečna velikost spranih ML je bila večja od velikosti delcev v soniciranih vzorcih. Pri podrobnejšem pregledu grafov intenzitete distribucije PCS meritev spranih vzorcev LIPO-3/2-iNANO-NH2, LIPO-5/1-iNANO-NH2, LIPO-6-iNANO-NH2 smo opazili, da se je v vseh treh vzorcih pojavila aglomeracija delcev (velikost delcev ~5 μ m), kar je izrazito vplivalo na izmerjeno povprečno velikost delcev.

ime vzorca masna koncentacija iNANO-NH ₂	LIPO-3/2 NI (0,125r	z-iNANO- H2 ng/mL)	LIPO-5/1-iNANO- NH2 (1,25mg/mL)		LIPO-6-iNANO-NH2 (3,125 mg/mL)	
	d _{av} [nm]	PDI	d _{av} [nm]	PDI	d _{av} [nm]	PDI
soniciran vzorec	93	0,524	150	0,850	204	0,275
supernatant po 70 min	73	0,417	198	0,471	72	0,396
2x sprani ML	373	0,346	704	0,928	273	0,346
	pН	ζ- potencial	pН	ζ- potencial	pН	ζ- potencial
2x sprani ML	5,1	-18,8 mV	5,3	-2,8	5	16,1 mV

Preglednica IX: Vpliv koncentracije magnetnih skupkov na velikost, polidisperzni indeks in ζ-potencial magnetoliposomov.

Glede na uspešnost izdelave ML, ki jih dobimo s povečevanjem koncentracije iNANO-NH₂ magnetnih skupkov v hidratacijskem mediju, in uspešnosti ločevanja in čiščenja ML v šibkem gradientu magnetnega polja, se je kot najbolj primerna izkazala koncentracija magnetnih skupkov v hidratacijskem mediju **1,25 mg/mL**. Volumen hidratacijskega medija (2,5 mL) in maso lipidov (125 mg) smo ohranili nespremenjena. V naslednjem koraku smo želeli skrajšati čas ločevanja ML od praznih liposomov, da bi zmanjšali verjetnost potencialne mikrobiološke kontaminacije. Dolg čas ločevanja lahko vodi tudi v nestabilnost tj. zlivanje liposomov, čemur se prav tako želimo izogniti.

4.5 Metoda čiščenja magnetoliposomov

Pri vzorcu LIPO-5/2-iNANO-NH₂ smo ML ločili od nevgrajenih magnetnih skupkov tako, da smo prvo stopnjo ločevanja izvedli enako kot pri vzorcu LIPO-5/1-iNANO-NH₂ tj. v šibkem gradientu magnetnega polja in pH vrednosti medija uravnanega v izoelektrično točko magnetnih skupkov iNANO-NH₂, nato pa smo pri ločevanju praznih liposomov od ML in nadaljnjem spiranju vzorec izpostavili večjemu gradientu magnetnega polja, hkrati pa smo skrajšali čas izpostavljenosti vzorca magnetnemu polju (čiščenje in spiranje produkta v dveh frakcijah). Dvakrat spran produkt je bil izrazito rjavo obarvan.

LIPO-5/2-iNANO- NH ₂	Velikost delcev (nm)	PDI	komentar
Soniciran vzorec	136	0,291	pH 5,2 ζ-potencial: 5,9 mV
separacija; 3,2 cm/1,1 h redispergiran sediment	225	0,219	
separacija; 1. frakcija 1,5 cm/0,5 h	113	0,289	
separacija; 2. frakcija 1 cm/0,5 h	115	0,289	
separacija; 1 cm/0,5 h supernatant	73	0,368	
2x sprani ML	156	0,171	pH 5,01 ζ-potencial: -4,2 mV

Preglednica X: Povprečna velikost in polidisperzni indeks vzorcev pred in po ločevanju v gradientu magnetnega polja formulacije LIPO-5/2-iNANO-NH₂ pri optimiziranem čiščenju.

Iz rezultatov meritev velikosti delcev in ζ-potenciala (preglednica X) lahko vidimo, da je bila izolacija ML uspešna, saj je bil ζ-potencial delcev pri danem pH disperznega medija negativen. PDI je bil nizek, kar nakazuje, da je bil vzorec sorazmerno homogen. Iz povprečne velikosti delcev pa lahko vidimo, da delci v vzorcu niso bili v obliki večjih agregatov. Povprečna velikost delcev v supernatantu pri ločevanju praznih liposomov od ML je znašala 73 nm, supernatant pa je bil rahlo belo obarvan, zaradi česar sklepamo, da so bili v njem prisotni predvsem prazni liposomi. Z ločevanjem pri večjem gradientu magnetnega polja smo uspeli izvesti izolacijo ML v krajšem času (v enem dnevu) s čimer smo zmanjšali verjetnost potencialne mikrobiološke kontaminacije in zmanjšali možnost potencialnega zlivanja liposomov.

4.6 Vpliv različno funkcionaliziranih magnetnih skupkov na izdelavo magnetoliposomov

Metodo ločevanja ML od nevgrajenih magnetnih skupkov iNANO-NH₂ in praznih liposomov smo uporabili tudi za ločevanje ML, izdelanih z magnetnimi skupki iNANO in iNANO-COOH. Na ta način smo preverili vpliv različnih funkcionalnih skupin na površini magnetnih skupkov na vgrajevanje magnetnih skupkov v liposome. Po poenotenju velikosti delcev v formulacijah LIPO-7-iNANO in LIPO-8-iNANO-COOH smo uravnali pH medija na pH vrednost izoelektrične točke uporabljenih magnetnih skupkov in vzorec izpostavili šibkemu gradientu magnetnega polja. Tako so se posedli skoraj vsi magnetni skupki , ki se niso vgradili v liposome. Izgled vzorcev LIPO-7-iNANO in LIPO-8-iNANO-COOH po končanem ločevanju v šibkem gradientu magnetnega polja prikazuje slika 18.

ime vzorca	LIPO-7-	-iNANO	LIPO-8-iNANO- COOH		
	d _{av} [nm]	PDI	d _{av} [nm]	PDI	
soniciran vzorec	171	0,257	146	1	
supernatant po 70 min	63	0,395	71	0,280	
poseden vzorec po 70 min	403	0,472	635	0,343	

Preglednica XI: Vpliv funkcionaliziranih magnetnih skupkov na povprečno velikost delcev v vzorcih



Slika 18: Ločevanje nevgrajenih magnetnih skupkov iNANO in iNANO-COOH od ML in praznih liposomov.



Slika 19: Sediment (nevgrajeni magnetni skupki) in supernatant (ML in prazni liposomi) vzorcev LIPO-7-iNANO, LIPO-8-iNANO in LIPO-5/2-iNANO po 70 min ločevanja v magnetnem polju.

V primerjavi s supernatantom vzorca LIPO-5/2-iNANO-NH₂ v supernatantih vzorcev LIPO-7-iNANO na videz ni skoraj nič ML oz. v primeru LIPO-8-iNANO-COOH v supernatantu ni ML (slika 19). Iz meritev velikosti in PDI (preglednica XI) opazimo, da je pri vzorcih LIPO-7-iNANO in LIPO-8-iNANO-COOH prišlo do agregiranja magnetnih skupkov zaradi česar so se le-ti posedli, ko smo vzorec izpostavili šibkemu gradientu magnetnega polja.

Ena izmed razlag, ki bi lahko pojasnila majhen izkoristek izdelave ML pri formulacijah z magnetnimi skupki iNANO in iNANO-COOH, bi lahko temeljila na dejstvu, da smo pH vrednost formulacij premaknili v območje izoelektričnih točk magnetnih skupkov iNANO in iNANO-COOH (pH med 4 in 5). Ta vrednost je zelo blizu izoelektrični točki formulacije praznih liposomov (pH ~ 5). To pomeni, da imajo v tem območju vse sestavine formulacije po soniciranju (prazni liposomi, ML in nevgrajeni magnetni skupki) bistveno zmanjšano absolutno vrednost zeta potenciala, kar vodi v zmanjšan elektrostatski odboj med sestavinami formulacije in to posledično lahko vodi v šibko agregacijo. Takšni agregati imajo večji volumen (povprečna hidrodinamska velikost se poveča na 403 nm oz. 635 nm) in tako nanje deluje večja magnetna sila (le-ta narašča s tretjo potenco velikosti), zato se že v zmernih gradientih magnetnega polja iz formulacije izločijo vse magnetne sestavine (morebitni ML in nevgrajeni magnetni skupki). Za nadaljnjo izolacijo ML od nevgrajenih magnetnih skupkov v sedimentu po prvi magnetni separaciji predlagana metoda ločevanja, ki temelji na izkoriščanju razlik v izoelektričnih točkah, ni bila uspešna. Magnetni skupki (iNANO in iNANO-COOH) imajo namreč zelo podobne lastnosti površin kot ML, saj imajo podobno odvisnost ζ-potencialov od pH vrednosti disperznega medija v pretežnem območju pH v primerjavi s formulacijami ML, kar onemogoča njihovo učinkovito ločevanje.

Možna razlaga za preferenčno vgrajevanje magnetnih skupkov z amino skupinami na površini v primerjavi z vgrajevanjem magnetnih skupkov brez oz. s karboksilnimi funkcionalnimi skupinami je, da se polarne glave fosfolipidov PC nahajajo v obliki ionov dvojčkov. Glede na ζ -potencial praznih liposomov vidimo, da imajo le-ti in magnetni skupki iNANO in iNANO-COOH sorazmerno podobno krivuljo spreminjanja ζ -potenciala v odvisnosti od pH disperznega medija (izoelektrična točka med pH 4 in 5). To pa pomeni, da se ti magnetni skupki in liposomi med seboj odbijajo, medtem ko imajo magnetni skupki iNANO-NH₂ pri pH pri katerem smo hidratirali tanke lipidne filme (pH 5–5,5) pozitiven naboj (v nasprotju z negativno nabitimi liposomi) zaradi česar obstaja med njimi elektrostatski privlak, ki poveča možnost vgrajevanja magnetnih skupkov v liposome in s tem vpliva na nastanek ML.

Glede na domnevo, da se magnetni skupki iNANO-NH₂ preferenčno vgrajujejo v liposome, ki so nasprotno nabiti, smo v naslednjem koraku preverjali, ali se magnetni skupki iNANO-NH₂ bolje vgrajujejo v anionske liposome ter kakšen vpliv ima na vgrajevanje delež PG v liposomih.

4.7 Vpliv deleža anionskega fosfolipida fosfatidilglicerola na vgrajevanje magnetnih skupkov iNANO-NH₂ v liposome

Kot pri izdelavi praznih anionskih liposomov smo tudi pri izdelavi ML proučevali vpliv dodatka 1, 5 ali 10 % (m/m glede na maso lipidov) PG na vgrajevanje magnetnih skupkov iNANO-NH₂ v liposome. Opazili smo, da sta se formulaciji s 5% (anion-LIPO-13-iNANO-NH₂) in 10 % (LIPO-12- iNANO-NH₂) masnim deležem PG obnašali zelo podobno, medtem ko se je vzorec z 1 % PG (anion-LIPO-14- iNANO-NH₂) na ločevanje v gradientu zunanjega magnetnega polja odzival zelo nenavadno v primerjavi z vsemi ostalimi vzorci tako z dodatkom PG kot brez.

Iz formulacij anion-LIPO-12- iNANO-NH₂ (10 % (m/m) PG) in anion-LIPO-13iNANO-NH₂ (5 % (m/m) PG) smo ločili ML po enakem postopku kot v primeru formulacije LIPO-5/2-iNANO-NH₂ (brez PG). Vzorca anion-LIPO-12- iNANO-NH₂ in anion-LIPO-13- iNANO-NH₂ sta se od LIPO-5/2-iNANO-NH₂ razlikovala predvsem v bistrosti. Vzorec pripravljen brez dodatka PG je bil mlečno rjavo obarvan, medtem ko sta bila vzorca z dodatkom PG bistra in rjavo obarvana. Na sliki 20 lahko vidimo izgleda vzorcev LIPO-5/2-iNANO-NH₂ , ki je moten, in anion-LIPO-12- iNANO-NH₂ , ki je bister. Iz meritev velikosti delcev v vzorcih (preglednica XII) anion-LIPO-12- iNANO-NH₂ in anion-LIPO-13- iNANO-NH₂ vidimo, da smo uspešno izolirali ML, ki imajo izrazito negativen ζ -potencial pri pH ~ 5,5 in nizek PDI. Tako pripravljeni ML so homogene velikosti in koloidno stabilni.

Pri ločevanju v magnetnem polju pri pH vrednosti v izoelektrični točki uporabljenih magnetnih skupkov je ostal supernatant vzorca anion-LIPO-14-iNANO-NH₂ (1 % masni delež PG) zelo moten in rjavo obarvan (slika 21), posedla pa se je manjša količina magnetnih skupkov kot pri vzorcih s 5 in 10 % masnim deležem PG. Tudi PDI

supernatanta tega vzorca kaže, da je vzorec bolj heterogen glede na velikost dispergiranih delcev. Ko smo v naslednjih stopnjah ločevanja supernatant izpostavili večjemu gradientu magnetnega polja, je del dispergiranih delcev v vzorcu agregiral. V naslednjih korakih smo spirali le supernatant, ki je ostal stabilen. Meritev velikosti delcev spranih ML je pokazala, da se v vzorcu verjetno nahajajo večji agregati, saj je bila povprečna velikost delcev precej večja od vzorcev s 5 in 10 % (m/m) PG. Takšen sklep je potrdil tudi podrobnejši pregled intenzitetne porazdelitve velikosti delcev, kjer smo opazili, da so bili v vzorcu prisotni agregati delcev z velikostjo ~5 µm, kar je izrazito povečalo določeno povprečno velikost delcev v vzorcu.

Ob predpostavki, da naša domneva, da se pri 1 % masnem deležu PG negativno nabite glave PG postavijo na zunanjo stran lipidnega dvosloja liposoma drži, je možna naslednja razlaga za nenavadno posedanje delcev v gradientu zunanjega magnetnega polja pri pH izoelektrične točke magnetnih skupkov. Dodatek 1 % (m/m) PG je premajhen, da bi izrazito vplival na vgrajevanje magnetnih skupkov v liposome. Lahko pa liposomi z negativnim nabojem na površini stabilizirajo magnetne skupke iNANO-NH₂ z elektrostatsko vezavo liposomov na površine skupkov. Prazni liposomi so dovolj majhni (~35 nm), da se lahko elektrostatsko vežejo na površino večjega nasprotno nabitega magnetnega skupka, zato se tako stabilizirani magnetni skupki pri ločevanju v šibkem gradientu magnetnega polja ne posedejo, pri višjem gradientu magnetnega polja pa elektrostatska vezava liposomov na magnetne skupke ni dovolj učinkovita, zato se nevgrajeni magnetni skupki posedejo. Pri večjem deležu PG v formulaciji do takšne stabilizacije ne pride, saj so prazni liposomi večji (50-100 nm) in se ne morajo enakomerno vezati na površino magnetnih skupkov in s tem stabilizirati delcev.



Slika 20: Ločevanje vzorcev LIPO-5/2-iNANO-NH2 in anion-LIPO-12-iNANO-NH₂ v šibkem gradientu magnetnega polja.



Slika 21: Supernatant vzorca anion-LIPO-14- iNANO-NH₂ po ločevanju v šibkem gradientu magnetnega polja.

ime vzorca	anion-LIPO- NH ₂ (10	-12- iNANO- 0 % PG)	anion-LIPO-13- iNANO- NH ₂ (5 % PG)		anion-LIPO-14- iNANO- NH ₂ (1 % PG)	
	d _{av} [nm]	PDI	d _{av} [nm]	PDI	d _{av} [nm]	PDI
soniciran vzorec	176	0,156	173	0,201	156	0,295
supernatant po 70 min	92	0,392	125	0,265	142	0,553
2x sprani ML	147	0,119	159	0,154	338	0,299
	pH	ζ-potencial	pH	ζ-potencial	pH	ζ-potencial
2x sprani ML	5,6	-53,7	5,5	-45,8	5,1	-1

Preglednica XII: Vpliv deleža anionskega lipida fosfatidilglicerola na velikost, polidisperzni indeks in ζ-potencial delcev v različnih frakcijah formulacij ML.

4.8 Vpliv različno funkcionaliziranih magnetnih skupkov na izdelavo anionskih magnetoliposomov

Po uspešni izdelavi anionskih magnetoliposomov z vgrajevanjem magnetnih skupkov iNANO-NH₂ smo želeli preveriti, ali lahko pripravimo anionske ML tudi z vgrajevanjem magnetnih skupkov iNANO in iNANO-COOH. Postopek izdelave vzorcev anion-LIPO-15-iNANO in anion-LIPO-16-iNANO-COOH je bil enak kot pri vzorcu anion-LIPO-12iNANO-NH₂, le da smo ločevanje nevgrajenih magnetnih skupkov od ML izvedli pri pH medija, ki je bil enak pH vrednosti izoelektrične točke uporabljenih magnetnih skupkov. Pri obeh vzorcih se je v izoelektrični točki posedla večina nevgrajenih magnetnih skupkov, vendar pa sta supernatanta ostala rahlo rjavo obarvana kar lahko vidimo na sliki 22. Slika prikazuje tudi primerjavo s supernatantom vzorca anion-LIPO-12-iNANO-NH₂ po ločevanju v magnetnem polju pri pH medija, ki je bil enak pH izoelektrične točke magnetnih skupkov. Vzorec je precej bolj rjavo obarvan, kar kaže, da vsebuje več ML. Rezultati torej kažejo, da smo uspeli izdelati ML tudi z vgrajevanjem magnetnih skupkov iNANO in iNANO-COOH. Po spiranju je bila povprečna velikost le-teh 160 nm z nizkim PDI in visokim negativnim ζ-potencialom pri pH 5,6 oz. 5,8 (preglednica XIII). ML so bili homogene velikosti in koloidno stabilni, vendar jih je bilo na videz zelo malo v primerjavi z vzorcem anion-LIPO-12-iNANO-NH₂, ki je imel vgrajene magnetne skupke iNANO-NH₂.



Slika 22: Supernatanti vzorcev anion-LIPO-15-iNANO, anion-LIPO-16-iNANO-COOH in anion-LIPO-12-iNANO-NH₂ po ločevanju nevgrajenih magnetnih skupkov v šibkem gradientu magnetnega polja in mediju s pH izoelektrične točke magnetnih skupkov.

Preglednica XIII: Vpliv funkcionaliziranih magnetnih skupkov na velikost, polidisperzni indeks in ζ-potencial magnetoliposomov anion-LIPO-15-iNANO in anion-LIPO-16-iNANO-COOH.

ime vzorca	anion-LIPO-15- iNANO		anion-LIPO-16- iNANO-COOH		
	d _{av} [nm]	PDI	d _{av} [nm]	PDI	
soniciran vzorec	162	0,152	144	0,204	
supernatant po 70 min	54	0,448	66	0,344	
2x sprani ML	159	0,102	160	0,165	
	рН	ζ- potencial	рН	ζ- potencial	
2x sprani ML	5,8	-51	5,6	-46,6	

4.9 Vpliv fosfatidilglicerola na stabilnost magnetoliposomov v visokem gradientu magnetnega polja

ML, ki smo jih izdelali z 10 % masnim deležem PG (anion-LIPO-12/2- iNANO-NH₂), so imeli visok negativni ζ -potencial v mediju s pH vrednostjo nad 3, kar je formulacijo elektrostatsko stabiliziralo. Zanimalo nas je, ali je ta stabilizacija dovolj močna, da

prepreči, da bi magnetna sila »potegnila« magnetne skupke iz liposomov pri čiščenju v visokem gradientu magnetnega polja (jakost magnetnega polja 300 mT).

ML in prazne liposome, ki so ostali v supernatantu po prvi magnetni separaciji v šibkem gradientu magnetnega polja, smo nadalje ločevali v visokem gradientu magnetnega polja. Ugotovili smo, da je povprečna velikost ML 140 nm in PDI 0,037 ter ζ -potencial -31,9 mV pri pH vrednosti 5,6.

ML so bili stabilni tudi po dveh urah izpostavitve visokemu magnetnemu gradientu, saj so magnetni skupki iNANO-NH₂, glede na meritev ζ -potenciala pri pH vrednosti 5, ostali znotraj liposomov, posedene ML pa smo po spiranju lahko brez težav redispergirali.

5 SKLEP

V prvi stopnji raziskave smo uspešno izvedli funkcionalizacijo površine magnetnih skupkov iNANO ter tako pripravili magnetne skupke, ki so imeli na površini namesto silanolnih –OH skupin, amino ali karboksilne skupine.

Ugotovili smo, da dodatek anionskega fosfolipida PG pomembno vpliva na izdelavo, velikost in stabilnost izdelanih liposomov. Povprečna velikost liposomov brez dodatka PG je bila 69 nm. Dodatek majhne količine PG (1 % (m/m)) je povzročil zmanjšanje povprečne velikosti liposomov za skoraj polovico. S povečevanjem deleža PG v formulaciji se je tudi povprečna velikost liposomov povečala. Največjo velikost so imeli liposomi, ki smo jih pripravili z 10 % masnim deležem PG (111 nm); le-ti so imeli najnižji PDI (0,259). Dodatek PG vpliva tudi na elektrostatsko stabilizacijo liposomov, in sicer večji kot je dodatek PG, večja je absolutna vrednost naboja na površini liposomov, zaradi česar so le-ti bolje stabilizirani.

Pri izdelavi ML z magnetnimi skupki iNANO-NH₂ smo ugotovili, da je optimalna koncentracija magnetnih skupkov za izdelavo ML 1,25 mg/mL pri masi lipidov 125 mg in volumnu disperznega medija 2,5 mL. Pri manjši koncentraciji magnetnih skupkov (0,125 mg/mL) je bil izkoristek priprave očiščenih ML majhen, pri večji koncentraciji magnetnih skupkov (3,125 mg/mL) pa je bilo čiščenje ML v šibkem gradientu magnetnega polja težavno.

Postavili smo učinkovito metodo za ločevanje ML od praznih liposomov in nevgrajenih magnetnih skupkov. Pri ločevanju tik ob magnetu, kjer je gradient magnetnega polja največji, predvidevamo, da magnetna sila »potegne« magnetne skupke iz ML in posledično nastopi sedimentacija magnetnih skupkov. Z ločevanjem v šibkejšem gradientu magnetnegapolja in na podlagi razlik v izoelektričnih točkah ML in nevgrajenih magnetnih skupkov ter krajšim časom izpostavitve večjim gradientom magnetnega polja smo preprečili, da bi magnetna sila verjetno »potegnila« magnetne skupke iz ML.

Ugotovili smo, da 5 ali 10 % masni delež PG pri izdelavi ML izboljša stabilnost formulacije ML in vodi v bolj homogeno porazdelitev velikosti ML. Povečana stabilnost ML omogoči, da lahko čiščenje ML izvedemo v visokem gradientu magnetnega polja ne da bi prišlo do »potega« magnetnih skupkov iz ML. PDI tako očiščenih ML je bil nizek, kar pomeni, da je bila porazdelitev velikosti ML dokaj monodisperzna.

Pri raziskovanju vpliva funkcionalnih skupin na površini magnetnih skupkov na izdelavo ML smo ugotovili, da so le magnetni skupki iNANO-NH₂ primerni za izdelavo ML. Magnetni skupki s silanolnimi skupinami ali karboksilnimi skupinami na površini se v liposome ne vgradijo oz. je praktično nemogoče ločiti ML od nevgrajenih magnetnih skupkov zaradi zelo podobnih lastnosti njihovih površin. Predvidevamo tudi, da je bil delež vgrajenih magnetnih skupkov v teh dveh tipih formulacij zelo majhen.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da smo uspešno izdelali ML z vgrajenimi magnetnimi skupki z amino skupino na površini. ML z 10 % masnim deležem PG v lipidnem dvosloju so bili učinkovito elektrostatsko stabilizirani. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno razviti metodo s katero bi lahko določili izkoristek vgrajevanja magnetnih skupkov v ML in v ML vgraditi izbrano ZU.

6 LITERATURA

1 D.D. Lasic: Liposomes from Physics to Applications, Elsevier science publishers B.V., Amsterdam, 1993: 1-166.

2 http://www.andros.com.tw/en/technology_en.html (21.4.2015)

3 Boyer R.F: Lipidi, biološke membrane in transport, Temelji biokemije. 2nd ed. Študentska založba, Ljubljana, 2005, 208-240.

4 <u>http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/pc/index.html</u> (25.4.2015)

5 <u>http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/cholest/file.pdf</u> (25.4.2015)

6 <u>http://upendrats.blogspot.com/2012/05/thebiological-membrane-introduction.html</u> (20.6.2015)

7 Kočevar N, Kristl J: Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi. Farmacevtski vestnik 2005; 56: 202-206.

8<u>www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1384&Itemid=</u> 372 (30.4.2015)

9 http://www.news-medical.net/health/Liposome-Uses.aspx (30.4.2015)

10 Abolfazl A, Rogaie R S, Soodabeh D, Sang W J, Nosratollah Z, Younes H, Mohammad S, Mohammad K, Kazem NK: Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters 2013; 8:102.

11 Culity B: Introduction to magnetic materials. (2009), John Wiley&Sons: 1-126.

12 D Jiles, Introduction to magnetism and magnetic materials, 2. Izdaja, Chapman and Halls, London, 1998: 1-134.

13 Kralj S: Funkcionalizacija magnetnih nanodelcev za uporabo v biomedicini, Doktorska disertacija,

Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Ljubljana, 2012: 1-7.

14<u>http://en.wikibooks.org/wiki/Introduction_to_Inorganic_Chemistry/Metals_and_Alloys:</u> _<u>Structure,_Bonding,_Electronic_and_Magnetic_Properties</u> (11.5.2015)

15 Arruebo M, Fernandez-Pacheco R, Ibarra M R, Santamaria J: Magnetic nanoparticles for drug delivery. Nanotoday 2007; 22-32.

16 Prijic S, Sersa G: Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology. Radiol. Oncol. 2011; 45(1): 1-16.

17 http://en.wikipedia.org/wiki/Ferrofluid (15.5 2015)

18 http://rruff.geo.arizona.edu/doclib/hom/maghemite.pdf

19 Abbas M, Torati S R, Lee C S, Rinaldi C, Kim C G: Fe3O4/SiO2 Core/ Shell Nanocubes: Novel Coating Approach with Tunable Silica Thickness and Enhancement in Stability and Biocompatibility. J Nanomed Nanotechnol 2014; 5:244.

20 Alwi R, Telenkov S, Mandelis A, Leshuk T, Gu F, Oladepo S, Michaelian K: Silicacoated super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) as biocompatible contrast agent in biomedical photoacoustics. Biomedical Optics Express 2012; 3/10: 2500-2509.

21 Mahmoudi M, Sant S, Wang B, Laurent S, Sen T: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. Advanced Drug Delivery Reviews 2011; 63: 24–46.

22 Kralj S, Makovec D: The chemically directed assembly of nanoparticle clusters from superparamagnetic iron-oxide nanoparticles. RSC Adv. 2014; 4:13:167.

23 http://nanos-sci.com/technology.html (21.5. 2015)

24 De Cuyper M, Noppe W: Extractability of the phospholipid envelope of magnetoliposomes by organic solvents. J. Colloid Interf. Sci. 1996; 182: 478–482.

25 Sabate R, Barnadas-Rodriguez R, Callejas-Fernandez J, Hidalgo-Alvarez R, Estelrich J: Preparation and characterization of extruded magnetoliposomes. International Journal of Pharmaceutics 2008;

347: 156–162.

26 Soenen S J, Velde G V, Ketkar-Atre A, Himmelreich U, De Cuyper M: Magnetoliposomes as magnetic

resonance imaging contrast agents. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology 2011; 3: 197-211.

27 Kocbek P: Novosti na področju farmacevtske nanotehnologije., Farmacevtski vestnik 2012; 63: 75-81.

28 Pecora R, Berne B J: Dynamic Light Scattering; With Applications to Chemistry,

Biology and Physics, 2. Ed., Dover Publications, New York 2000: 1 -38.

29http://www.horiba.com/scientific/products/particle-

characterization/technology/dynamic-light-scattering/ (1.6.2015)

30 <u>http://www.escubed.co.uk/sites/default/files/zeta_potential_(an011)_elecrophoresis.pdf</u> (1.6.2015)

31<u>http://www.malvernkorea.co.kr/labger/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.ht</u> (1.6.2015)

32 <u>file:///C:/Users/tanja/Downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf</u> (1.6.2015)

33 <u>http://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy</u> (1.6.2015)

34 <u>http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/tem/</u> (1.6.2015)

35 Smith E A, Dea P K: Differential Scanning Calorimetry Studies of Phospholipid Membranes: The Interdigitated Gel Phase; Applications of Calorimetry in a Wide Context –Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry, InTech, Rijeka, 2013, 407-444.

36 Polozovaa A, Lia X, Shangguana T, Meersa P, Schuetteb D R, Andob N, Grunerb S M, Perkinsa W R: Formation of homogeneous unilamellar liposomes from an interdigitated matrix. Biochimica et Biophysica Acta 2005; 1668: 117–125.