

FUNKCIONALIZACIJA MAGNETNIH NANODELCEV ZA UPORABO V BIOMEDICINI

Slavko Kralj

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija, marec 2012

Komisija za oceno doktorske disertacije:

doc. dr. Darja Lisjak, predsednica, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

prof. dr. Janez Štrancar, član, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

prof. dr. Julijana Kristl, članica, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Slavko Kralj

FUNKCIONALIZACIJA MAGNETNIH NANODELCEV ZA UPORABO V BIOMEDICINI

Doktorska disertacija

FUNCTIONALIZATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. dr. Darko Makovec

Somentor: prof. dr. Janko Kos

Ljubljana, Slovenija, marec 2012

Kazalo

Povzetek	IX
Abstract	XI
Seznam kratic	XIII
1 Uvod	1
1.1 Magnetizem.....	1
1.2 Struktura in magnetizem nanodelcev maghemita	6
1.3 Sinteza nanodelcev	7
1.3.1 Nastanek nevtralnega prekursorja	8
1.3.2 Nukleacija.....	8
1.3.3 Rast delcev.....	8
1.3.4 Zorenje.....	8
1.4 Koloidi.....	9
1.5 Biokompatibilne prevleke nanodelcev	14
1.5.1 Prevlčenje nanodelcev s siliko.....	15
1.6 Funkcionalizacija nanodelcev s silani	16
1.7 Biokonjugacije nanodelcev	18
1.8 Uporaba magnetnih nanodelcev v biomedicini.....	23
1.8.1 Slikanje z magnetno resonanco	25
1.8.2 Magnetna hipertermija.....	26
1.8.3 Ciljano dostavljanje zdravilnih učinkovin.....	27
1.8.3.1 Pasivno in aktivno ciljanje	27
1.8.4 Magnetna separacija	29
2 Namen dela	31
3 Materiali in metode	33
3.1 Materiali	33
3.2 Sintezne metode	33
3.2.1 Sinteza magnetnih nanodelcev	33
3.2.2 Priprava magnetne tekočine	34
3.2.3 Prevlčenje magnetnih nanodelcev s siliko.....	34
3.2.4 Priprava nanodelcev s terminalnimi amino skupinami	34
3.2.4.1 Funkcionalizacija s (3-aminopropil)trietoksi silanom	35
3.2.4.2 Funkcionalizacija z N-(3-aminoheksil)propilmetiltrimetoksi silanom.....	35
3.2.4.3 Funkcionalizacija z N-(3-tritoksisililpropil)etilendiaminom	35
3.2.4.4 Funkcionalizacija s 3-(2-aminoetilamino)propilmetildimetoksi silanom.....	36

3.2.5 Priprava fluorescentnih nanodelcev s prostimi amino skupinami na površini.....	36
3.2.6 Priprava nanodelcev s terminalnimi karboksilnimi skupinami.....	37
3.2.7 Priprava fluorescentnih nanodelcev s prostimi karboksilnimi skupinami na površini.....	39
3.2.8 Priprava celičnih kultur.....	39
3.2.9 Vežave epidermalnega rastnega dejavnika na fluorescentne nanodelce – biokonjugacija.....	39
3.2.9.1 Kovalentna vežava EGF na nanodelce f-NND z uporabo karbodiimid kemije (1. tip).....	40
3.2.9.2 Kovalentna vežava EGF na nanodelce f-PND z uporabo povezovalne molekule BS3 (2. tip).....	41
3.2.9.3 Kovalentna vežava EGF na nanodelce f-PND z uporabo povezovalne molekule BS(PEG)5 (3. tip).....	41
3.2.9.4 Elektrostatska adsorbcija EGF na nanodelce f-ND-Si-APMS (4. tip).....	42
3.2.9.5 Elektrostatska adsorbcija EGF na nanodelce f-ND-Si-APMS-SA (5. tip).....	42
3.3 Karakterizacijske tehnike.....	43
3.3.1 Meritve magnetnih lastnosti nanodelcev.....	43
3.3.1.1 Določitev obsega privzema nanodelcev v celice z magnetometrom s SQUID detektorjem.....	43
3.3.2 Rentgenska praškovna difrakcija.....	44
3.3.3 Presevna elektronska mikroskopija.....	45
3.3.3.1 Analiza privzema nanodelcev v celice s TEM.....	45
3.3.4 Termogravimetrična metoda.....	45
3.3.5 Raziskave kakovosti prevleke silike s testom raztapljanja.....	45
3.3.6 Elektrokinetične meritve.....	45
3.3.7 Meritve velikosti nanodelcev z dinamičnim sipanjem svetlobe.....	46
3.3.8 Konduktometrične titracije.....	46
3.3.9 Infrardeča in masna spektroskopija.....	47
3.3.10 Testi citotoksičnosti.....	47
3.3.11 Določanje obsega privzema nanodelcev v celice s pretočnim citometrom.....	47
3.3.12 Fluorescenčna mikroskopija celic.....	48
4 Rezultati.....	49
4.1 Sinteza magnetnih nanodelcev.....	49
4.2 Priprava stabilne suspenzije magnetnih nanodelcev.....	51
4.3 Prevlečenje nanodelcev ND-CA s prevlekami silike.....	54
4.3.1 Priprava tankih (do 2 nm) prevlek silike.....	55
4.3.2 Priprava debelejših prevlek silike.....	60
4.4 Funkcionalizacija nanodelcev ND-Si z amino silani.....	61
4.5 Fluorescentni nanodelci s prostimi amino skupinami.....	64
4.6 Nanodelci s terminalnimi karboksilnimi skupinami.....	65
4.7 Fluorescentni nanodelci s prostimi karboksilnimi skupinami.....	68
4.8 Testi citotoksičnosti.....	69
4.9 Določanje privzema nanodelcev v celice.....	70
4.9.1 Pretočni citometer.....	70
4.9.2 Fluorescenčna mikroskopija.....	71

4.9.3 Presevna elektronska mikroskopija	73
4.9.4 Obseg privzema določen z magnetometrom SQUID	76
4.10 Priprava biokonjugatov	76
4.11 Biokonjugati in njihova specifičnost prepoznavanja EGFR pozitivnih celic.....	81
5 Razprava.....	85
6 Zaključki.....	93
7 Zahvale.....	95
8 Literatura in viri	97
Kazalo slik	107
Kazalo tabel.....	111
Priloge	113

Povzetek

Za uporabo magnetnih nanodelcev v biomedicini je potrebno pripraviti primerno prirejene nanodelce, kjer je osnovni pogoj priprava stabilne koloidne suspenzije nanodelcev v kompleksnih bioloških medijih. Glede na namen uporabe je poleg izbora primerne prevleke potrebno površine nanodelcev funkcionalizirati ter tako zagotoviti zmožnost vezave različnih biološko zanimivih (makro)molekul.

V pričujočem delu sem se ukvarjal s prevlečenjem nanodelcev z različno debelimi amorfnimi plastmi silicijevega dioksida (siliko), s funkcionalizacijo prevlečenih nanodelcev s silani in z (bio)konjugacijo funkcionaliziranih nanodelcev.

Nanodelce $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sem sintetiziral s soobarjanjem iz vodnih raztopin ionov Fe^{2+} in Fe^{3+} . V naslednjem koraku sem pripravil stabilne koloidne suspenzije nanodelcev, kjer sem na površine nanodelcev adsorbiral citronsko kislino. Slednja omogoča pripravo elektrostatsko stabilizirane koloidne suspenzije, ki sem jo nadalje uporabil za pripravo s siliko prevlečenih nanodelcev.

Nanodelci z adsorbirano citronsko kislino izkazujejo zelo negativen površinski naboj v alkalnem pH območju, kar zagotavlja primerno koloidno stabilnost suspenzije. V tem območju sem izvajal reakcije prevlečenja nanodelcev s siliko. Pri reakcijah prevlečenja nanodelcev s siliko sem preučeval vpliv relevantnih parametrov na kakovost tankih prevlek silike. Pri tem sem določil optimalen izbor parametrov, ki zagotavlja pripravo enakomernih prevlek silike.

Na površine s siliko prevlečenih nanodelcev sem vezal različne molekule amino silanov. Molekule amino silanov tvorijo močne siloksanske vezi s površino prevleke in obenem zagotovijo proste terminalne amino skupine. Slednje omogočajo uspešno vezavo biološko zanimivih molekul v fiziološko sprejemljivih reakcijskih pogojih. Pri vezavi amino silanov sem izbral silan, ki ga lahko na površine nanodelcev vežem zelo kontrolirano (spreminjam njegovo površinsko koncentracijo). Le z zmožnostjo kontrolirane vezave lahko zagotovimo definirane produkte, ki omogočajo kontrolo pri nadaljnjih reakcijah (bio)konjugacije.

Na del amino skupin, na amino funkcionaliziranih nanodelcih, sem vezal molekule fluoresceina, s čimer sem zagotovil zmožnost vrednotenja fluorescentnih nanodelcev z optičnimi metodami.

Priprava večnamenskih nanodelcev, kjer so na površinah nanodelcev vezane različne molekule v željenih razmerjih (na primer molekula barvila in protitelo), zahteva dobro poznavanje površin nanodelcev kot tudi sposobnost spreminjanja razmerja med različnimi površinskimi funkcionalnimi skupinami. V ta namen sem razvil postopek, ki omogoča zvezno spreminjanje razmerja med površinskimi amino in karboksi skupinami. Na amino funkcionalizirane nanodelce sem vezal molekule sukcin anhidrida, ki reagirajo z amino skupinami na površinah nanodelcev in tako uvedejo karboksilne skupine na površine nanodelcev.

V nadaljevanju sem preučeval vpliv površinskega naboja (zeta potenciala) nanodelcev na njihov privzem v različne celične linije. Pri tem sem raziskoval amino in karboksi funkcionalizirane fluorescentne nanodelce, ki se med seboj razlikujejo po vrednosti zeta potencialov.

V sklepnem delu sem pripravil biokonjugate, ki so namenjeni aktivnemu ciljanju tarčnih celic A431. Pri tem je bila izbrana makromolekula afinitetnega liganda, epidermalni rastni dejavnik EGF. Ta izkazuje afiniteto do receptorja EGFR na površini ciljanih celic. Pripravil sem pet različnih tipov vezi/interakcij med nanodelci in EGF ter testiral njihovo učinkovitost prepoznavanja ciljanih celic.

Abstract

The application of magnetic nanoparticles in biomedicine dictates the preparation of properly arranged nanoparticles. The preparation of a stable colloidal suspension of nanoparticles in complex biological media is a prerequisite for all types of applications. Depending on the type of application, the proper coating, functionalization and (bio)conjugation of the nanoparticles should be chosen.

The presented work describes the synthesis of silica coatings on nanoparticles' surfaces, the functionalization of silica-coated nanoparticles and the (bio)conjugation of functionalized nanoparticles.

The superparamagnetic maghemite nanoparticles were synthesized by the coprecipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} ions from an aqueous solution. Next, a stable colloidal suspension of nanoparticles was prepared using citric acid as a surfactant and this electrostatically stabilized suspension was further used for the synthesis of silica coatings.

The nanoparticles with adsorbed citric acid exhibited a highly negative surface charge in an alkaline medium, which ensures an adequate stability of the colloidal suspension. Therefore, the reactions of the silica coatings were performed at alkaline pH values. The relevant parameters influencing the quality of the thin silica coatings were systematically studied. The optimal selection of parameters ensuring the homogeneous silica coatings was determined.

Various amino silanes were bonded onto the surfaces of silica-coated nanoparticles. Silanes form strong siloxane bonds with silica surfaces and they provide free terminal amino groups onto the surfaces at the same time. These amino groups enable the successful bonding of biologically interesting molecules in physiologically acceptable reaction conditions. Among the four amino silanes only one was selected. This enabled precisely controlled bonding onto the silica surfaces. The possibility of controlling the surface concentration of bound silane molecules ensures well-defined products, which are the basis for further bioconjugations.

Part of the introduced surface amino groups was bonded with fluorescent molecules, which ensured the tracking of fluorescent nanoparticles with optical methods.

The preparation of multifunctional nanoparticles, where the various types of molecules were bonded to the nanoparticles' surfaces in a desired ratio, required good understanding of the surface chemistry involved as well as the ability to adjust the ratio between various surface functional groups. A special method was developed for this purpose providing good control over the ratio between the surface amino and carboxyl groups. Succinic anhydride was bonded onto the amino-functionalized nanoparticles, introducing surface carboxyl groups onto the nanoparticle surfaces.

Furthermore, the effect of various surface charges of fluorescent nanoparticles on their cellular uptake was intensively studied. For this purpose the amino-functionalized and carboxyl-functionalized nanoparticles were prepared due to their differences in zeta-potential values.

Finally, five different types of bioconjugates designed to actively target specific A431 cells were synthesized. For this purpose, the epidermal growth factor (EGF) was chosen as an affinity ligand. Since EGF shows an affinity for the EGF receptor over-expressed at

the targeted A431 cells the targeting specificity toward the A431 cells was also intensively studied.

Seznam kratic

A	Hamaker-jeva konstanta
B	gostota magnetnega polja
D	razdalja med delcema
D_P	kritična velikost superparamagnetnega delca
D_S	velikost enodomenskega delca
DLS	dinamično sipanje svetlobe
DNK	deoksiribonukleinska kislina
e	osnovni naboj
E_A	aktivacijska energija
EDXS	energijska disperzijska rentgenska spektroskopija
EGF	epidermalni rastni dejavnik
F	London-ova disperzijska sila
H	jakost magnetnega polja
H_C	polje koercitivnosti
k_B	Boltzman-ova konstanta
K_u	efektivna konstanta anizotropije
m	magnetni moment delca
m_v	masa vzorca
M	magnetizacija
MR	magnetna resonanca
M_R	remanentna magnetizacija
M_S	nasičena magnetizacija
RNK	ribonukleinska kislina
SPION	superparamagnetni nanodelci železovega oksida
t	čas
T	temperatura
T_B	temperatura blokiranja
T_C	Curie-jeva temperatura
T_1	longitudinalni relaksacijski čas
T_2	transverzalni relaksacijski čas
V	volumen
V_A	celokupna energija privlaka
V_R	celokupna energija odboja
V_T	celokupna energija (DLVO)
z	valenca iona
ε	dielektričnost medija
ε_0	dielektričnost vakuumu
ε_r	relativna dielektričnost medija
χ	magnetna susceptibilnost
ζ	zeta potencial
η	viskoznost
κ	Debye-ova dolžina

μ_0	permeabilnost vakuuma
ρ	gostota
τ_B	karakteristični čas Néel-ove relaksacije
τ_N	karakteristični čas Brown-ove relaksacije
ψ	vrednost električnega potenciala
ψ_0	potencial na površini

1 Uvod

Narava je tekom svojega obstoja ustvarila številne materiale, ki jih po današnjih definicijah lahko štejemo med nanodelce. V pestrih pogojih okolja so tako nastali glinenci, oksidi/hidroksidi železa, aluminija, silicija in še mnogih drugih elementov, mnogo prej, kot jih je človek poskusil ustvariti po vzoru narave. Železove okside v obliki nanodelcev lahko najdemo v različnih živalskih vrstah (delfini, čebele, lososi...) in mikroorganizmih (magnetotaktne bakterije), kjer jim magnetni nanodelci zaradi posebnih magnetnih lastnosti služijo za orientacijo v zemeljskem magnetnem polju. Magnetni materiali so od nekdaj okoli nas in še vedno pomembno vplivajo na življenje sodobnega človeka.

Koncept nanotehnologije, kjer gre za razumevanje, manipulacijo, sintezo in kontrolo snovi na ravni skupkov atomov in molekul, je predstavil Nobelov nagrajenec Richard Feynman v svojem predavanju »Spodaj je še veliko prostora« že leta 1959. Tehnologija nam omogoča pripravo umetnih nanodelcev, ki zaradi svojih specifičnih lastnosti izkazujejo velik potencial tudi na biomedicinskem področju. Najpogosteje preučevani anorganski nanodelci za različne uporabe v biomedicini so superparamagnetni nanodelci magnetita (Fe_3O_4) in maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Za uporabo v biomedicini moramo takšne nanodelce pripraviti v obliki stabilnih koloidnih suspenzij, ki jim pravimo tudi magnetne tekočine oziroma ferrofluidi. Poleg specifičnih magnetnih lastnosti morajo nanodelci ustrezati še številnim zahtevam, da so primerni za uporabo v medicini.

Magnetni nanodelci so posebej zanimivi zaradi svojih specifičnih magnetnih lastnosti, ki nam omogočajo, da jih z gradientom magnetnega polja vodimo po prostoru. V medicini lahko magnetne nanodelce uporabljamo za diagnostiko, saj so dobro kontrastno sredstvo pri slikanju z magnetno resonanco. Za potencialno uporabo v terapiji jih zelo pogosto raziskujejo kot nosilce za ciljano dostavljanje zdravilnih učinkovin v tumorsko tkivo in pri zdravljenju rakavih obolenj s hipertermijo. Ker večina uporab magnetnih nanodelcev temelji na izkoriščanju njihovih zanimivih magnetnih lastnosti, bom le-te v nadaljevanju strnjeno razložil.

1.1 Magnetizem

Uporaba magnetnih nanodelcev v biomedicini temelji na njihovem magnetizmu. Vse snovi so zgrajene iz atomov, kjer pa so lastnosti snovi odvisne od vrste in medsebojne razporeditve atomov v snovi. Magnetizem je pojav, ki je posledica gibanja električnega naboja – elektrona. V atomu se elektroni gibljejo v bližini jedra v t.i. orbitalah. Zaradi tega mu pripišemo orbitalni magnetni moment. Imajo pa tudi spinski magnetni moment (spin). Magnetni moment atoma je vsota magnetnih momentov obeh prispevkov vseh elektronov v atomu, kjer pa je prispevek spinskega magnetnega momenta k magnetnemu momentu atoma bistveno večji od orbitalnega. Atomi imajo različno število elektronov, kjer so lahko na zunanji lupini elektronski pari (polno zasedena lupina) ali pa so na zunanji lupini nesparjeni elektroni. V slednjem primeru se magnetni momenti elektronov le delno kompenzirajo, zato takšen atom izkazuje magnetni moment in ga imenujemo magnetni atom. Magnetizacija M je lahko izražena kot magnetni moment na maso snovi

[1].

$$M = \frac{m}{m_v} \quad (1)$$

m magnetni moment
 m_v masa vzorca

Snovi se zaradi različnih atomov in njihove razporeditve po volumnu različno odzivajo v magnetnem polju H , kjer posamezni magnetni momenti atomov v materialu prispevajo k celokupnem odgovoru, magnetni indukciji B .

$$B = \mu_0(H + M) \quad (2)$$

μ_0 permeabilnost v praznem prostoru
 M magnetizacija

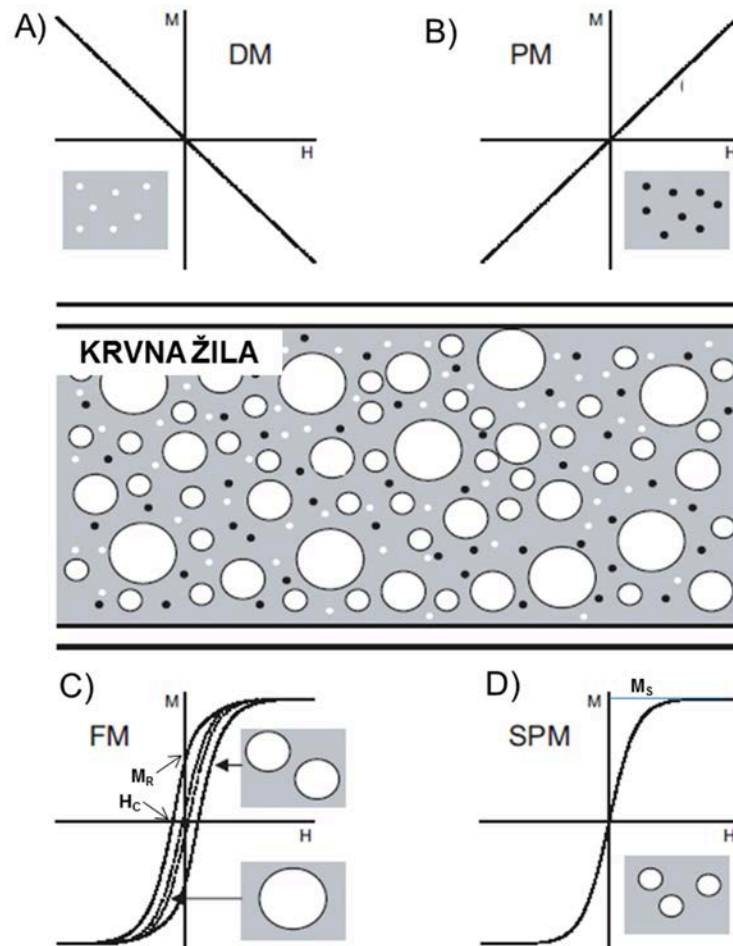
Vsi materiali so do določene mere magnetni, kjer je njihov odziv v magnetnem polju odvisen od atomske strukture in temperature. Materiale lahko tako razvrstimo v različne skupine glede na magnetno susceptibilnost χ , ki opisuje razmerje med inducirano magnetizacijo in magnetnim poljem [2].

$$\chi = \frac{M}{H} \quad (3)$$

H jakost magnetnega polja

Magnetna susceptibilnost je po klasifikaciji SI brezdimenzijska količina, medtem ko je M izražena z enoto $\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$ in H z enoto A m^{-1} . Večina materialov izkazuje majhen magnetizem in to navadno v prisotnosti magnetnega polja. Takšne materiale lahko klasificiramo bodisi kot paramagnetne (Slika 1(B)), kjer so vrednosti χ v območju 10^{-6} do 10^{-1} ali kot diamagnetne (Slika 1(A)), kjer so vrednosti χ v območju -10^{-6} do -10^{-3} . Nekateri materiali izkazujejo urejena magnetna stanja, ki presegajo dimenzije osnovne celice. Takšni materiali so lahko magnetni brez prisotnosti magnetnega polja. Takšne materiale klasificiramo kot feromagnetne in ferimagnetne, kjer je predpona povezana z naravo sklopitvenih interakcij med elektroni v materialu. Antiferomagnetni materiali so posebna skupina med paramagnetnimi snovmi, kjer je usmerjenost magnetnih spinov v dveh nasprotujočih se podmrežah antiparalelna in celotna magnetizacija enaka nič. Sklopitve lahko povzročijo nastanek visoke spontane magnetizacije, kjer je M pri feromagnetnih snoveh tipično za velikostni red 10^4 -krat višja, kot bi bila, če sklopitev ne bi bilo. Magnetna susceptibilnost v »urejenih« materialih ni odvisna le od temperature, ampak tudi od vrednosti H , ki daje karakteristično sigmoidno obliko krivulji $M-H$, kjer M doseže nasičeno vrednost pri velikih vrednostih H . To vrednost magnetizacije imenujemo nasičena magnetizacija M_s . V feromagnetnih in ferimagnetnih materialih lahko opazimo histerezno zanko, ki kaže na ireverzibilnost procesa magnetizacije (Slika 1(C)). Področje v materialu, kjer ima spontana magnetizacija enako smer, imenujemo magnetna domena. Predpostavki o spontani magnetizaciji in obstoju domen v feromagnetnih snoveh je leta 1907 postavil Pierre Weiss [3]. Z zunanjim magnetnim poljem lahko usmerimo magnetne momente znotraj domenske stene in s tem domenske stene premaknemo. Prvo namagnetenje imenujemo proces, ko material prvič izpostavimo zunanjemu magnetnemu polju. Z zmanjševanjem magnetnega polja se del magnetnih momentov ponovno relaksira, kar povzroči nastanek remanentne magnetizacije M_R , ki je lastnost danega materiala. To je vrednost magnetizacije, ko je $H = 0$. Material lahko razmagnetimo, če ga

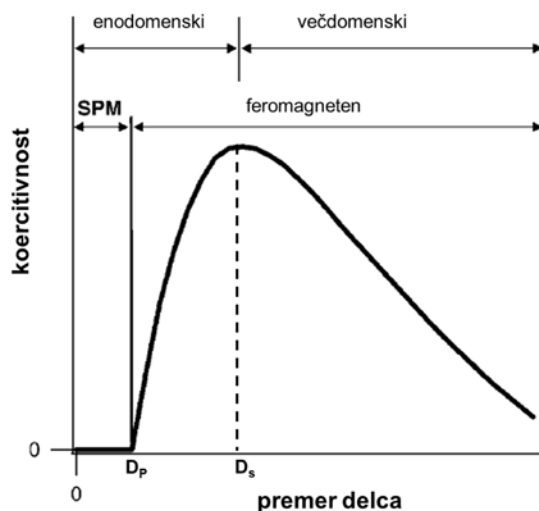
segrejemo nad Curie-jevo temperaturo T_C , ki je temperatura prehoda iz feromagnetnega obnašanja v paramagnetno obnašanje. Feromagnetni materiali pri $T > T_C$ ne izkazujejo remanentne magnetizacije. Po izpostavitvi materiala nasprotno orientiranem magnetnem polju lahko magnetizacijo izničimo. Jakost polja, kjer magnetizacija pade na vrednost nič imenujemo koercitivnost H_C (Slika 1(C)). Na ireverzibilnost procesa magnetizacije vplivajo tudi intrinzični učinki kot je magnetna anizotropija kristalne mreže. Feromagnetni materiali se nad T_C začnejo obnašati kot paramagnetne snovi. Nad to temperaturo je termična energija dovolj velika, da pride do relaksacije magnetnih momentov in do njihove naključne orientacije [4].



Slika 1: Ilustrativen prikaz hipotetične situacije, kjer v krvno žilo injiciramo različne tipe magnetnih materialov, pri čemer velikosti feromagnetnih delcev variirajo med 1 nm in vse do 1 μ m. Krivulje $M-H$ so prikazane za diamagnetne (A) in paramagnetne (B) biomateriale, ki sestavljajo krvno plazmo. Pod točko (C) je prikazan odziv $M-H$ feromagnetnih delcev, ki so bodisi večdomenski (večji krožec), bodisi enodomenski (manjši krožec). Točka (D) predstavlja odziv $M-H$ superparamagnetnih delcev. Magnetni signal injiciranih delcev ne glede na njihovo velikost močno presega paramagneten prispevek (hemoglobin, feritin, transferin, hemosiderin, citokromi) in diamagneten prispevek (organske spojine) biomaterialov v krvni žili [4].

Obliko histerezne zanke deloma določa velikost delcev, kjer se pri velikih delcih (reda velikosti 1 μ m ali več), ki so večdomenski, oblika zanke zoži. Vzrok je relativno majhna energija polja, ki je potrebna za premikanje domenskih sten. Pri enodomenskih delcih je zaradi urejanja vseh spinov hkrati potreba po energiji večja, kar vodi k širšim histereznim zankam. Po obliki histerezne zanke ločimo materiale na mehko in trdo magnetne. Materiale z majhno remanenco, kjer dosežemo nasičeno magnetizacijo pri relativno

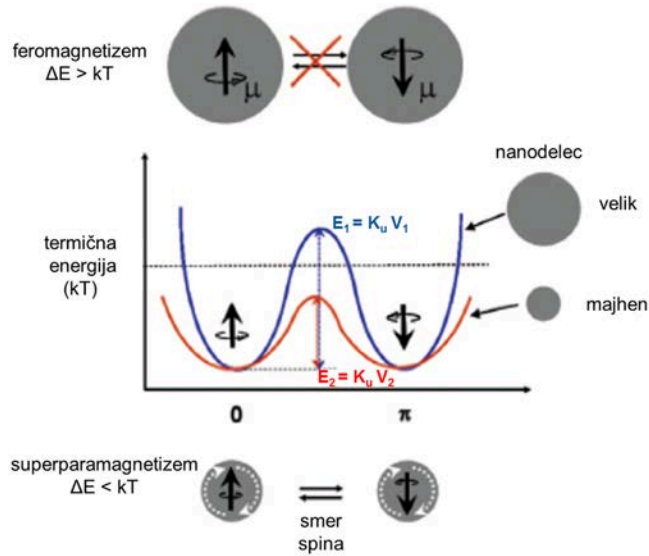
nizkem magnetnem polju, imenujemo mehko magnetni materiali. Trdo magnetni materiali pa so tisti, kjer je potrebno visoko magnetno polje za doseg nasičene magnetizacije in imajo visoko remanenco [5].



Slika 2: Koercitivnost v odvisnosti od velikosti delcev [6]. SPM pomeni superparamagnetizem.

Velikost delcev močno vpliva na koercitivnost. Slika 2 prikazuje spreminjanje koercitivnosti v odvisnosti od velikosti delcev. Z zmanjševanjem velikosti delcev se koercitivnost najprej povečuje, doseže maksimalno vrednost in nato pade na nično vrednost. Z zmanjševanjem velikosti delcev je tvorba domenskih sten energetsko neugodna, kjer pri kritični velikosti D_s delci postanejo enodomenski. V enodomenskem stanju izkazujejo tudi največjo vrednost koercitivnosti. Ocenjena velikost enodomenskih delcev maghemita znaša 166 nm [7]. Ker je domenska stena debela do 1000 premerov atoma, takšni delci ne morejo razviti večdomenske strukture. Če velikost enodomenskih delcev zmanjšujemo, pridemo do kritične velikosti D_p (reda velikosti 10 nm ali manj), kjer delci pridejo v superparamagnetno stanje. V superparamagnetnem stanju magnetni moment celotnega delca prosto rotira pod vplivom termične energije, medtem ko so posamezni magnetni momenti atomov med seboj urejeni – koherentni. V tem primeru dobimo sigmoidno krivuljo $M-H$, ki pa ne izkazuje histereze (Slika 1(D)). Superparamagnetni delci torej ne izkazujejo remanence. Superparamagnetizem je pojav, ko se feromagnetne oziroma ferimagnetne snovi obnašajo kot paramagnetne snovi pod Curie-jevo temperaturo. Superparamagnetnim delcem se magnetizacija zelo hitro poveča že pri majhnih vrednostih magnetnega polja in se po umiku magnetnega polja povrne na vrednost nič (paramagnetizem). Magnetni momenti, ki jih obravnavamo pri superparamagnetizmu so vsaj tri velikostne rede večji od atomskih momentov pri paramagnetizmu. Iz tega izhaja tudi izraz superparamagnetizem [1, 2, 4].

Energijska ovira E_A , ki je potrebna, da obrnemo magnetizacijo magnetnega delca, znaša $K_u V$. K_u predstavlja efektivno konstanto anizotropije, V pa prostornino delca. Pri neki kritični velikosti delcev D_p je termična energija večja od energijske ovire in tako povzroči hitro rotacijo magnetizacije delcev med dvema ravnotežnima legama glede na čas opazovanja (Slika 3) [8].



Slika 3: Prikaz prehoda magnetnih delcev iz feromagnetizma v superparamagnetizem [8].

Magnetni moment delca se ureja glede na mirujočo lego delca. Tovrstno relaksacijo magnetnih momentov imenujemo Néel–ov mehanizem relaksacije. Karakterističen čas Néel–ove relaksacije je odvisen od velikosti delcev in raste eksponentno s prostornino delcev [9].

$$\tau = \tau_0 \exp \frac{\Delta E}{k_B T} = \tau_0 \exp \frac{K_u V}{k_B T} \quad (4)$$

τ_0 predeksponentni faktor ($\sim 10^{-10}$ do 10^{-12} s)

Opazovanje superparamagnetizma ni odvisno samo od temperature, temveč tudi od karakterističnega časa meritve za izbrano eksperimentalno tehniko, ki za merjenje magnetizacije znaša navadno 100 s [1].

Ob upoštevanju časa meritve lahko enačbo 4 napišemo v obliki, kjer izrazimo kritično velikost, pri kateri so delci superparamagnetni. Običajno delci izkazujejo superparamagnetne lastnosti, ko so manjši od 15 nm.

$$V = \frac{25k_B T}{K} \quad (5)$$

Za delce določene velikosti lahko iz enačbe 4 izrazimo temperaturo prehoda v superparamagnetno stanje. To temperaturo imenujemo temperatura blokiranja T_B .

$$T_B = \frac{KV}{25k_B} \quad (6)$$

Poleg Néel–ovega mehanizma relaksacije obstaja v suspenzijah še Brown–ova relaksacija. Gre za relaksacijo dipolnih momentov zaradi Brown–ovega gibanja delcev (magnetni moment je nepremičen) v suspenzijah. Karakterističen čas relaksacije je povezan s hidrodinamsko velikostjo delcev [10].

$$\tau_B = \frac{3V_h \eta}{k_B T} \quad (7)$$

V_h hidrodinamski volumen delcev

η dinamična viskoznost nosilne tekočine

Pri oceni časa relaksacije magnetnih momentov v suspenziji, kjer delci dosežejo termodinamsko ravnotežje, je potrebno upoštevati oba relaksacijska mehanizma. Mehanizem s krajšim časom relaksacije prevlada. Za majhne delce je prevladujoč mehanizem Néel–ove relaksacije, za večje pa Brown–ove. Efektivni čas relaksacije se izračuna na podlagi enačbe 8 [9].

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (8)$$

Manjšanje velikosti magnetnih nanodelcev povzroči postopno manjšanje nasičene magnetizacije, kar je posledica večanja razmerja površine proti prostornini delca. Razlog temu je v sloju neurejenih atomov na površini delcev (magnetno mrtvem sloju), ki z zmanjševanjem velikosti delcev predstavlja relativno vse večji delež. Tipična debelina magnetno mrtvega sloja znaša okoli 1nm.

1.2 Struktura in magnetizem nanodelcev maghemita

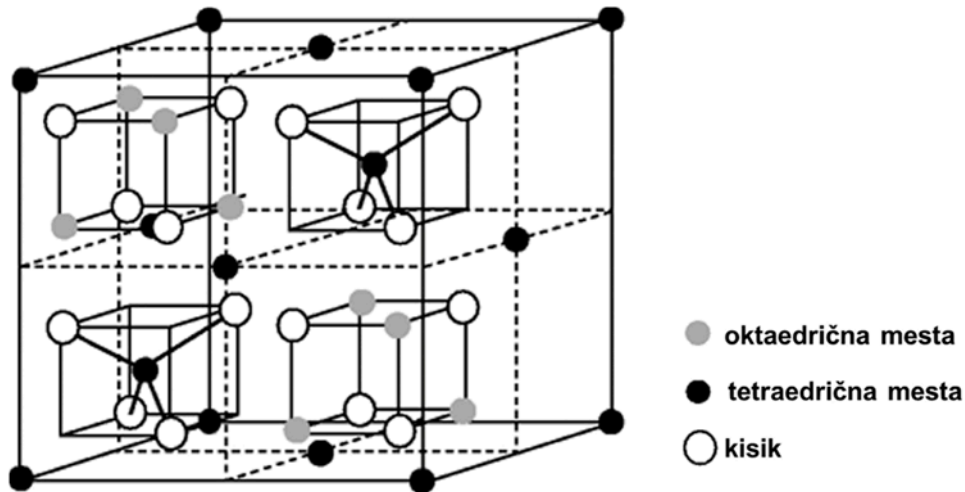
V svojem doktorskem delu sem uporabljal magnetne nanodelce maghemita (γ -Fe₂O₃), zato v nadaljevanju nekoliko podrobneje razložim njegovo strukturo. Struktura maghemita je zelo pomembna pri razumevanju njegovih magnetnih lastnosti. Strukturno in magnetno spada maghemit med kubične ferite.

Feriti so skupina mešanih železovih oksidov, in sicer dvovalentnega kovinskega oksida (MO) in železovega (III) oksida (Fe₂O₃). V feritih najdemo kovinske katione na dveh kristalografskih podmrežah. Néel je predpostavil, da so spini med podmrežama A in B orientirani antiparalelno, znotraj posamezne podmreže pa paralelno. Spontana magnetizacija je posledica neenakosti magnetnih momentov v nasprotno usmerjenih podmrežah. Struktura kubičnih feritov je analogna mineralu spinelu MgAl₂O₃, zato jih imenujejo tudi spineli. Spineli imajo splošno formulo AB₂O₄, kjer A označuje dvovalentni kation, B pa trivalentni. Tipična velikost osnovne celice je med 0,8 in 0,9 nm in je sestavljena iz 8 molekulskih enot AB₂O₄, kar znaša 56 ionov. Kisikovi anioni tvorijo ploskovno centrirano kocko, manjši kationi pa zasedejo intersticijske v kisikovi mreži. Med kisikovi ioni je 32 oktaedrskih B in 64 tetraedrskih A intersticijskih mest. Kationi zasedejo le 16 oktaedrskih in 8 tetraedrskih intersticijskih mest. Glede na porazdelitev kationov poznamo dve skrajni strukturi. Pri normalnih spinelih se trivalentni kationi vgradijo na oktaedrska mesta B, na tetraedrska mesta A pa dvovalentni kationi. Pri inverznih spinelih so tetraedrska mesta zasedena s trivalentnimi kationi, oktaedrska mesta pa so zasedena z dvovalentnimi in ostalimi trivalentnimi kationi [5].

Za razliko od običajnih spinelov, kjer so vgrajeni dvo- in trivalentnih kationi v kristalnih mrežah, vsebuje maghemit samo trivalentne katione. Razlika v nabojih se kompenzira s prazninami. Velikost osnovne celice maghemita je $a = 0,834$ nm in vsebuje 21 $\frac{1}{3}$ železovih (III) kationov in 2 $\frac{2}{3}$ praznin. Vse praznine se v kristalni strukturi maghemita nahajajo na oktaedrskih mestih. Za maghemit lahko tako zapišemo naslednjo formulo (Fe)₈[Fe₁₃ $\frac{1}{3}$ Δ ₂ $\frac{2}{3}$]O₃₂, pri čemer označujejo okrogli oklepaji tetraedrska mesta, oglati oklepaji oktaedrska mesta in Δ praznine [11].

Poznavanje strukture maghemita nam olajša razumevanje njegovih magnetnih lastnosti. Néel je svojo teorijo ferimagnetizma razvil ravno na podlagi poznavanja strukture in magnetizma feritov. Na podlagi kristalne strukture lahko določimo magnetni moment osnovne celice maghemita. Magnetni moment je odvisen od števila nesparjenih elektronov v d orbitalah in giromagnetnega razmerja, ki je razmerje med spinskim in

orbitalnim magnetnim momentom. Vrednost magnetnega momenta za Fe (III) s petimi nesparjenimi elektroni znaša 5,9 Bohr-ovih magnetonov [12]. V osnovni celici maghemita je na oktaedrični podmreži 13 1/3 (Fe^{3+}) kationov in 8 (Fe^{3+}) kationov na tetraedrični, kjer se magnetni momenti atomov v naprotno usmerjenih podmrežah odštejejo [13].



Slika 4: *Struktura kubičnega ferita* [14].

1.3 Sinteza nanodelcev

Spinelnata ferita, magnetit in maghemit, sta najpogosteje raziskovana tipa magnetnih nanodelcev za potencialno uporabo v biomedicini. Za njuno relativno enostavno pripravo obstaja veliko različnih metod. Magnetne nanodelce lahko pripravimo z mehanskim mletjem, s soobarjanjem, s soobarjanjem v mikroemulzijah, s hidrotermalno sintezo, s sonokemijsko metodo in številnimi drugimi metodami [15–28]. Vsaka izmed naštetih metod ima določene prednosti in slabosti, ki bodisi vplivajo na kakovost sintetiziranih nanodelcev ali na ekonomičnost proizvodnje. Metoda soobarjanja omogoča srednje dobro kontrolo velikosti nanodelcev in porazdelitve velikosti, vendar je zaradi svoje enostavnosti, cenenosti in možnosti proizvodnje večjih količin najpogosteje izbrana sintezna metoda. Za sintezo maghemitnih nanodelcev sem izbral metodo soobarjanja, ki jo v nadaljevanju podrobneje razložim.

Obarjanje je proces, pri katerem z dodajanjem reagenta pretvorimo dobro topno spojino v slabo topno, trdno snov. Gonilna sila procesa je prenasajenje prekursorja, ki nastane kot posledica kemične reakcije [25]. Pri soobarjanju gre za hkratno obarjanje vsaj dveh različnih kationov, ki sta lahko različna elementa ali ista elementa z različnim oksidacijskim stanjem (Fe^{2+} , Fe^{3+}). Oksidne delce sintetiziramo navadno z obarjanjem netopnih hidroksidov, ki se nato v seriji reakcij pretvorijo v oksidni delec. Z izborom primernih reakcijskih pogojev lahko spreminjamo velikost, morfologijo in strukturo delcev. Najpomembnejši vpliv med obarjanjem ima vrednost pH in razmerje med Fe (II) in Fe (III) ioni. Pri vrednosti pH ~ 3 nastajajo večjedrni kompleksi Fe (III), ki se obarjajo kot hidroksid $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Pri vrednosti pH ~ 6 se oborijo tudi ioni Fe (II). Razmerje med Fe (II) in Fe (III) mora biti vsaj 0,2. Čeprav je proces soobarjanja precej kompleksen, ga lahko opišemo v nekaj stopnjah (Slika 5).

1.3.1 Nastanek nevtralnega prekursorja

V področju I na sliki 5 se v vodnih raztopinah tvori nevtralni prekursor $[M(OH)_z(OH_2)_{N-z}]^0$. Za nastanek prekursorja so potrebni hidroksilni ioni. Prekursor lahko nastane z dodajanjem hidroksida h kationskemu kompleksu, termično hidrolizo ali s termičnim razpadom nestabilnih molekul (sečnina).

1.3.2 Nukleacija

V področju II na sliki 5 nastajajo zametki trdne snovi, ki jih imenujemo embrii. Ti so nestabilni in se sproti raztapljajo. Embrii nastanejo s kondenzacijo nevtralnega prekursorja $[M(OH)_z(OH_2)_{N-z}]^0$. Hitrost kondenzacije prekursorja je odvisna od koncentracije prekursorja in je pri nizkih koncentracijah nizka. Stopnja prenasíčenja, ki narekuje obarjanje, je razmerje med koncentracijo prekursorja in topnostjo trdne snovi C_S . Hitrost nastajanja prekursorja je močno odvisna od reakcijskih pogojev [25].

Nukleacija je proces nastanka trdne snovi s kondenzacijo nevtralnega prekursorja, kjer embrii preidejo v nukleuse oziroma jedra. Pri jedrih je verjetnost za obstanek trdne snovi večja kot je verjetnost, da se raztopijo. V tej točki je presežena koncentracija C_{min} . Nukleacija je na sliki 5 označena s področjem III. Gonilna sila obarjanja je prenasíčenje. V ozkem koncentracijskem področju, kjer je koncentracija prekursorja višja od C_{min} , je nukleacija izjemno hitra in jedra nastanejo v celotnem volumnu raztopine. Če je hitrost nukleacije precej večja od hitrosti nastajanja prekursorja, se koncentracija prekursorja hitro zmanjša in hitrost kondenzacije močno upočasni [25].

1.3.3 Rast delcev

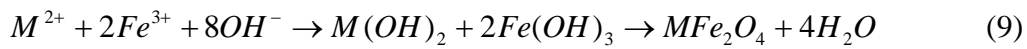
Mehanizem rasti je enak mehanizmu nukleacije, saj gre tudi pri rasti za kemijske reakcije oksolacije. Na sliki 5 je rast označena s področjema III in IV. V področju III jedra tako nastajajo kot tudi rastejo in se faza rasti prekriva z nukleacijo. Ko koncentracija prekursorja pade pod C_{min} ne nastajajo nova jedra (področje IV na sliki 5). Energetsko je ugodneje, da se material nalaga na že nastale površine, kot da tvori nove površine – nova jedra. Razlog je v zmanjšanju površinske napetosti, saj je površinska napetost na meji med dvema trdnima snovema manjša od površinske napetosti na meji med trdno snovjo in tekočino. Prekursor v fazi rasti kondenzira na površinah trdnih nukleusov, kar povzroči rast delca. Rast imenujemo proces večanja jeder, dokler ne dosežejo neke velikosti in jih imenujemo primarni delci. Število in velikost nastalih primarnih delcev je povezana z relativno hitrostjo nukleacije in rasti. Koncentracija prekursorja je še vedno višja od koncentracije C_S , vendar prenizka za nastanek novih jeder. Velikost končnih delcev je odvisna od števila nastalih jeder in količine snovi, ki je na voljo. Zaželjeno je, da je faza rasti ločena od nukleacije, saj tako dobimo monodisperzne delce. Pogoj pri tem je, da koncentracija prekursorja takoj po nastanku jeder pade pod C_{min} in med procesom rasti ne preseže vrednosti C_{min} [25].

1.3.4 Zorenje

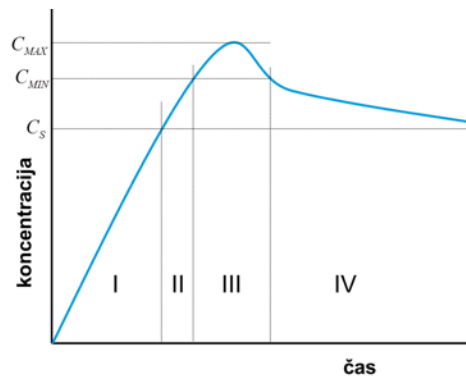
Ko se koncentracija prekursorja zniža na C_S , se proces nastajanja trdne faze konča. Primarni delci, ki so nastali z rastjo jeder, niso termodinamsko stabilni. To pomeni, da delci še niso končnih velikosti, kristalne strukture in morfologije. V procesu zorenja delci preidejo v termodinamsko stabilno stanje, kar lahko traja od nekaj ur do nekaj mesecev. V procesu zorenja delci prekrizirajo v termodinamsko stabilno modifikacijo ali pa le spremenijo morfologijo. Za delce, ki so manjši od neke kritične velikosti, raztopina zanje

ni nasičena in se zato raztapljajo. Za večje delce je raztopina prenasadena in zato rastejo na račun manjših delcev. To imenujemo sekundarna rast ali Ostwald-ova pogrobitev. Teoretično bi se velikost delcev le povečala, saj bi se vsi manjši delci porabili za rast večjih delcev. V praksi, kjer prihaja do agregacije in koalescence, se takšno ravnotežno stanje ne doseže, saj rast večjih delcev povzroči zmanjšanje hitrosti raztapljanja manjših delcev. Stanje, kjer so ob večjih delcih prisotni tudi manjši delci imenujemo psevdoravnotežno stanje.

Reakcijo sinteze spinelnih feritov s soobarjanjem lahko zapišemo z naslednjo enačbo:



Pri vrednosti pH ~ 6 sta oborjena Fe (II) in Fe (III) v obliki kompleksa $Fe^{II}Fe^{III}O_x(OH)_{2(3-x)} \cdot xH_2O$ iz katerega se pri povišani vrednosti pH obori magnetit. Magnetit je na zraku nestabilen, saj se Fe (II) oksidira in se nato kristalna struktura pretransformira v maghemit [12].



Slika 5: Koncentracija topnega prekursorja v odvisnosti od časa. Prerisano iz [25].

1.4 Koloidi

V splošnem je koloidni sistem definiran kot disperzija majhnih, dobro porazdeljenih, delcev v nosilnem mediju. Arbitražno določena velikost koloidnih delcev je med 1 nm in 1 μ m [29].

Problem aglomeracije in priprava stabilnih koloidnih suspenzij je izjemnega pomena že za samo pripravo primerno prirejenih nanodelcev v suspenzijah, kakor tudi za njihovo uporabo v kompleksnih bioloških sistemih v biomedicini.

Energija delcev v gravitacijskem polju je odvisna od velikosti delcev ter razlike v gostotah med delci in medijem. Majhni delci se praktično ne posedejo, ker je premik zaradi gravitacijske sile manjši od premika zaradi termične fluktuacije ($k_B T$). V tabeli 1 so prikazane hitrosti posedanja in Brown-ov premik delcev v 1 uri za različne velikosti delcev v vodi. Hitrosti posedanja so izračunane po Stokes-ovem zakonu za nenabite kroglice z gostoto 2 g/cm³ pri 20 °C. Delci ostanejo dispergirani, če je njihova termična energija dovolj velika, da zagotovi zadovoljivo mešanje suspenzije. Termodinamika določa, kakšno bo končno stanje stabilnosti koloidne suspenzije v ravnotežju, medtem ko kinetika določa ali se bo to stanje doseglo oziroma kdaj se bo doseglo [29]. Brown-ovo gibanje omogoča interakcije med delci, saj se ti neprestano gibljejo. Majhni delci imajo zaradi velike specifične površine močno težnjo po združevanju, kar lahko vodi v nastanek aglomeratov, ki so dovolj veliki, da se posedejo. Stabilnost koloidne suspenzije je torej v tesni zvezi z interakcijami med delci.

Tabela 1: *Hitrost posedanja in Brown-ovo gibanje nenabitih delcev z gostoto 2 g/cm³ različnih velikosti pri 20 °C [30].*

Polmer delca (nm)	Brown-ov premik v 1 uri	Hitrost posedanja
1	1,23 mm	8 nm/h
10	390 μm	800 nm/h
100	123 μm	80 μm/h
1000	39 μm	8 mm/h

Najpomembnejše sile, ki določajo stabilnost koloidnih suspenzij so privlačne van der Waals-ove sile, elektrostatske sile in sterične sile. Termična energija navadno ni dovolj velika, da bi nasprotovala van der Waals-ovemu prispevku, zato je potrebno preprečiti aglomeracijo z odbojnimi elektrostatskimi silami. Med vsemi delci so prisotne privlačne van der Waals-ove sile, ki jim nasprotujejo odbojne elektrostatske in sterične sile [31].

V glavnem ločimo dva načina stabilizacije koloidne suspenzije delcev v vodnih medijih, in sicer elektrostatska in/ali sterična stabilizacija. Elektrostatska stabilizacija je rezultat delovanja odbojnih sil električne dvojne plasti oziroma električnega dvosloja (difuzni sloj) in jo opisuje teorija DLVO. Za pripravo koloidno stabilnih suspenzij morajo odbojne sile električnega dvosloja premagati privlačne van der Waals-ove sile. Teorijo DLVO so razvili Derjaguin in Landau (1941) [32] ter Verwey in Overbeek (1948) [33], po katerih tudi nosi ime.

Jakost van der Waals-ovih sil lahko zapišemo z naslednjo enačbo, ki velja za dva enaka delca na razdalji D [34]:

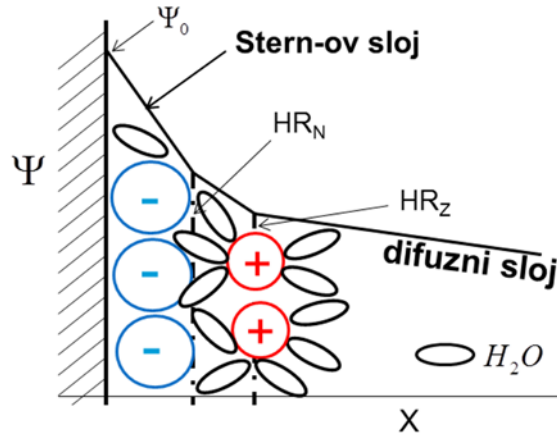
$$F = Aa/12D^2 \quad (10)$$

a polmer delcev
 A Hamaker-jeva konstanta
 D razdalja med delci

Energijo privlačne interakcije lahko izračunamo z enačbo 11. Izračunana Hamaker-jeva konstanta delcev magnetita v vodi znaša 4×10^{-20} J [35].

$$V_A = -Aa/12D \quad (11)$$

Model električnega dvojnega sloja je razvil Stern z upoštevanjem Helmholtz-ovega in Gouy-Chapman-ovega modela [36]. V splošnem koloidni delci izkazujejo elektrostatski naboj v disperznem mediju. Površinski naboj na delcih ima dve pomembni vlogi, in sicer omogoča odboj med delci in pritegne ione iz bližine k površini delca. Na površinah delcev je naboj lahko posledica nabitih skupin, ki so del strukture delca ali pa so posledica vezanih ionizirajočih skupin. Na površinah sintetiziranih oksidnih delcev v vodi so navadno $-OH$ skupine, ki so v kislem protonirane, v alkalnem mediju pa deprotonirane. Vrednost pH, kjer je koncentracija protoniranih in deprotoniranih karboksilnih skupin enaka imenujemo točka ničelnega naboja ali izoelektrična točka. Pri tej vrednosti pH je neto naboj enak nič [12]. Nasprotno nabiti ioni tvorijo električni dvosloj okoli vsakega koloidnega delca. Shematska sestava difuznega sloja je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Shematski prikaz difuznega dvojnega sloja. Prirejeno iz [37].

Sloj ionov ob površini delca je precej močno elektrostatsko »adsorbiran« in ga imenujemo Sternov sloj, medtem ko imenujemo zunanjo plast ionov difuzni sloj. Zunanjo površino Stern-ovega sloja imenujemo notranja Helmholz-ova površina (HR_N). Po sredini sloja nasprotno nabitih ionov pa se razteza zunanje Helmholz-ova površina (HR_Z). Potencial med zunanjo Helmholz-ovo ravnino in topilom imenujemo zeta potencial ζ . To je količina, ki jo določimo iz eksperimentalnih vrednosti elektroforetske mobilnosti koloidov v suspenzijah [37] in je v tesni zvezi z jakostjo naboja na površini delca.

$$\zeta \approx 4\pi\eta(v/E)/\varepsilon \quad (12)$$

η viskoznost medija
 v/E elektroforetska mobilnost
 ε dielektrična konstanta

Porazdelitev ionov je pogojena z velikostjo ionov in molekul ter z njihovimi interakcijami. Debelina difuznega dvosloja določa razdaljo, na katero se lahko dva delca približata preden »začitita« odbojne sile. Inverzno debelino difuznega dvosloja imenujemo »Debye-eva dolžina«. Vrednost električnega potenciala za okrogle delce s polmerom a na razdalji r od središča krogle lahko zapišemo z enačbo 13 [38].

$$\Psi = \psi_0 \frac{a}{r} \exp[-\kappa(r-a)] \quad (13)$$

ψ_0 potencial na površini delca
 κ Debye-eva dolžina

V primeru dveh enako nabitih okroglih delcev z radijema a , ki sta ločena z razdaljo D (površina do površine), lahko izračunamo energijo odbojne interakcije z naslednjo enačbo:

$$V_R = 2\pi\varepsilon_0\varepsilon_r a^2 \Psi_0^2 \ln[1 + \exp(-\kappa D)] \quad (14)$$

ε_0 dielektrična konstanta vacuuma
 ε_r relativna dielektrična konstanta medija

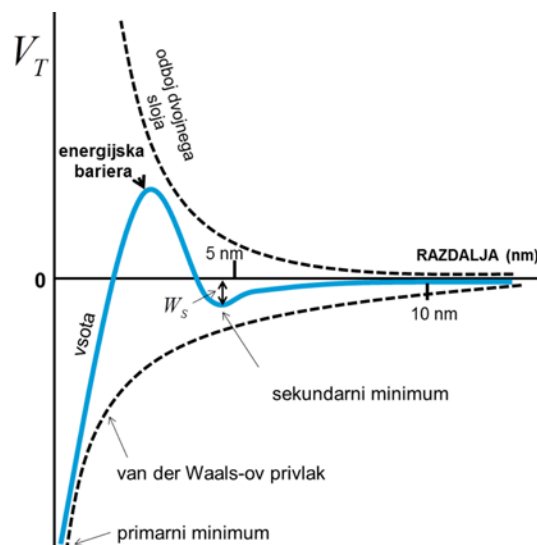
Enačba 14 velja za večje delce z majhnim prekrivanjem difuznega dvosloja ($\kappa a \ll 1$). Za majhne delce in ($\kappa a \gg 1$) je energija interakcije podana z naslednjo enačbo [38]:

$$V_R = 2\pi\varepsilon_0\varepsilon_r a^2 \Psi_0^2 \exp(-\kappa D) \quad (15)$$

Po teoriji DLVO je celokupna energija interakcije V_T enaka vsoti energij pozitivnih odbojnih V_R in negativnih privlačnih V_A interakcij, s čimer je določena stabilnost koloidnih delcev.

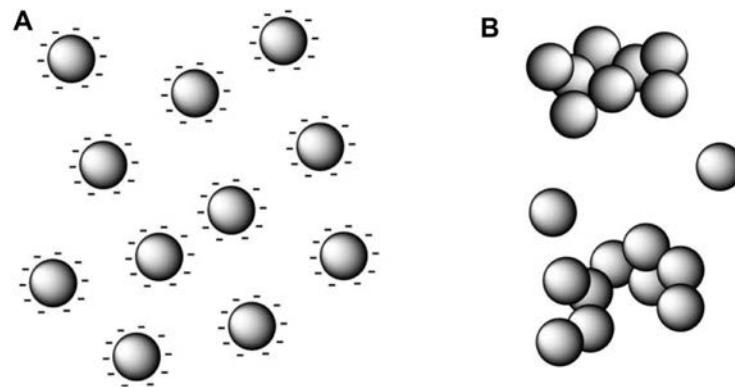
$$V_T = V_A + V_R \quad (16)$$

Energija odboja narašča eksponentno z zmanjševanjem razdalje med dvema delcema in je odvisna od vrednosti pH in ionske jakosti medija. Privlačne sile med delci so neodvisne od medija in padajo s približevanjem delcev, kot je prikazano na sliki 7.



Slika 7: Celokupna energija v odvisnosti od razdalje med delcema. Prerisano iz [35].

Če je energija privlačnih interakcij večja od energije odbojnih interakcij, potem je tak sistem koloidno nestabilen in vodi k aglomeraciji delcev. Delci se v takšnem primeru zelo približajo, zato ima krivulja V_T minimum na kratkih razdaljah med delci. Ta minimum imenujemo primarni minimum. V takšnem stanju so delci aglomerirani ireverzibilno. V primeru močno nabitih površin delcev in zmernih ionskih jakostih medija obstaja majhen minimum energije V_T , ki ga imenujemo sekundarni minimum. Tak sistem lahko opišemo kot šibko flokuliran, kar pomeni, da lahko takšne flokule koloidnih delcev ponovno redispergiramo. Energija bariere, kjer je maksimum V_T okoli $15 - 25 kT$, kar pripada absolutni vrednosti zeta potenciala okoli 30 mV, je ob zmerni ionski jakosti navadno zadostna, da je suspenzija koloidno stabilna [38]. Takšen koloid je kinetično stabilen. Višino energijske bariere lahko kontroliramo s spreminjanjem ionske moči (Debye-evo dolžino), z velikostjo delca in vrednostjo pH. Z večanjem delca naraščajo odbojne sile med delci (energetska bariera se zviša). Povečevanje ionske jakosti (energetska bariera se zniža) favorizira aglomeracijo s tem, ko dovoljuje približanje delcev na razdaljo, kjer prevladajo privlačne van der Waals-ove sile. Višja kot je vrednost Hamakerjeve konstante delca, večja mora biti vrednost zeta potenciala za zagotavljanje stabilnosti [39]. Slika 8 prikazuje majhne delce v vodnem mediju, ki se med seboj odbijajo zaradi elektrostatskih odbojnih sil (A) in aglomerate (B), kjer so prevladale privlačne interakcije.

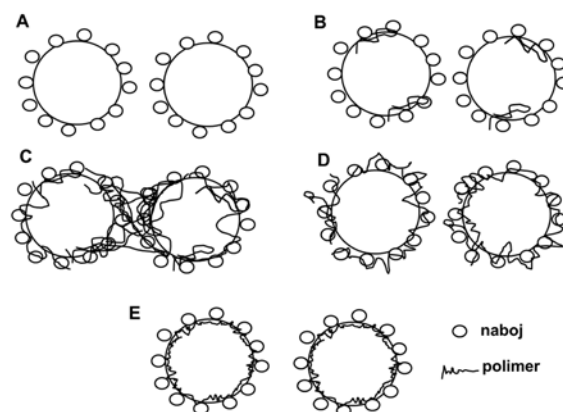


Slika 8: *Stabilna koloidna suspenzija majhnih delcev (A) in prikaz aglomeriranih nanodelcev (B) [40].*

Drugi mehanizem zagotavljanja koloidne stabilnosti imenujemo sterična stabilizacija, kjer na stabilnost vplivamo s primerno kemijo površin [36]. Ta način stabilizacije je pomemben v nepolarnih medijih in v vodnih medijih z visoko ionsko jakostjo (fiziološki pogoji) [41].

Za zagotavljanje koloidne stabilnosti hidrofobnih magnetnih tekočin je potrebno na površine delcev vezati molekule z dolgimi alifatskimi verigami. To so navadno maščobne kisline, ki se s svojo polarno $-\text{COO}^-$ skupino vežejo na površino oksidnih delcev, medtem ko hidrofojni rep sterično ovira kontakt z drugim delcem. Medij mora molekule na površini delcev dobro solvativirati, saj v nasprotnem primeru prevladajo privlačne sile med molekulami na delcih (izrinjanje topila in fazna separacija), kar vodi v aglomeracijo. Interakcije topilo-molekula na površini delca morajo biti torej močnejše od interakcij med molekulami na površinah delcev.

Sterično stabilizacijo vodnih suspenzij delcev dosežemo z adsorbcijo velikih hidrofilnih molekul, kot so razvejani hidrofilni polimeri. Ti polimeri lahko bodisi stabilizirajo ali destabilizirajo koloidno suspenzijo. Slika 9 prikazuje primere različno prevlečenih koloidnih delcev s polimeri [42].



Slika 9: *Shematski prikaz delcev z adsorbiranimi polimeri. Prerisano iz [42].*

Pri neprevlečenih delcih je odboj ustvarjen z difuznim dvoslojem (slika 9 (A)). Pri majhnem dodatku polimera odbojno interakcijo še vedno zagotavlja elektrostatski odboj (slika 9 (B)). Ko so delci delno prekriti s polimernimi molekulami lahko tak adsorbiran polimer tvori »makromolekularni most« (angl. macromolecular bridge) z hkratno adsorbcijo na dva ali več delcev. To lastnost imenujemo »mostiščna flokulacija« (angl. bridging flocculation) (slika 9 (C)). Šele dodatek presežka polimera popolnoma zasede

površine delcev, kar ustvarja sterični odboj med delci (slika 9 (D)). Dobro koloidno stabilnost lahko dosežemo z dodajanjem polimerov z nižjimi molskimi masami. V tem primeru je debelina adsorbiranega polimera manjša od Debye-eve dolžine. To pomeni odbojne sile na daljše razdalje zaradi elektrostatskega prispevka funkcionalnih skupin na polimeru in sterične odbojne interakcije na kratkih razdaljah med delci (slika 9 (E)). Polimerne molekule, kot so polielektroliti, zagotavljajo tako elektrostatsko kot sterično stabilizacijo koloidnih suspenzij, medtem ko nenabiti polimeri samo sterično stabilizacijo.

Zagotavljanje stabilnosti koloidne suspenzije je ključno pri pripravi magnetnih tekočin za uporabo v biomedicini. Stabilnost suspenzije pa lahko dosežemo s primerno obdelavo površin nanodelcev, funkcionalizacijo.

1.5 Biokompatibilne prevleke nanodelcev

Magnetne tekočine so po definiciji stabilne koloidne suspenzije dovolj majhnih fero ali ferimagnetnih nanodelcev [43]. V vodnih medijih lahko nanodelce elektrostatsko in/ali sterično stabiliziramo z uporabo najrazličnejših prevlek, ki poleg izboljšane koloidne stabilnosti zagotovijo tudi primerne funkcionalne skupine. Le-te omogočajo nadaljno vezavo različnih molekul. Massart je prvi, ki je uspešno pripravil magnetno tekočino tako v kislem kot v alkalnem mediju [44].

Prevleke na magnetnih nanodelcih lahko razdelimo na dve skupini. Prva skupina so organske prevleke, ki so večinoma hidrofilni sintetizirani polimeri (polietilen glikol, polivinil alkohol, polietilen imin, polimetakrilat, polimlečna–ko–glikolna kislina in ostali navadno ko-polimeri) [45–51] ali naravno pridobljeni polimeri (dekstran, hitosan, alginat in drugi) [52, 53]. Pod organske prevleke lahko razvrstimo tudi majhne organske molekule, ki se na eni strani vežejo na površino oksidnih nanodelcev preko specifičnih interakcij (kateholi –primer je dopamin) in hkrati ponujajo možnost nadaljne vezave preko izstopajočih prostih funkcionalnih skupin [54]. Omenim naj nekaj komercialnih izdelkov na področju biomedicine, ki temeljijo na superparamagnetnih nanodelcih železovih oksidov (SPION). To so Feridex[®] nanodelci (AMAG Pharmaceuticals), ki so prevlečeni z dekstranom in odobreni s strani ameriške agencije za zdravila (FDA) za uporabo v humani medicini pri slikanju z magnetno resonanco (MR). Combidex[®] nanodelci istega podjetja imajo prav tako za osnovo SPION, vendar so prevlečeni s krajšimi molekulami dekstrana in izkazujejo daljši zadrževalni čas v telesu od nanodelcev Feridex[®]. Nanodelci Feridex[®] se uporabljajo pri označevanju jeter in ledvic, medtem ko so nanodelci Combidex[®] v kliničnih testiranjih za uporabo pri slikanju bezgavk. Precej podoben izdelek (Resovist[®]), ki temelji na nanodelcih SPION, trži podjetje AG Shering. V tem primeru so nanodelci prevlečeni s karboksidedkstranom in jih uporabljajo kot kontrastno sredstvo pri specifičnem slikanju jeter z MR [55]. Drugo skupino predstavljajo anorganske prevleke, kot so prevleka z ogljikom, z zlatom, z amorfnim silicijevim dioksidom in druge [56–61]. Prevleke iz amorfne plasti silicijevega oksida s površinskimi silanolnimi -OH skupinami bom v nadaljevanju imenoval prevleke iz silike. Podjetje AG Magforce je uspešno zaključilo drugo klinično fazo zdravljenja (hipertermija) možganskih tumorjev s produktom NanoTherm[®], ki temelji na nanodelcih SPION prevlečenih s plastjo aminosilanskih molekul, ki se vežejo na površino nanodelcev podobno kot silika [62].

Organske prevleke so navadno adsorbirane na površino sintetiziranih nanodelcev, kar pomeni relativno šibko interakcijo med atomi površine nanodelca in polimernimi molekulami. Pri nadaljnjih reakcijah vezave s funkcionalnimi molekulami se lahko zgodi, da pride do razgradnje organskih prevlek, še posebej, če reakcije izvajamo pod ostrimi pogoji v organskih topilih [55]. Prednost organskih prevlek pred anorganskimi je v tem, da organska prevleka navadno vsebuje visoko koncentracijo bodisi amino ali karboksilnih

skupin, preko katerih lahko neposredno kovalentno vežemo biološko zanimive molekule [63].

Anorganske prevleke so navadno zelo rigidne strukture, ki so močno vezane z atomi na površini nanodelca in med atomi v svoji strukturi. Površine anorganskih prevlek lahko tvorijo močne specifične interakcije s specifičnimi ligandi kot je na primer molekula s prosto –SH skupino in površina zlata (interakcija Au in –SH skupina) [61] ali pa omogočijo uvedbo različnih funkcionalnih skupin v visokih koncentracijah preko reakcije z alkoksi silani v primeru prevleke s siliko.

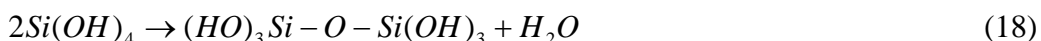
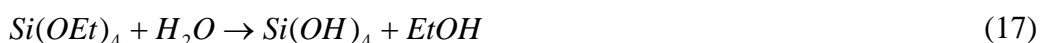
Tvorba močnih vezi in možnost uvedbe različnih funkcionalnih skupin v visokih koncentracijah na površino nanodelcev sta bistveni lastnosti, ki dajeta prednost prevleki s siliko pred ostalimi prevlekami. Silika velja za biokompatibilen material [55]. Magnetne lastnosti magnetnih nanodelcev prevlečenih s siliko se z debelino prevleke hitro slabšajo, zato je željeno sintetizirati čim tanjše, neprekinjene in homogeno debele prevleke silike. V literaturi velja sinteza takšne prevleke za raziskovalni izziv [64, 65].

1.5.1 Prevlečenje nanodelcev s siliko

Sintetizirani magnetni nanodelci izkazujejo veliko težnjo po aglomeraciji, saj imajo zaradi svoje velikosti (okoli 10 nm) veliko površinsko energijo, ki poleg ostalih privlačnih interakcij negativno vpliva na stabilnost suspenzije [55]. Prevleka silike zagotovi predvsem elektrostatsko stabilizacijo koloidne suspenzije in hkrati ponuja dobre možnosti za nadaljno kovalentno vezavo različnih molekul.

Silika je v literaturi pogosto opisana kot primeren material za prevleko nanodelcev [66–74]. Tako prevlečeni nanodelci imajo visoko koncentracijo aktivnih silanolnih skupin na svoji površini. Površinske silanolne skupine omogočajo nadaljno kovalentno vezavo silanskih molekul, ki na površine nanodelcev uvedejo za biokonjugacijo ugodne funkcionalne skupine.

Za pripravo prevlek iz silike uporabljamo modificirano obliko Stöber-jeve metode, ki temelji na sol-gel procesu [75]. Osnovni proces vključuje hidrolizo tetraetoksi silana (TEOS-a) in nukleacijo silike. Dvostopenjski proces je opisan z naslednjima enačbama [76].

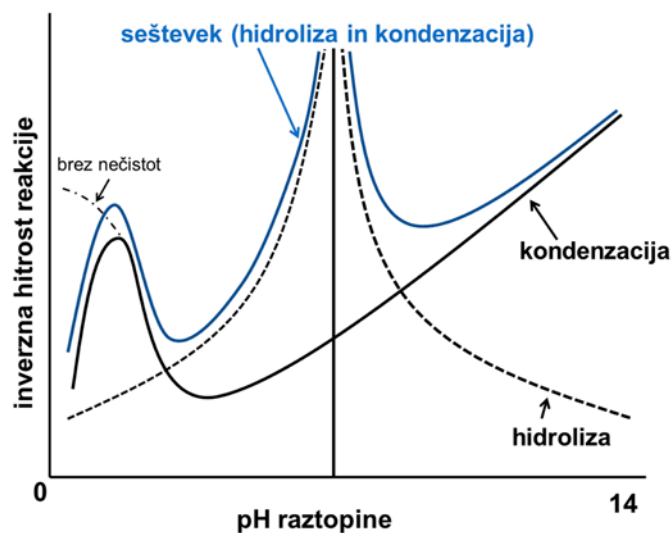


Etoksi skupina molekule TEOS hidrolizira, pri čemer nastaja etanol. Hidroksilne skupine na atomu Si (silicijeva kislina – Si(OH)₄) nato kondenzirajo in tvorijo siloksansko (Si-O-Si) vez, ki nadalje polimerizira in tvori siliko.

Za uspešno sintezo moramo izpolniti dva pogoja. Prvi je heterogena nukleacija silike na površinah nanodelcev in nehomogena nukleacija v obliki nanodelcev silike. Drugi pogoj se nanaša na stabilnost koloidne suspenzije med samo reakcijo prevlečenja. Zagotoviti moramo dobro stabilnost suspenzije, kar pomeni odboj med nanodelci in posledično prevlečenje posameznih nanodelcev in ne njihovih aglomeratov. Ti dve zahtevi sta bistveni spremembi v klasični Stöber-jevi metodi priprave nanodelcev silike [70].

Prvi pogoj, heterogeno nukleacijo silike na površinah magnetnih nanodelcev, dosežemo z uravnavanjem hitrosti hidrolize TEOS-a in kondenzacije Si(OH)₄, ki sta odvisni od koncentracije TEOS-a, razmerja etanol/voda, vrednosti pH, uporabljenega katalizatorja, koncentracije suspenzije nanodelcev [57, 76–78]. Na stabilnost koloidne suspenzije pa pomembno vpliva delež etanola, kjer manjši delež etanola zagotavlja boljšo

koloidno stabilnost suspenzije. Dodatek etanola je potreben za izboljšanje topnosti TEOS-a. Z izborom parametrov moramo reakcije hidrolize in kondenzacije upočasniti, saj je majhno prenasíčenje silicijeve kisline ključno za potek heterogene nukleacije na površinah nanodelcev [76]. Na sliki 10 sta prikazani krivulji inverzne hitrosti hidrolize in kondenzacije v odvisnosti od vrednosti pH.

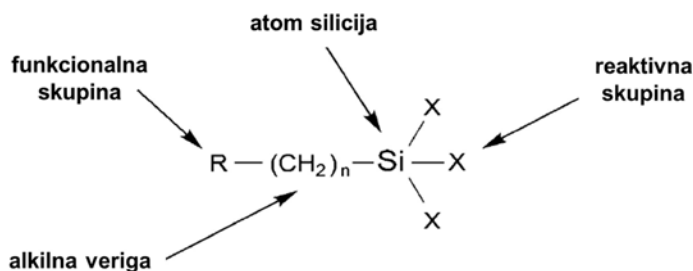


Slika 10: Inverzna hitrost reakcije hidrolize TEOS-a in kondenzacije $\text{Si}(\text{OH})_4$ v odvisnosti od vrednosti pH. Prerisano iz [57].

Hidroliza TEOS-a lahko poteče v kislem ali v alkalnem mediju, kjer koncentracija kisline ali baze pomembno vpliva na hitrost hidrolize. Reakcija hidrolize je v nevtralnem območju najpočasnejša in se s premikom vrednosti pH, bodisi v kislino ali v alkalno območje, naglo povečuje. Reakcija kondenzacije silicijeve kisline je najhitrejša pri vrednosti pH okoli 5. Hitrost reakcije kondenzacije silicijeve kisline postane pri vrednostih pH nad 9 počasnejša od hidrolize. Hitrost celokupne reakcije določa najpočasnejša reakcija.

1.6 Funkcionalizacija nanodelcev s silani

Silani so spojine, ki vsebujejo atom silicija, na katerega so vezane štiri skupine. Glede na položaj v periodnem sistemu in po zmožnosti tvorbe štirih vezi ga lahko primerjamo z ogljikom. Silicij je manj elektronegativen od ogljika in je podvržen reakcijam, ki so precej drugačne od reakcij pri tipičnih organskih spojinah. Silane, ki vsebujejo vsaj en ogljikov atom imenujemo organosilani. Najuporabnejši so tisti silani, ki vsebujejo funkcionalno organsko skupino in eno ali več reaktivnih silanskih skupin. Reaktivne silanske skupine so reaktivne z anorganskimi materiali in navadno nereaktivne z organskimi molekulami. Pomembna lastnost silanskih molekul je v zmožnosti uvedbe kovalentno vezanih organskih molekul (funkcionalnih skupin) na površine anorganskih delcev [79, 80]. Splošna strukturna formula silana je prikazana na sliki 11.

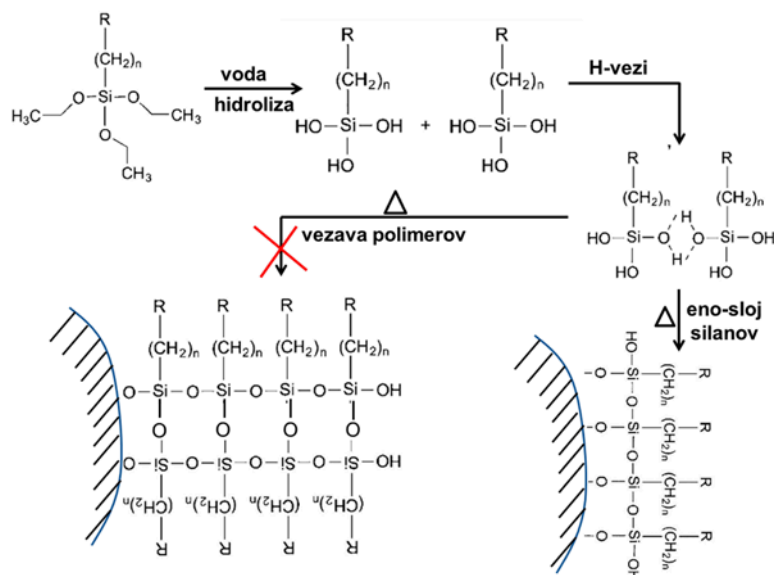


Slika 11: Splošna strukturna formula silana [40].

Najpogosteje uporabljeni silani so alkoksi silani, kjer skupina X predstavlja metoksi oziroma etoksi skupino. Podobno kot pri TEOS-u tudi pri alkoksi organosilanih poteče najprej hidroliza alkoksi skupine, kjer na atomu Si ostanejo reaktivne skupine $-OH$. To zelo reaktivno obliko silana imenujemo silanol in je podobno kot silicijeva kislina zelo reaktiven v reakciji z $-OH$ skupinami na površinah anorganskih nanodelcev.

Možna reakcija, ki se zgodi v suspenziji po hidrolizi, je tvorba H-vezi in kondenzacija silanolnih molekul med seboj ter tvorba polimernega matriksa preko siloksanjskih $-Si-O-Si-$ vezi. Ta rastoča mreža povezanih silanolov tvori skupke, podobne nanodelcem silike, ki lahko nato kondenzirajo z $-OH$ skupinami na površini nanodelcev. Ta reakcija vodi v nastanek precej nedefiniranih produktov in je zato neželjena. Alternativa tej reakciji je heterogena reakcija vezave silanolov na površine delcev, kjer se silanoli sicer najprej povežejo preko H-vezi, nato tvorijo H-vezi s površinami nanodelcev, in končno s površinskimi $-OH$ skupinami kondenzirajo ter tako tvorijo kovalentne siloksanjske vezi s površinami delcev. Za tvorbo kovalentnih siloksanjskih vezi je reakcijo potrebno pogosto izvajati pri povišani temperaturi. Silanske molekule s tremi alkoksi skupinami pogosto ne tvorijo enojne plasti molekul na površinah nanodelcev, ampak debelejši neenakomeren plašč polimera zgrajenega iz skupka med seboj povezanih silanolnih molekul. Debelina plasti molekul silana je odvisna od koncentracije uporabljenega silana, tipa silana in razmerja voda/etanol v suspenziji. Podobno kot je pri sintezi prevleke iz silike potrebno kontrolirati kinetiko reakcij hidrolize in kondenzacije je tudi pri vezavah silanov na površino nanodelcev potrebno kontrolirati hitrost hidrolize alkoksi skupin silana in hitrost kondenzacije silanolnih $-OH$ skupin [40].

Pri vezavah silanov na površine nanodelcev gre za kompeticijo med reakcijo kondenzacije samih molekul silanola med seboj in med heterogeno reakcijo vezave silanolov na površine nanodelcev v enem sloju. Heterogena reakcija vezave silanolov na površine nanodelcev je željena in je favorizirana z nizkimi koncentracijami molekul silana v suspenziji. Poleg tega je preferenčna uporaba silanov z dvema alkoksi skupinama, saj le-ti izkazujejo manjšo možnost tvorbe homogenih skupkov v primerjavi s trialkoksi silani [81]. Obe kompetitivni reakciji sta shematsko prikazani na sliki 12.



Slika 12: Shematski prikaz vezave silanov na površino anorganskih nanodelcev s površinskimi -OH skupinami. Prirejeno iz [40].

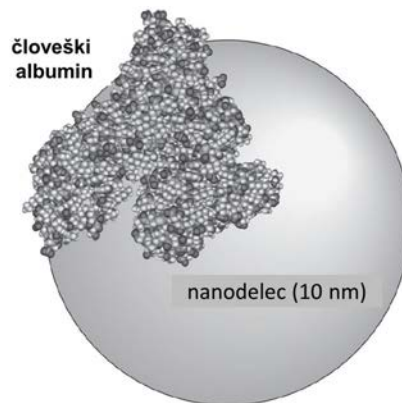
Obstajajo različne tehnike vezave silanskih molekul na površine nanodelcev. Reakcije lahko potečejo v vodnih suspenzijah, v organskih topilih, v organskih suspenzijah z majhno količino vode in celo v parni fazi. Potečejo lahko pri sobni temperaturi ali povišanih temperaturah [40]. Molekule silana lahko vežemo tako na površine oksidnih nanodelcev kot tudi na nanodelce prevlečene s prevleko silike. V obeh primerih gre za enak mehanizem reakcij, le da je učinkovitost vezave silanov na površine s siliko prevlečenih nanodelcev bistveno boljša [82]. Prevleka silike ima namreč precej večjo gostoto -OH skupin, v primerjavi z neprevlečenim oksidnim nanodelcem, ki so na voljo za vezavo z molekulami silanov. Bifunkcionalna narava silanov omogoča široko paleto možnosti nadaljnjih reakcij funkcionaliziranih nanodelcev z biološko zanimivimi (makro)molekulami preko različnih vezi in interakcij. Na trgu obstaja velika množica različnih silanov, ki imajo na svojem organskem delu vezane različne funkcionalne skupine na voljo za nadaljno kovalentno vezavo z biološko zanimivimi molekulami [40].

1.7 Biokonjugacije nanodelcev

Za uporabo magnetnih nanodelcev v biomedicini je pogosto potrebno na površine funkcionaliziranih nanodelcev vezati specifične biološke molekule, afinitetne ligande. Vezavo biološko zanimivih molekul na površine nanodelcev pogosto imenujejo (bio)konjugacija in produkte takšnih vezav, (bio)konjugati. Predpona bio- se uporablja takrat, ko manipuliramo z biološkimi makromolekulami.

Afinitetni ligandi so molekule, pogosto makromolekule, ki prepoznajo in izkazujejo afiniteto do specifične tarčne (makro)molekule na površini ciljanih celic. Slika 13 prikazuje primerjavo velikosti 10 nm velikega nanodelca in makromolekulo človeškega albumina. Vezave afinitetnih ligandov na nanodelce omogočajo, da takšen biokonjugat prepozna in se veže s specifično biološko tarčo v kompleksni mešanici zelo podobnih (makro)molekul. V osnovi so reakcije biokonjugacije afinitetnih ligandov na nanodelce podobne reakcijam konjugacije molekul ali imobilizacije ligandov na nosilne površine ali kromatografske nosilce. Pri tem je pomembna razlika v zagotavljanju koloidne stabilnosti majhnih nanodelcev, kar pri konjugacijah na nosilnih površinah ni problematično. Vezava afinitetnih ligandov na magnetne nanodelce daje tako pripravljenim biokonjugatom edinstvene možnosti uporabe v biomedicini, ki jih bom podrobneje predstavil v poglavju

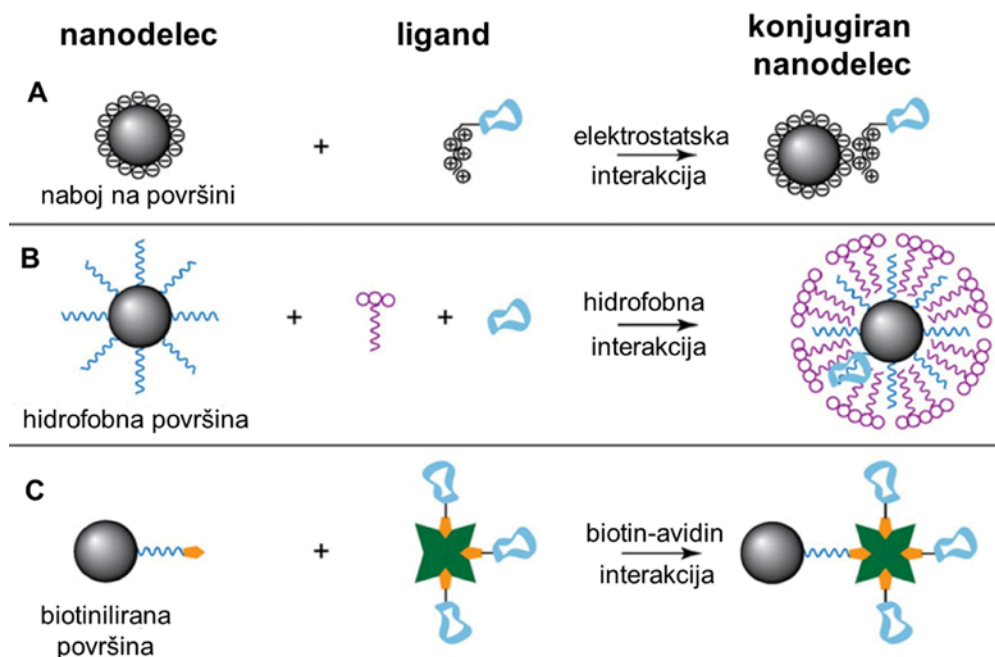
»1.8 Uporaba magnetnih nanodelcev v biomedicini«.



Slika 13: Primerjava velikosti med nanodelcem (10 nm) in človeškim albuminom (7 nm) [40].

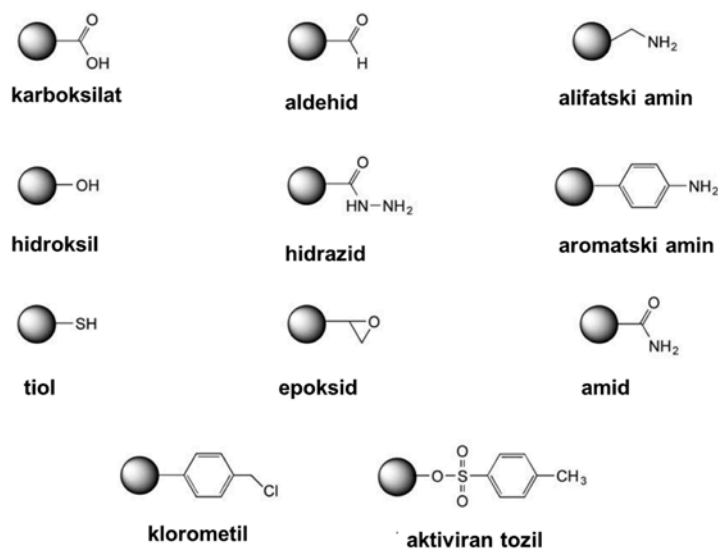
Interakcije med površinami nanodelcev ter biološko zanimivimi molekulami lahko v osnovi delimo v dve skupini.

V prvo skupino štejemo najpreprostejše in pogosto uporabljene metode pasivne adsorpcije, ki temeljijo na fizikalni interakciji. Takšen primer je vezava afinitetnih ligandov na nanodelce, ki pogosto temelji na elektrostatskih interakcijah med nasprotno nabitima nanodelcem in ligandom (slika 14 (A)). Na ta način lahko na površine nanodelcev adsorbiramo nabite makromolekule, kot so peptidi, beljakovine (encimi, protitelesa) in genski konstrukti (molekule DNK in RNK). Slabost preproste adsorpcije ligandov na nanodelce je v slabi kontroli orientacije vezanih ligandov. Na primer, pri vezavi protiteles na površine nanodelcev se lahko zgodi, da se protitelo adsorbira na površino nanodelca s svojo površino, ki je ključna za prepoznavanje. To pomeni izgubo sposobnosti prepoznavanja tarče. Naslednji primer fizikalnih interakcij je uporaben za transfer hidrofobnih nanodelcev v vodni medij, saj so hidrofobni nanodelci neuporabni v biomedicini (slika 14 (B)). V slednjem primeru uporabijo molekule surfaktanta, ki se s svojimi hidrofobnimi repi usmerijo na hidrofobno površino nanodelcev, medtem ko so polarne glave usmerjene proti hidrofilnem mediju. Ta tip interakcije omogoča vgradnjo hidrofobnih molekul (slabo topne zdravilne učinkovine) v maščobni dvosloj molekul na površini nanodelca. Če na polarni del molekule surfaktanta vežemo afinitetni ligand, potem lahko tak biokonjugat prepozna tarčne molekule. Zelo uporabna metoda, ki temelji na fizikalni interakciji, je reakcija med biotiniziranimi nanodelci in biotiniziranim ligandom (slika 14 (C)). Oba konjugata tekmujeta za štiri možna vezalna mesta na molekuli avidina, ki poveže nanodelec z ligandom. Interakcija med biotinom in avidinom velja za eno najmočnejših nekovalentnih interakcij.



Slika 14: Shematski prikaz biokonjugacij, ki temeljijo na fizikalnih interakcijah med nanodelcem in ligandom [63].

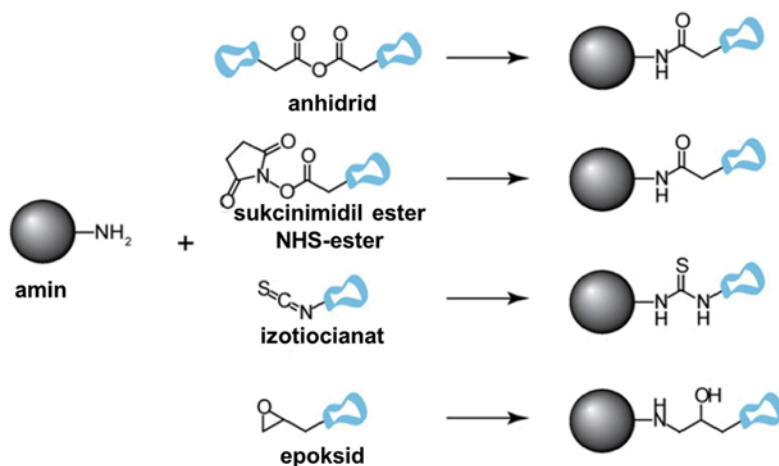
V drugo skupino spadajo reakcije, ki temeljijo na tvorbi kovalentnih vezi med funkcionaliziranim nanodelcem in molekulami liganda. Slika 15 prikazuje primere funkcionalnih skupin na površinah nanodelcev, ki se navadno uporabljajo za tvorbo kovalentnih vezi z afinitetnimi ligandi.



Slika 15: Shematski prikaz najuporabnejših funkcionalnih skupin na površinah nanodelcev, ki so ugodne pri konjugacijah [40].

Kovalentne reakcije med nanodelci in afinitetnimi ligandi lahko ločimo glede na prisotnost uporabe povezovalnih molekul (angl. crosslinkers). Neposredne konjugacije imenujemo reakcije, kadar na funkcionalizirane nanodelce neposredno vežemo aktivirane molekule liganda. V tem primeru uporaba povezovalnih molekul ni potrebna. Ta tip reakcij je uporaben, kadar so molekule liganda reaktivne in zlahka tvorijo kovalentne vezi s funkcionalnimi skupinami na površinah nanodelcev. Priprava reaktivnih ligandov lahko

predstavlja velik izziv, še posebej, če je potrebno aktivirati občutljive biološke makromolekule. Večinoma je ta tip primeren za majhne molekule ligandov. Shema na sliki 16 prikazuje neposredne konjugacije na amino funkcionalizirane nanodelce.



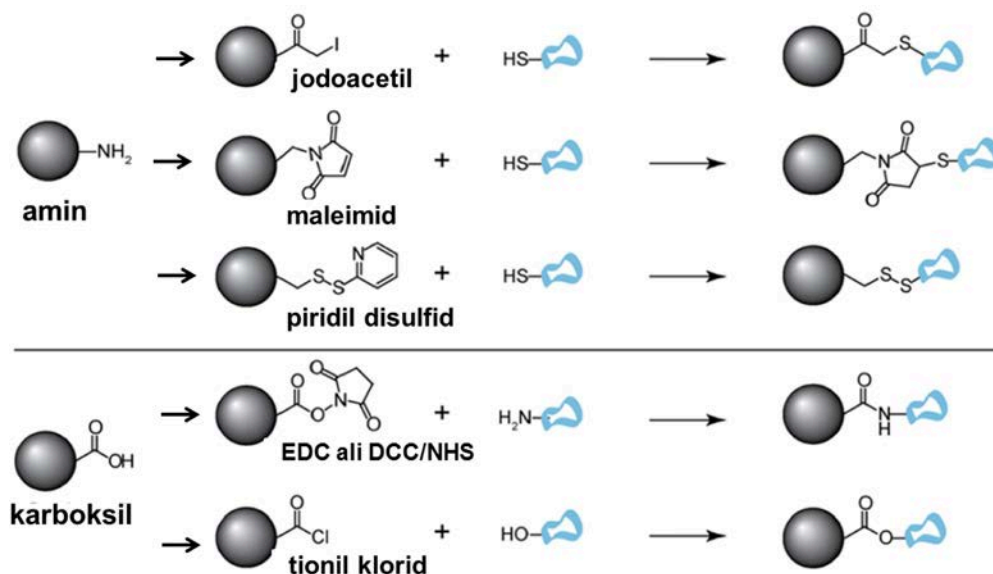
Slika 16: Shematski prikaz reakcij neposredne konjugacije aktiviranih ligandov na funkcionalizirane nanodelce [63].

»Click« kemija predstavlja relativno nov pristop neposrednih konjugacij. Gre za 1,3-dipolarno cikloadicijo (Huisgen-ova cikloadicija) med funkcionalno skupino azidom in alkinom, kjer nastane 5-členski triazolni obroč (slika 17). Reakcija je pogosto uporabljena v organski kemiji heterociklov. V zadnjem desetletju so ugotovili, da za reakcijo ni potrebna povišana temperatura (neugodno za biološke makromolekule), ampak da prisotnost majhne količine katalitičnih Cu^{1+} ionov kinetiko reakcije pospeši do 10^6 -krat [83]. Glavna prednost »click« reakcije pri biokonjugacijah je ta, da sta funkcionalni skupini nereaktivni in sprejemljivi za biološke sisteme. Ta lastnost bioortogonalnosti zagotavlja visoko selektivnost med funkcionalnima skupinama azidom in alkinom tudi v zelo kompleksnih bioloških sistemih. Reakcije »click« so hitre, učinkovite in potečejo v vodnem okolju pri nevtralnih vrednostih pH. Nastala vez (triazolni obroč) je povsem biokompatibilna, stabilna (stabilnejša od amidne vezi) in polarna. Ta tip vezave je zelo primeren pri biokonjugacijah, kjer je zahtevana primerna orientacija liganda (npr. makromolekule). Prisotnost Cu^{1+} ionov, če jih ni mogoče odstraniti, je lahko problematična z vidika nadaljne uporabe biokonjugata *in vivo* [63].



Slika 17: Shematski prikaz reakcije »click« [63].

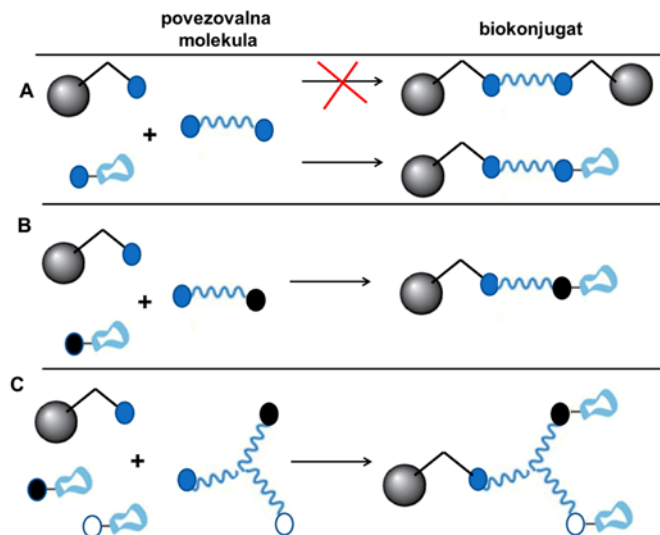
Posredne konjugacije so tiste reakcije, kjer na funkcionaliziran nanodelec vežemo najprej povezovalno molekulo in v naslednji stopnji še molekulo liganda. Shema na sliki 18 prikazuje posredne konjugacije na različno funkcionalizirane nanodelce.



Slika 18: Shematski prikaz reakcij posredne konjugacije ligandov na funkcionalizirane nanodelce [63].

Obstajajo različni tipi povezovalnih molekul, na podlagi česar lahko posredne konjugacije nadalje razvrščamo. Zaradi obsežnega števila različnih povezovalnih molekul znotraj posameznega tipa in omejitev obsega doktorske naloge, bom opisal le krovne značilnosti posameznih tipov povezovalnih molekul. Kadar povezovalne molekule le aktivirajo funkcionalne skupine na površini nanodelcev in ne služijo hkrati kot distančnik, lahko takšen tip posrednih konjugacij imenujemo konjugacije z brez-distančno povezovalno molekulo (angl. zero-length crosslinkers). Drugi tip povezovalnih molekul služi kot distančnik med nanodelcem ter ligandom in jih lahko imenujemo konjugacije z distančno povezovalno molekulo. Pri tem ločimo povezovalne molekule, ki so reaktivne z enim tipom (angl. homobifunctional crosslinker) (slika 19 (A)), dvema (angl. heterobifunctional crosslinker) (slika 19 (B)) ali trem (slika 19 (C)) različnim tipom funkcionalnih skupin (angl. trifunctional crosslinker).

Najbolj problematične so reakcije, kjer uporabljajo povezovalne molekule, ki povezujejo dve različni strukturi (nanodelec in ligand) z enakimi funkcionalnimi skupinami (slika 19 (A)). Takšna povezovalna molekula ni selektivna in lahko nekontrolirano povezuje samo ene strukture med seboj (zamreženje nanodelcev in aglomeracija).



Slika 19: Shematski prikaz posrednih reakcij med različnimi tipi distančnih povezovalnih molekul, ligandi in funkcionaliziranimi nanodelci.

Reakcije med nanodelci in biološkimi makromolekulami potekajo navadno v zelo omejenih reakcijskih pogojih (vodni mediji, vrednost pH med 5 in 10, prisotnost pufrov). Biološke makromolekule (protitelesa, encimi, DNK in druge) so namreč zelo občutljive na reakcijske pogoje, saj lahko zelo hitro izgubijo svojo funkcionalnost (sprememba konformacije, denaturacija beljakovin) in lahko postanejo trajno neuporabne. Majhne organske molekule so precej stabilnejše, zato dajejo več možnosti pri izboru reakcijskih pogojev in tipu konjugacije.

Pri reakcijah vezave manj občutljivih afinitetnih ligandov (npr. folna kislina), molekul fluorescentnih barvil, steričnih stabilizatorjev (polietilen glikol), majhnih organskih zdravilnih učinkovin in drugih biološko zanimivih majhnih organskih molekul na površine nanodelcev imamo na voljo še več možnosti pri izbiri reakcijskih pogojev in tipov reakcij.

1.8 Uporaba magnetnih nanodelcev v biomedicini

Magnetni nanodelci morajo poleg primerne velikosti in ozke porazdelitve velikosti imeti tudi primerno prirejeno površino, da so uporabni v biomedicini. S prilagajanjem površinskih lastnosti moramo zagotoviti primerno koloidno stabilnost suspenzije nanodelcev v kompleksnih sistemih (soli, serumske beljakovine), biokompatibilnost in biorazgradljivost. To so minimalni pogoji, ki morajo biti izpolnjeni za uporabo suspenzije nanodelcev *in vivo*. Za uporabo v *in vitro* testiranjih je zadosten pogoj lahko že dobra kemična in koloidna stabilnost. Uporaba zunanega magnetnega polja nam omogoča manipulacijo s superparamagnetnimi nanodelci na daljavo. Ta lastnost ponuja številne zanimive in nove možnosti uporabe magnetnih nanodelcev v bioloških procesih separacij, detekcij in ciljanem dostavljanju zdravilnih učinkovin. Magnetni nanodelci se odzovejo na izmenično magnetno polje primernih frekvenc z oddajanjem toplote, kar lahko izkoriščamo pri zdravljenju tumorskega tkiva s hipertermijo. Zelo pomembna je tudi njihova uporaba pri slikanju z magnetno resonanco, kjer so uporabni kot kontrastno sredstvo [4, 28, 63, 73, 84–90].

Zaradi strogih regulatornih zahtev se izmed magnetnih materialov v biomedicini najpogosteje uporabljajo nanodelci železovih oksidov, ki veljajo za biorazgradljiv material. To nakazuje suspenzija Feraheme® (AMAG Pharmaceuticals), ki temelji na superparamagnetnih nanodelcih železovega oksida. Suspenzija je pri FDA odobrena za

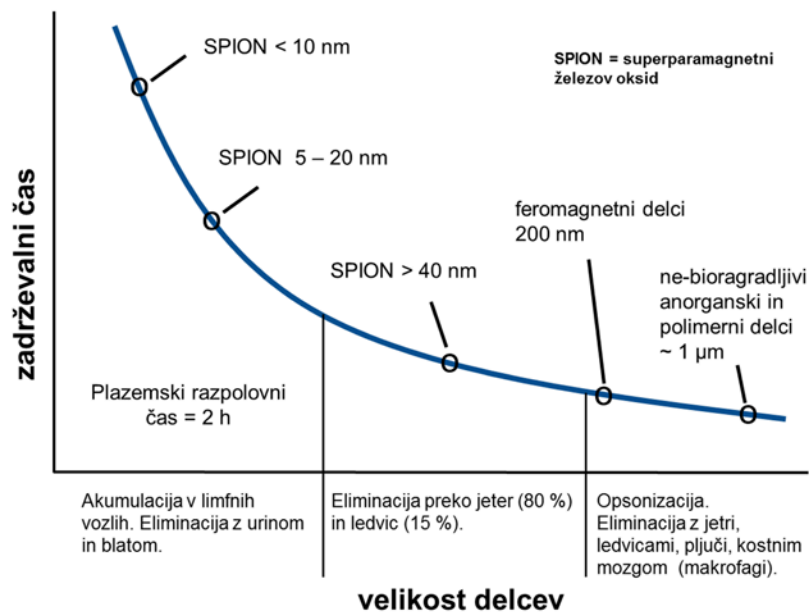
zdravljenje anemij (pomanjkanje železa) pri ljudeh s kronično ledvično boleznijo. Nanodelci v pripravku Feraheme[®] izkazujejo zelo dolg cirkulatorni čas v telesu, kjer se železovi ioni počasi odtapljajo iz kristalne strukture nanodelca in nadomeščajo pomanjkanje železa v telesu. Podjetje Magforce AG ima v svojem izdelku NanoTherm[®] nanodelce magnetita, ki so namenjeni zdravljenju možganskega glioblastoma [62]. V slednjem primeru so uspešno zaključili drugo klinično fazo testiranja, kjer so se pokazali obetavni rezultati pri zdravljenju s hipertermijo. Kljub temu je potrebno poudariti razliko v potencialni varnosti med nanodelci magnetita in maghemita, ki temelji na različnih ionih v kristalnih strukturah. Nanodelci magnetita imajo 1/3 atomov železa v obliki Fe²⁺, medtem ko ima njegova stabilnejša oksidirana oblika, maghemit, vse atome železa v oksidirani obliki Fe³⁺. V primeru slabo prevlečenih nanodelcev magnetita se tako lahko sproščajo ioni Fe²⁺, ki so pomembni za nastajanje reaktivnih kisikovih spojin. Znano je, da so ioni Fe²⁺ vključeni v Fenton-ovo reakcijo (enačba 19), kjer nastaja zelo reaktiven hidroksilni radikal HO[•] [91, 92]. Ta radikal povzroča lipidno peroksidacijo, poškodbe DNK in oksidacije beljakovin [93]. Pri nanodelcih magnetita so odkrili intrinzično peroksidazi podobno delovanje, kjer predvidevajo, da imajo pri tem pomembno vlogo ioni Fe²⁺ [94]. Zaradi opisane potencialne nevarnosti ionov Fe²⁺ sem se pri svojem delu osredotočil na nanodelce maghemita.



Človeški obrambni sistem sestavljajo številne »biološke bariere«, ki služijo zaščiti telesa pred škodljivimi tujki, vključno z injiciranimi učinkovinami, kontrastnimi sredstvi in nanodelci. Te biološke bariere omejujejo gibanje nanodelcev z nezmožnostjo prehajanja nanodelcev čez bariere. Poleg tega se lahko aktivira negativen obrambni odgovor preko biokemične signalizacije, ki nanodelce prehitro eliminira iz telesa [95].

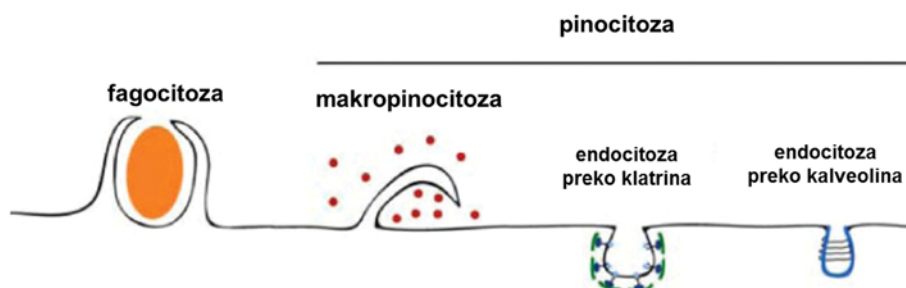
Po intravenozni administraciji se nanodelci v krvi takoj srečajo s povišano ionsko jakostjo, heterogeno raztopino (beljakovine), kar lahko povzroči aglomeracijo nanodelcev, ki nato inducira njihovo takojšnjo odstranitev iz telesa. Med nanodelci in serumskimi beljakovinami (opsonini) lahko pride do nespecifičnih interakcij, ki aktivirajo imunski sistem. Če so nanodelci prepoznani kot telesu nevarni, jih celice retikulo-endotelijskega sistema (RES) izločijo iz telesa preden dosežejo svoje ciljano tkivo [63].

Poleg primerno prirejene površine nanodelcev, ki jim omogoča izognitev delovanju sistema RES, morajo nanodelci ustrezati tudi velikostnim omejitvam (slika 20). Primerna hidrodinamska velikost nanodelcev je pomembna pri dostopnosti ciljanih tkiv. Te omejitve so posebno stroge, kadar z nanodelci ciljamo organe kot so možgani (krvno-možganska bariera) in ledvice [96]. Krvno-možgansko bariero lahko preidejo le dovolj majhni nanodelci, ki imajo primerne fizikalno-kemijske lastnosti.



Slika 20: Prikaz odvisnosti zadrževalnega časa delcev v krvi od njihove velikosti. Prerisano iz [97].

Biološke bariere so tudi fizične omejitve pri gibanju nanodelcev na nivoju celice. Ko se nanodelci približajo celici, jih celica privzame (navadno endocitoza), čemur navadno sledi znotrajcelični transport preko endosomov v lizosome (slika 21). V slednjih potečejo encimske in hidrolitične reakcije, ki popolnoma metabolizirajo makromolekule. Številne terapevtske učinkovine so makromolekule (proteini, DNK, siRNK), ki so občutljive na lizosomsko razgradnjo in postanejo po procesiranju v lizosomih neuporabne. Še posebej so občutljivi proteini. To predstavlja izziv pri pripravi magnetnih nanodelcev kot nosilcev tovrstnih makromolekul. Primerno načrtovanje nanodelcev lahko omogoča drugačno obliko privzema v celice (preko specifičnih receptorjev), vendar se tudi znotraj celice pojavljajo bariere, kot je jedrna membrana, katerih prehod je pomemben pri učinkoviti genski terapiji. Vse te omejitve predstavljajo še vedno velike raziskovalne izzive [63].



Slika 21: Glavne endocitotske poti [98].

1.8.1 Slikanje z magnetno resonanco

Slikanje z magnetno resonanco (MRI) je zelo uporabna tehnika slikanja človeškega telesa, ki temelji na principih nuklearne magnetne resonance [99, 100]. Gre za neinvazivno metodo za bolnika, kjer se uporabljajo močna magnetna polja in neionizirajoče sevanje v radio-frekvenčnem območju. Slika je rezultat razlike v intenziteti signala, ki pride iz posameznega tkiva in je odgovor na radiofrekvenčne pulze [4, 101]. Najprej uporabijo močno magnetno polje, s čimer delno polarizirajo magnetne momente

protonov. Nato aplicirajo radiofrekvenčni (RF) pulz, ki spreminja ravnotežno orientacijo momentov protonov. Med RF pulzom protoni absorbirajo energijo, kar povzroči njihov preskok med spinskimi stanji. Ob koncu pulza se zgodi relaksacija spinskega stanja protonov nazaj v nižje energetske stanje. To povzroči majhno elektromagnetno radiacijo, ki jo zazna detektor s pomočjo gradientov in modulacij ter tako signale iz različnih mest pretvori v MRI sliko.

Kubični centimeter vode ima približno $6,6 \times 10^{19}$ protonov, kjer so magnetni momenti v odsotnosti magnetnega polja naključno orientirani. Ko vzpostavimo močno magnetno polje, se momenti poskušajo poravnati s smerjo polja, pri čemer pa jih ovira termična energija. Čeprav je število momentov poravnanih s poljem le malo večje od tistih v nasprotno smer, znaša neravnovesje okoli 2×10^{14} protonov na kubični milimeter vode. Neravnovesje v gostotah nasprotno usmerjenih protonov je detektirano in transformirano v MRI sliko.

Kakovost slike MRI lahko izboljšajo kontrastna sredstva. Osnovna razlika med kontrastnimi sredstvi je način, kako vplivajo na T_1 in T_2 relaksacijske čase. Večina kontrastnih sredstev je paramagnetnih z nesparjenimi elektroni, ki lahko vplivajo na spremembe T_1 in T_2 . Kontrastno sredstvo so lahko molekularni kisik, stabilni radikali ali ioni kovin. Ioni kovin so veljali za najboljšo možnost. Radikali lahko povzročajo poškodbe tkiv, medtem ko ima kisik premajhen paramagnetni učinek. Prvo uporabljeno kontrastno sredstvo je bil kompleks krom-EDTA [102], nato so uporabljali gadolinijeve spojine [103] in sedaj se uveljavljajo superparamagnetni nanodelci, ki izkazujejo boljše kontrastne lastnosti.

Superparamagnetni nanodelci so zaradi svojih posebnih magnetnih lastnosti pritegnili pozornost kot kontrastna sredstva pri MRI. Njihovi relaksacijski časi so zelo veliki v primerjavi s paramagnetnimi gadolinijevimi spojinami. Najuporabnejše kontrastno sredstvo pri MRI so trenutno superparamagnetni nanodelci železovih oksidov [104–107]. Primerna biokonjugacija nanodelcev z afinitetnimi ligandi (protitelesa) lahko dodatno poveča specifičnost diagnostike z MRI.

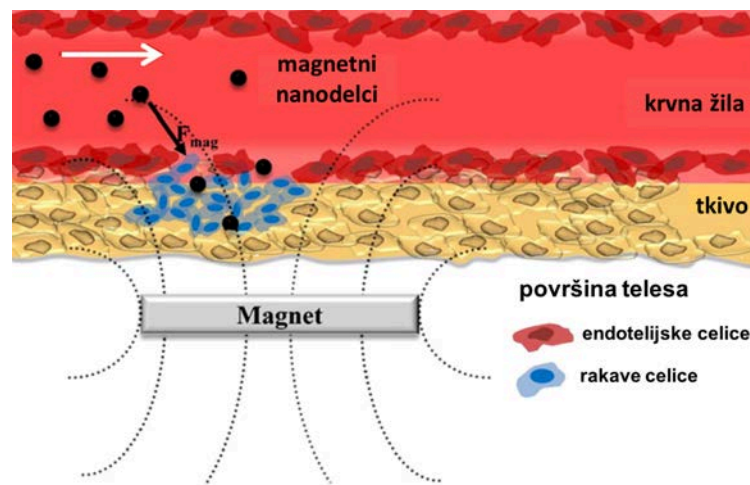
1.8.2 Magnetna hipertermija

Hipertermija je v osnovi zdravljenje s toploto, ki inducira procese nekroze in apoptoze. Zdravljenje s hipertermijo pogosto kombinirajo z drugimi terapijami [62]. V splošnem proces hipertermije vključuje gretje tkiv in celic na terapevtski vrednosti temperature (42 – 46 °C) za 30 minut. Številni tipi rakavih celic so občutljivejši na temperature višje od 41 °C v primerjavi z zdravimi celicami [108]. Pri zdravljenju z magnetnimi nanodelci je potrebno zagotoviti njihovo koncentriranje v ciljano tkivo, sicer se poveča tveganje nekroze zdravega tkiva.

Magnetno hipertermijo je prvič izvedel Gilchrist leta 1957 pri zdravljenju metastaz pri raku na črevesju [109]. Koncept zajema uporabo magnetnega polja pri lokalizaciji feromagnetnih nanodelcev maghemita v ciljano tkivo in ohranjanje polja za primerno časovno obdobje. Ugotovili so, da se v treh minutah ob primerni frekvenci in jakosti polja tkivo bezgavk segreje za 14 °C. Od takrat so raziskovalci intenzivno poročali o hipertermiji, kjer so preučevali različne nanodelce in različne metode dostavljanja v ciljano tkivo [110–112]. Trenutno se med magnetnimi nanodelci za zdravljenje s hipertermijo najpogosteje preučujejo superparamagnetni nanodelci. To je povezano z generiranjem toplote pri nižjih magnetnih poljih kot so potrebna pri feromagnetnih nanodelcih [4]. Mehanizmi segrevanja feromagnetnih in superparamagnetnih nanodelcev so zelo kompleksni in še ne v celoti pojasnjeni [113].

1.8.3 Ciljano dostavljanje zdravilnih učinkovin

Kadar kirurška odstranitev malignih tumorjev ni možna, se zdravniki odločajo za kemoterapijo in obsevanja. Pri kemoterapiji so problematične zahteve po visokih terapevtskih odmerkih, ki posledično vodijo v številne stranske učinke zdravljenja. Terapija z obsevanjem pravtako ni specifična in uničuje zdravo tkivo, ki je v bližini obsevanega tumorja. Maligne celice imajo to lastnost, da se zelo hitro in nekontrolirano delijo. Namen kemoterapevtikov je ciljanje in uničenje celic, ki se nekontrolirano delijo, proliferirajo. Hitro se delijo tudi sicer zdrave folikeljske celice lasu ali epitelijske celice sluznic. Kemoterapija je nespecifična, zato bolniki poleg številnih ostalih stranskih in neželenih učinkov izgubijo tudi lase, obrvi in trepalnice. Zaradi nespecifičnosti so potrebni višji terapevtski odmerki, saj se učinkovina porazdeli po vsem telesu in ne samo v tkivu tumorja.



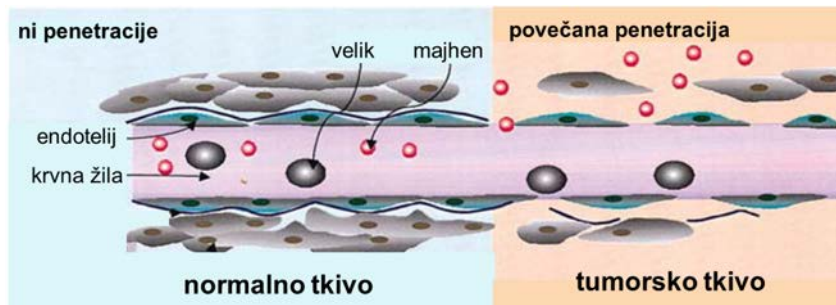
Slika 22: Shematski prikaz ciljanega dostavljanja magnetnih nanodelcev z zunanjim magnetom [114].

Za zmanjšanje stranskih učinkov in povečanje učinkovitosti formulacije bi se lahko uporabile suspenzije magnetnih nanodelcev, ki bi služile kot nosilci zdravilnih učinkovin [115–117]. Magnetni nanodelci kot nosilci zdravilnih učinkovin so trenutno zelo zanimiva raziskovalna tema, kjer so številni raziskovalci pokazali zelo obetavne rezultate testiranj na živalskih modelih [86, 118]. Gre za dostavljanje magnetnih nosilcev v tumorsko tkivo, kjer magnetne nanodelce po intravenozni aplikaciji usmerjamo v telesu s pomočjo gradientov magnetnih polj na daljavo. Ko so magnetni nosilci z vezano učinkovino v tumorskem tkivu, sledi sproščanje učinkovine iz nosilca. Sproščanje lahko poteka z encimsko razgradnjo ali s spremembami fizioloških pogojev kot so vrednost pH, osmozni tlak in temperatura [119]. Ta pristop omogoča uporabo bistveno nižjih količin terapevtske učinkovine in zagotavlja posledično manj stranskih učinkov, saj so učinkovine dostavljene specifično v tumorsko tkivo.

1.8.3.1 Pasivno in aktivno ciljanje

Pasivno ciljanje se nanaša na akumulacijo učinkovine, vektorjev genskega materiala in nanodelcev v tkiva, kjer akumulacija temelji na biofizikalnih lastnostih nosilcev kot sta velikost in naboj [120]. Posamezna tkiva se med seboj razlikujejo po svoji sestavi in lastnostih, kar vodi v različen obseg akumulacije učinkovin po tkivih. Na primer, povečana permeabilnost tumorskega žilja in nezadosten limfni sistem v trdnih tumorjih (učinek povečane permeabilnosti in kopičenja – EPR učinek) se kaže v povečani akumulaciji dolgo krožečih delcev (nanodelci, funkcionalizirani s polietilen glikolom) v

tumorsko tkivo [121]. Pasivno ciljanje izkorišča fizikalne lastnosti učinkovin/delcev in biološke lastnosti ciljanega tkiva. Znano je, da nanodelci večji od 10 nm ne morejo penetrirati čez endotelij v normalnem tkivu [122], medtem ko lahko penetrirajo v patoloških pogojih, kot je vnetje ali tumor [123]. Večina trdnih tumorjev izkazuje velikost žilnih por med 380 in 780 nm, čeprav je organizacija tumorskega žilja odvisna od tipa tumorja, njegove hitrosti rasti in mikrookolja [124].



Slika 23: Shematski prikaz učinka povečane permeabilnosti in kopičenja – EPR učinek [125].

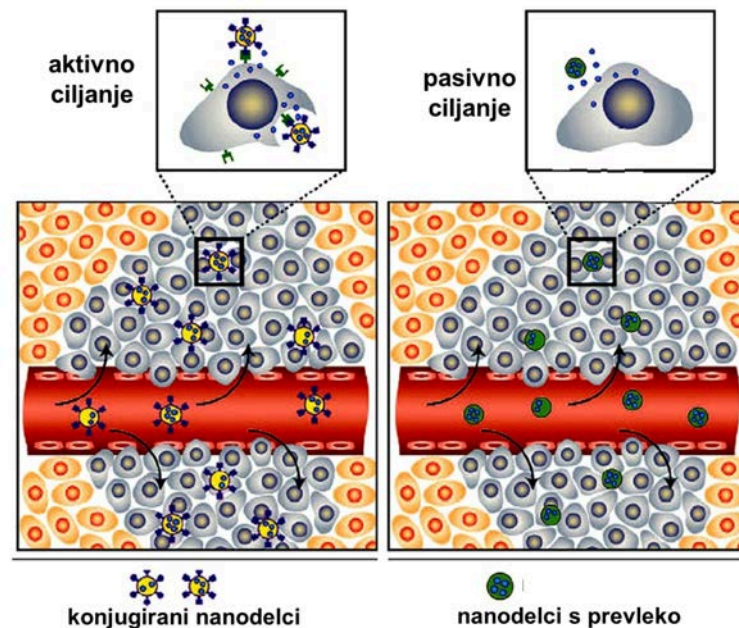
Zue s sodelavci je pokazal, da se majhen pozitivno nabit linearni kompleks PEI-DNA, injiciran intravenozno v obliki bolus injekcije z glukozo, učinkovito kopiči v alveolah (vključno s pnevmociti) [126]. Predvidevajo, da večja količina neionske glukoze v bolus injekciji onemogoči aglomeracijo kot tudi mešanje kationskih kompleksov in prostega PEI s krvjo. To omogoča prehod v področje pljučnih alveolov, kjer se kationski vektorji privzamejo preko receptorjev heparan sulfata na alveolah. V nasprotju z zadrževanjem kationskih vektorjev v pljuči pri bolus injekciji, se pri enostavni intravenski injekciji kationski kompleksi akumulirajo v jetrih, kjer jih učinkovito privzamejo fagociti [127]. V nasprotju s kationskimi vektorji se intravenozno injicirana prosta DNK privzame v Kupfer-jeve celice preko receptorjev. Kljub učinkovitem privzemu ni opazne genske ekspresije v jetrih, saj je prosta DNK podvržena hitri razgradnji nukleaz v serumu in celicah [128].

Razlike v nosilcih oziroma vektorjih genskega materiala pomembno vplivajo na njihovo usodo v telesu. Podobno, razlike v izbiri prevlek in funkcionalizacije nanodelcev pomembno vplivajo na distribucijo, akumulacijo in eliminacijo nanodelcev v telesu. Na primer, s polietilen glikolom (PEG) funkcionalizirani nanodelci, ki nimajo izrazitega naboja in so sterično stabilizirani s polarnimi PEG verigami, ne izkazujejo tendence po nespecifični adsorpciji serumskih proteinov in jih sistem RES praktično ne prepozna. Takšni nanodelci dolgo krožijo po krvi v telesu in se lahko počasi akumulirajo v tumorskem tkivu zaradi učinka EPR [129].

Primer delno aktivnega ciljanja je prikazal Barron s sodelavci. V miško so intravenozno injicirali kationske lipoplekse in opazili njihovo akumulacijo v pljuči, kar bi naj bilo povezano z veliko gostoto proteoglikanov v pljučnih endotelijskih celicah. Proteoglikani izkazujejo veliko afiniteto do kationskih vektorjev, kar je bilo povezano z učinkovitim celičnim privzemom [130].

Aktivno ciljanje temelji na molekularnem prepoznavanju, ki omogoča specifično interakcijo med učinkovino/delcem in ciljanimi celicami (receptor – ligand in antigen – protitelo). Razširjena definicija klasificira vsak aktiven postopek lokalizacije učinkovine/delca na specifično mesto kot aktivno ciljanje. Vse biološke in fizikalne metode lokalizacije spadajo v kategorijo aktivnega ciljanja, kjer je edina izjema bioporazdelitev zaradi biofizikalnih lastnosti učinkovine/delca. Lokalizacija magnetnih nanodelcev z gradientom zunanega magnetnega polja spada torej med aktivno ciljanje. Na primer, vezava afinitetnega liganda na nanodelce (biokonjugacija) bi bil primer

aktivnega ciljanja specifične tarče v telesu [63, 131].



Slika 24: Shematski prikaz aktivnega in pasivnega ciljanja v tumorskem žilju [132].

1.8.4 Magnetna separacija

Predvsem na področju biokemije in biotehnologije se pogosto srečujejo s problemom ločevanja, čiščenja in koncentriranja specifičnih bioloških molekul iz njihovega nativnega okolja. Izolacija nativnih in rekombinantnih beljakovin je navadno časovno zamudna, kjer je potrebno procese ekstrakcije in centrifugiranja večkrat ponavljati. Magnetna separacija predstavlja dobro alternativo konvencionalnim tehnikam. Na magnetne nanodelce vežemo afinitetne ligande, ki v kompleksni suspenziji prepoznajo in se vežejo na specifično tarčno molekulo [80]. Nastali magnetni konjugat lahko ločimo iz suspenzije s pomočjo gradienta magnetnega polja. Kompozitni nanodelci, ki so zgrajeni iz več superparamagnetnih nanodelcev, so primernejši magnetni nosilci od posameznih superparamagnetnih nanodelcev. Nanje deluje namreč večja magnetna sila kot na posamezne magnetne nanodelce. Ugodno razmerje površina-volumen, hitro gibanje majhnih koloidnih delcev zaradi termične energije in dobra koloidna stabilnost povečajo hitrost izolacije in kapaciteto vezave beljakovin v primerjavi z ostalimi separacijskimi tehnikami.

Magnetne separacije so uporabne tudi za ločevanje celic. Zanimiv primer je ločevanje in kvantifikacija poškodovanih eritrocitov. V zdravih eritrocitih so molekule fosfatidilserina orientirane proti citoplazmi, medtem ko je v poškodovanih eritrocitih organizacija fosfatidilserina naključna in asimetrična [133]. Znotrajcelični protein, aneksin V, ima sposobnost specifične vezave s fosfatidilserinom v prisotnosti ionov Ca^{2+} . Če ga konjugiramo na magnetne nanodelce, lahko tako specifično ločimo poškodovane eritrocite od zdravih in jih nato kvantificiramo. Takšno ločevanje izkazuje velik potencial, saj poškodbe eritrocitov korelirajo z razvojem eritrocitov pri bolnikih z malarijo in Alzheimer-jevo boleznijo [134]. Kvantifikacija poškodovanih eritrocitov je tudi pokazatelj kakovosti shranjene humane krvi v bankah krvi. Konjugacija aneksina V na magnetne nanodelce izkazuje obetaven potencial in je bila patentno zaščitena.

Magnetne nanodelce in njihovo sposobnost separacije lahko izkoriščamo celo pri raziskavah v onkologiji. Konjugacija fluorescentnih magnetnih nanodelcev z ligandi, ki prepoznavajo nenavadne spremembe na membranah, lahko zagotovijo pomembne

informacije o apoptozi. Velik izziv predstavlja separacija tumorskih celic, ki po odstranitvi trdnega tumorskega tkiva krožijo po telesu.

2 Namen dela

Primerno funkcionalizirane superparamagnetne nanodelce lahko uporabljamo v različne namene na področju biomedicine. V večini primerov njihove uporabe je željeno, da nanodelci prepoznajo in se privzamejo (kopičijo) v specifične celice – aktivno ciljano dostavljanje. Za uspešno ciljano dostavljanje je potrebno pripraviti stabilno koloidno suspenzijo nanodelcev z vezanimi afinitetnimi ligandi na njihovih površinah. Dobro poznavanje in razumevanje lastnosti nanodelcev in njihovih površin je pri pripravi nanodelcev za ciljano dostavljanje nujno. Kontrolirana priprava in izbor primerne prevleke, funkcionalizacijskega sloja molekul in tipa vezave afinitetnih ligandov na površine magnetnih nanodelcev veljajo še vedno za raziskovalne izzive.

Namen mojega dela je bil razvoj znanja za pripravo stabilne koloidne suspenzije večnamenskih nanodelcev, ki se aktivno privzamejo v specifične celice. To vključuje razvoj znanja za pripravo različno debelih prevlek silike na površinah nanodelcev. Pri tem sem preučeval reakcijske pogoje, ki so omogočali nastanek zelo tankih, enakomernih in neprekinjenih prevlek silike. Željeno je, da je prevleka čim tanjša, saj zaradi svoje nemagnetne narave poslabša magnetne lastnosti magnetnih nanodelcev. Bistvena prednost prevlek silike pred večino ostalih prevlek je, da je struktura silike rigidna in močno vezana na površino magnetnega nanodelca. Obenem pa prevleka silike omogoča tvorbo kovalentnih vezi z organosilanskimi molekulami v visokih koncentracijah, ki na površine nanodelcev uvedejo za (bio)konjugacijo primerne funkcionalne skupine. Pridobljeno znanje za pripravo takšnih prevlek na magnetnih nanodelcih je lahko uporabno tudi pri prevlečenju površin drugih anorganskih nanostruktur. V naslednjem koraku je bil namen dela razvoj znanja za vezavo organosilanskih molekul na površine s siliko prevlečenih nanodelcev, s čimer sem na površine nanodelcev uvedel amino skupine. Pri tem je bil moj namen določitev primernih reakcijskih pogojev in izbor primerne aminosilanske molekule, ki so omogočali pripravo stabilne koloidne suspenzije funkcionaliziranih nanodelcev z možnostjo kontroliranja koncentracije vezanih silanskih molekul. Številne raziskave temeljijo na opazovanju in sledljivosti nanodelcev z optičnimi metodami, zato sem v ta namen na del površinskih amino skupin vezal fluorescentne molekule. Priprava večnamenskih nanodelcev zahteva dobro poznavanje in kontrolo površinskih funkcionalnih skupin. V ta namen sem razvil postopek, ki omogoča kontroliranje razmerja med površinskimi amino in karboksi skupinami. Namen nadaljnjih raziskav je bilo preučevanje vpliva površinskega naboja na način in obseg privzema amino in karboksi funkcionaliziranih nanodelcev v dva različna tipa celic. Pri tem sem sodeloval tudi pri razvoju nedestruktivne metode za kvantifikacijo magnetnih nanodelcev v celicah, ki temelji na neposrednem določanju superparamagnetne faze v vzorcu živih celic s pomočjo magnetometra SQUID. Ker metoda ne temelji na merjenju fluorescence je primerna za določanje obsega privzema nefluorescentnih magnetnih nanodelcev. V zadnjem delu sem pripravil pet različnih biokonjugatov, kjer sem na amino– ali karboksi– funkcionalizirane fluorescentne nanodelce vezal afinitetni ligand epidermalni rastni dejavnik (EGF). Pri tem sem preučeval obseg privzema biokonjugatov v ciljane celice A431, kjer pomeni večji obseg privzema boljše prepoznavanje ciljanih celic. Namen tega dela je bil razvoj znanja o vplivu vezi pri biokonjugaciji na možnost prepoznavanja ciljanih celic.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

Pri svojem doktorskem delu sem uporabljal naslednje spojine:

- Železov (II) sulfat heptahidrat, ACS, 99+%, Alfa Aesar
- Železov (III) sulfat hidrat, reagent grade, Alfa Aesar,
- Aceton p.A., 99,5%, AppliChem,
- Citronska kislina, 99+%, Alfa Aesar,
- Amonijev hidroksid, 25 ut. % vodna raztopina, Carlo Erba,
- Tetraetoksi silan, 99%, Alfa Aesar,
- Tetrametil aminijev hidroksid, 1,0M vodna raztopina, Alfa Aesar,
- Sukcin anhidrid, 99%, Alfa Aesar,
- N,N-dimetilformamid, ACS, 99,8+%, Alfa Aesar,
- Natrijev hidroksid, 98%, Alfa Aesar,
- Kalijev hidroksid, 85%, Alfa Aesar,
- Klorovodikova kislina, 37%, Carlo Erba,
- Natrijev klorid, ACS, 99,0%, Alfa Aesar,
- Etanol, 99,5%, Carlo Erba,
- 1-3-(dimetil aminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorid, 98+%, Alfa Aesar,
- N –hidroksisulfosukcinimid, Thermo Scientific,
- 5- (in 6-) karboksifluoresceinsukcinimidil ester, Thermo Scientific,
- Bis(sulfosukcinimidil) suberat, Thermo Scientific,
- Bis(sukcinimidil)penta(etilenglikol), Thermo Scientific,
- 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol, Alfa Aesar,
- (3-aminopropil)trietoksi silan, 98%, Alfa Aesar,
- N-(3-aminoheksil)propilmetiltrimetoksi silan, 95%, ABCR GmbH
- N-(3- tritoksisililpropil)etilendiamin, Chemosyntha NV,
- 3-(2-aminoetilamino)propilmetildimetoksi silan, 97%, Alfa Aesar,

3.2 Sintezne metode

3.2.1 Sinteza magnetnih nanodelcev

Magnetne nanodelce γ -Fe₂O₃ (ND) sem pripravil z metodo soobarjanja železovih ionov iz raztopin sulfatov FeSO₄ (0,027 mol/L) in Fe(SO₄)₃ (0,0115 mol/L) ionov. Kot obarjalni reagent sem uporabil vodno raztopino NH₄OH. V prvi stopnji sem raztopini železovih ionov (500 mL) dvignil pH vrednost na 3 z razredčeno raztopino amonijevega hidroksida (0,5 ut. %) in ohranjal to vrednost pH še 30 minut. V naslednji stopnji sem dodal koncentrirano raztopino NH₄OH (250 mL, 25 ut. %) in s tem dvignil vrednost pH

suspenzije na približno 11, pri čemer so se oborili magnetni nanodelci. Po dodatku NH_4OH sem črno suspenzijo oborjenih delcev staral nadaljnjih 30 minut za popolno oksidacijo železovih (II) ionov. Po 30 minutah sem nanodelce ND zbral na magnet in jih 4-krat spral s 150 mL amoniakalne raztopine (pH ~ 10,3).

3.2.2 Priprava magnetne tekočine

Primerno spranim nanodelcem ND (~1,2 g) sem dodal 60 mL destilirane vode. Nato sem suspenziji nanodelcev ND dodal 5 mL raztopine citronske kisline z masno koncentracijo $\gamma = 0,5 \text{ g/mL}$ in uravnal pH vrednost na 5,2 s koncentrirano vodno raztopino NH_4OH . Mešanico magnetnih nanodelcev in citronske kisline sem nato intenzivno mešal 90 minut pri temperaturi 80 °C. Po 90 minutah sem suspenzijo magnetnih nanodelcev ohladil in s koncentrirano vodno raztopino NH_4OH uravnal pH vrednost suspenzije na 10,1. Majhen delež preostalih aglomeratov sem iz suspenzije odstranil s centrifugiranjem, 5 minut na 16000 g. Tako pripravljeno suspenzijo nanodelcev (ND-CA) sem uporabil za nadaljno sintezo tankih prevlek silike na površinah posameznih nanodelcev. Za sintezo debelejših prevlek silike na nanodelcih pa sem najprej suspenzijo spral z acetonom in nanodelce dispergiriral v destilirani vodi.

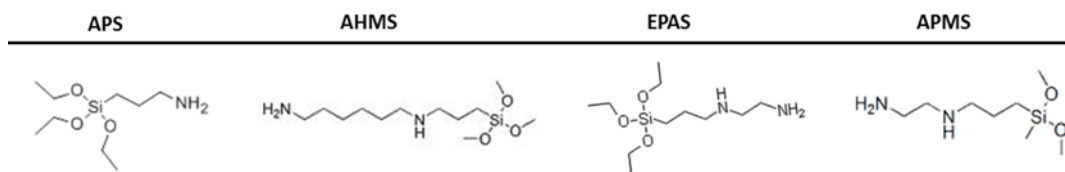
3.2.3 Prevlečenje magnetnih nanodelcev s siliko

Nanodelce ND-CA sem prevlekel z različno debelimi plastmi amorfnе silike s hidrolizo in polikondenzacijo prekursorja silike, tetraetoksi silana (TEOS-a). Reakcijo sem izvedel v mešanici etanol-voda (volumsko razmerje 1:4), kjer sem uporabil 25 mL suspenzije nanodelcev z različnimi koncentracijami nanodelcev (od 0,1 ut. % do 2 ut. %). Pri sintezi tanjših plasti (do 2 nm) je bila koncentracija dodanega TEOS-a v etanolu med 1 in 10 ut.%. Masno razmerje med nanodelci ND-CA in TEOS-om, ki definira debelino prevleke, je bilo med 0,6 (za prevleko debeline 2 nm) in 6 (za nanos Si-OH v enem sloju). Mehanizem reakcije sem razložil v uvodu pri točki 1.5.1 »Prevlečenje nanodelcev s siliko«. Pri reakciji sem preučeval vpliv dveh katalizatorjev, in sicer NH_4OH in KOH. Dodatke alkalnih katalizatorjev sem uravnaval glede na vrednost pH 11,0 ali 12,0. Mešanico etanol-TEOS sem dodal vodni suspenziji nanodelcev, uravnal pH vrednost in pustil mešati 3 ure pri sobni temperaturi.

V primeru priprave debelejših plasti silike (od 2 nm do 10 nm) sem uporabil katalizator NH_4OH pri vrednosti pH 11,0. Reakcijo sem izvedel v mešanici etanol-voda (volumsko razmerje 4:1). Pri izračunu dodatka reagenta TEOS sem upošteval srednjo velikost delcev (13 nm) in predpostavko, da so delci okrogli. Nanodelce prevlečene z 1-nm debelo plastjo silike, ki sem jih pripravil z uporabo katalizatorja KOH pri vrednosti pH 12, sem označil z ND-Si. V primeru drugačnih debelin pa sem suspenzije označil z ND-Six-Ny ali ND-Six-Ky, kjer x pomeni debelino prevleke silike, y pomeni vrednost pH, N pomeni uporabo katalizatorja NH_4OH in K uporabo katalizatorja KOH.

3.2.4 Priprava nanodelcev s terminalnimi amino skupinami

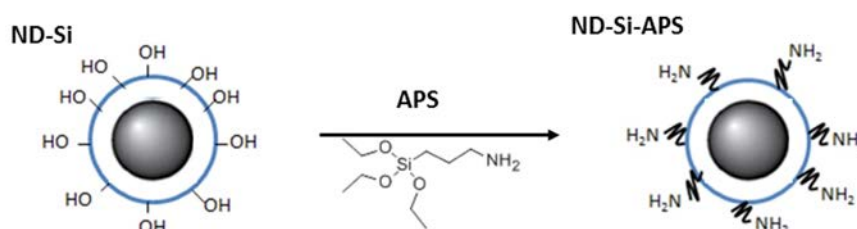
Za uvedbo aaminskih funkcionalnih skupin na površine nanodelcev prevlečenih s siliko sem uporabljal suspenzijo nanodelcev ND-Si. Reakcijo vezave silanskih molekul (slika 25) na površino nanodelcev, silanizacijo, sem izvajal v mešanici etanol-voda (volumsko razmerje 1:4) 5 ur pri 50 °C, kjer sem uravnal vrednost pH na 10,5 z uporabo katalizatorja NH_4OH . Mehanizem reakcije je predstavljen v uvodnem poglavju 1.6 »Funkcionalizacija nanodelcev s silani«.



Slika 25: Shematski prikaz struktur amino silanov.

3.2.4.1 Funkcionalizacija s (3-aminopropil)trietoksi silanom

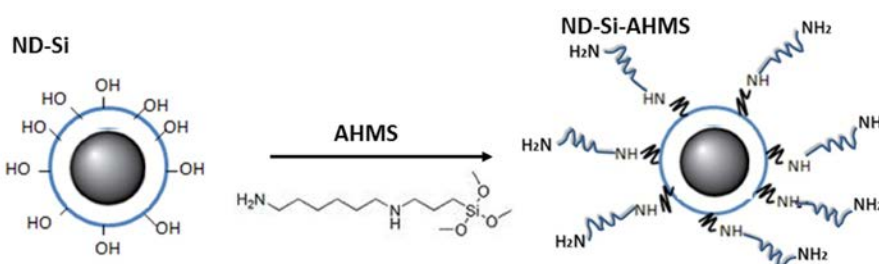
V etanolni fazi sem raztopil izračunan volumen (3-aminopropil)trietoksi silana (APS) in ga dodal k 45 mL vodne suspenzije nanodelcev ND-Si (0,5 ut. %). Koncentracija APS je bila $c_s = 20 \mu\text{mol APS}/\text{m}^2$ površine nanodelcev. Po koncu reakcije sem nanodelce zbral na magnet, jih 3-krat spral z 100 mL etanola in dispergiral v destilirani vodi. Suspenzijo nanodelcev sem označil z ND-Si-APS.



Slika 26: Shematski prikaz vezave APS na nanodelce NP-Si.

3.2.4.2 Funkcionalizacija z N-(3-aminohexil)propilmetiltrimetoksi silanom

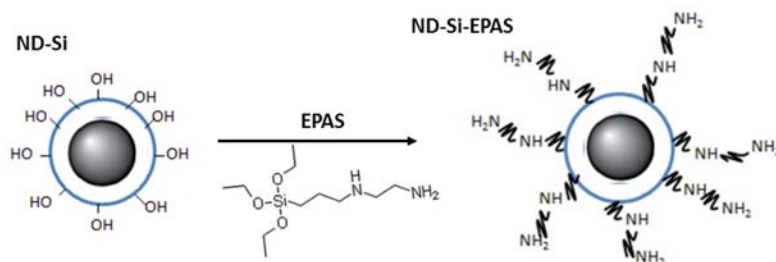
V etanolni fazi sem raztopil izračunan volumen N-(3-aminohexil)propilmetiltrimetoksi silana (AHMS) in ga dodal k 45 mL vodne suspenzije nanodelcev ND-Si (0,5 ut. %). Koncentracija AHMS je bila $c_s = 20 \mu\text{mol AHMS}/\text{m}^2$ površine nanodelcev. Po koncu reakcije sem nanodelce zbral na magnet, jih 3-krat spral s 100 mL etanola in dispergiral v destilirani vodi. Suspenzijo nanodelcev sem označil z ND-Si-AHMS.



Slika 27: Shematski prikaz vezave AHMS na nanodelce NP-Si.

3.2.4.3 Funkcionalizacija z N-(3-tritoksisililpropil)etilendiaminom

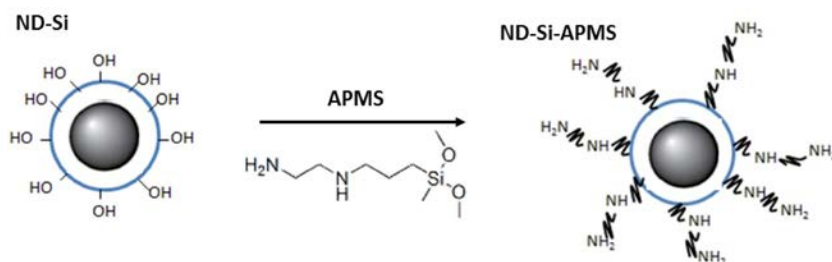
V etanolni fazi sem raztopil izračunan volumen N-(3-tritoksisililpropil)etilendiamin (EPAS) in ga dodal k 45 mL vodne suspenzije nanodelcev ND-Si (0,5 ut. %). Koncentracija EPAS je bila $c_s = 20 \mu\text{mol EPAS}/\text{m}^2$ površine nanodelcev. Po koncu reakcije sem nanodelce zbral na magnet, jih 3-krat spral z 100 mL etanola in dispergiral v destilirani vodi. Suspenzijo nanodelcev sem označil z ND-Si-EPAS.



Slika 28: Shematski prikaz vezave EPAS na nanodelce NP-Si.

3.2.4.4 Funkcionalizacija s 3-(2-aminoetilamino)propilmetildimetoksi silanom

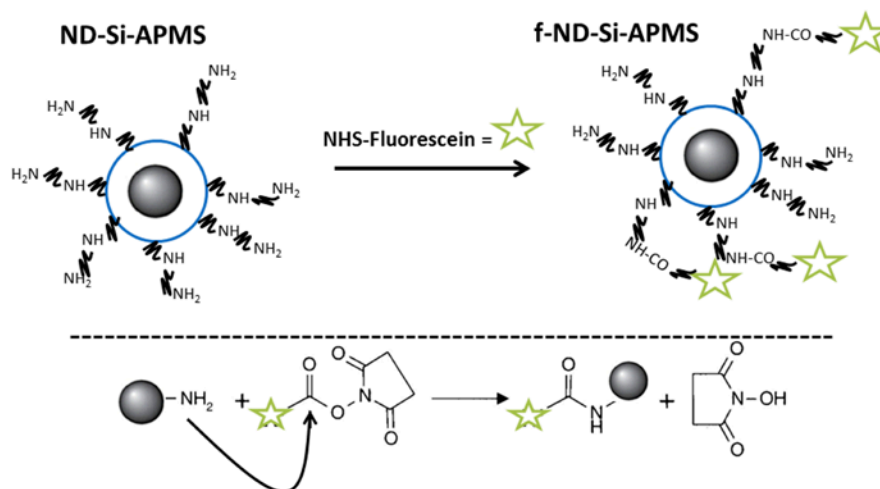
V etanolni fazi sem raztopil izračunan volumen 3-(2-aminoetilamino)propilmetildimetoksi silana (APMS) in ga dodal k 45 mL vodne suspenzije nanodelcev ND-Si (0,5 ut. %). Koncentracija APMS je bila med $c_s = 1 - 50 \mu\text{mol APMS}/\text{m}^2$ površine nanodelcev. Pri tem sem spremljal vpliv količine dodanega APMS na koncentracijo vezanega APMS na površini nanodelcev. Po koncu reakcije sem nanodelce ultrafiltriral (10 000 NMWL, Millipore) in spral z 200 mL destilirane vode. Suspenzijo nanodelcev, kjer je bila koncentracija APMS $5 \mu\text{mol na } 1 \text{ m}^2$ površine nanodelcev tekom reakcije, sem označil z ND-Si-APMS. Pri ostalih koncentracijah APMS sem suspenzije nanodelcev označil z ND-Si-APMS_x, kjer x predstavlja koncentracijo APMS v $\mu\text{mol}/\text{m}^2$.



Slika 29: Shematski prikaz vezave APMS na nanodelce NP-Si.

3.2.5 Priprava fluorescentnih nanodelcev s prostimi amino skupinami na površini

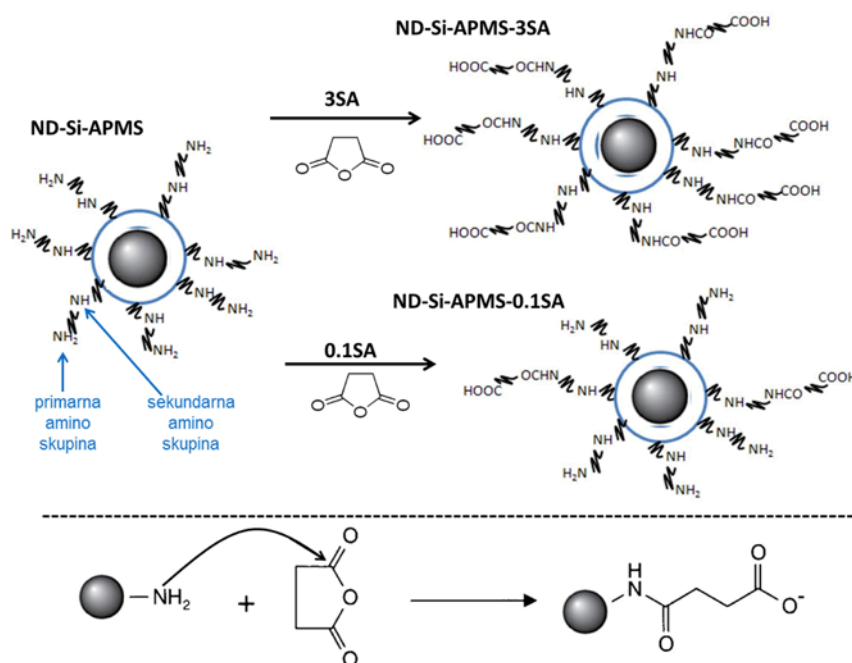
K 10 mL suspenzije nanodelcev ND-Si-APMS (1 ut.%) sem dodal 0,9 mg karboksifluoresceinsukcinimidil estera (NHS-Fluorescein), ki sem ga pred tem raztopil v 1 mL DMF. Reakcija je potekala med intenzivnim mešanjem 2 uri pri sobni temperaturi v temi (slika 30). Po koncu reakcije sem suspenzijo nanodelcev dobro spral z ultrafiltracijo in nanodelce dispergiriral v destilirani vodi. Učinkovitost spiranja sem preveril s ponovno ultrafiltracijo končne suspenzije po 1 tednu, kjer sem filtrat preveril na morebitno prisotnost sproščenega oziroma nevezanega barvila. Suspenzijo teh nanodelcev sem označil f-ND-Si-APMS. Za biološka testiranja sem te nanodelce označil krajše f-PND (fluorescentni pozitivno nabiti nanodelci).



Slika 30: Shematski prikaz vezave NHS-Fluoresceina na nanodelce NP-Si-APMS.

3.2.6 Priprava nanodelcev s terminalnimi karboksilnimi skupinami

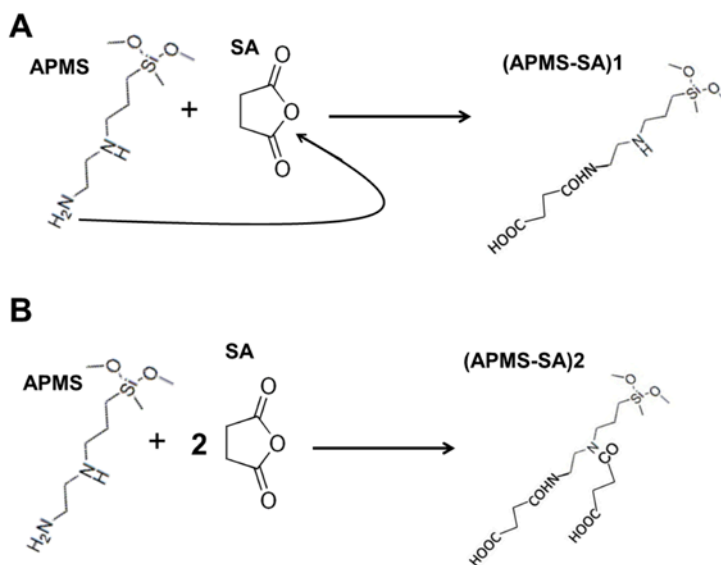
Na površino nanodelcev sem uvedel karboksilne skupine po dveh različnih postopkih. V prvem postopku sem uporabil nanodelce ND-Si-APMS, kjer sem izstopajoče primarne aminske skupine na nanodelcih zreagiriral z molekulami sukcin anhidrida (SA) (slika 31). K 100 mg nanodelcev ND-Si-APMS, dispergiranih v 45 mL DMF, sem dodal različne množine SA (od 10,1 do 303 μmol) raztopljenega v 5 mL DMF. Različni dodatki SA ustrezajo množinskemu razmerju SA/APMS med 0,1 in 3. Reakcija je potekla med intenzivnim mešanjem v 20 urah pri sobni temperaturi. Po koncu reakcije sem nanodelce dobro spral z acetonom in jih redispersiral v destilirani vodi. Tako pripravljeno suspenzijo nanodelcev sem označil z ND-Si-APMS-xSA, kjer x predstavlja množinsko razmerje SA/APMS.



Slika 31: Shematski prikaz reakcije med sukcin anhidridom (SA) in ND-Si-APMS.

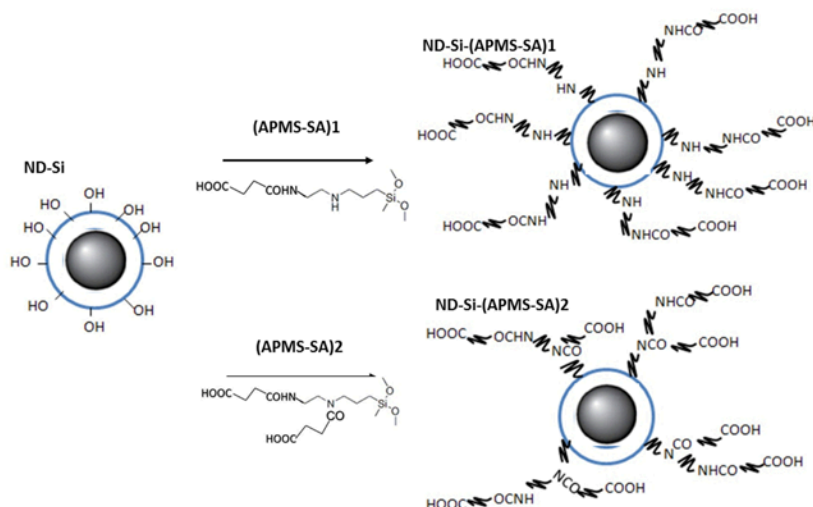
Drugi postopek je temeljil na predhodni sintezi dveh različnih reagentov (slika 32), s

katerima sem v naslednjem koraku na površino nanodelcev ND-Si v eni stopnji uvedel karboksilne skupine. Reagenta sem sintetiziral z reakcijo med bodisi primarno amino skupino (slika 32 (A)) ali z obema amino skupinama (primarni in sekundarni amin) na APMS (slika 32 (B)) in molekulo SA, v skladu z spodnjima reakcijama:



Slika 32: Shematski prikaz reakcije med APMS in sukcin anhidridom (SA), kjer je množinsko razmerje SA/APMS enako 1 (A) ali 2 (B).

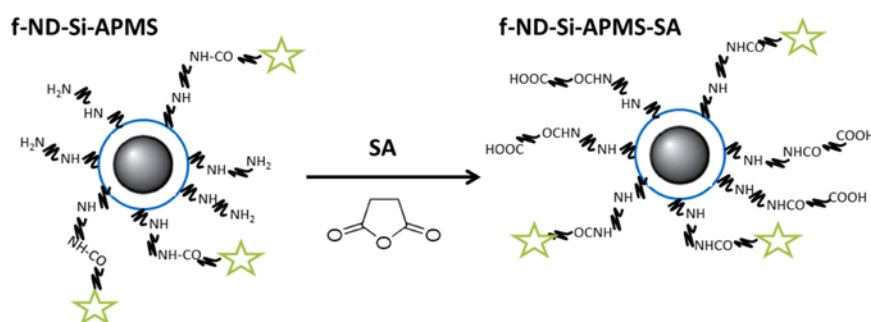
K 65 μmol APMS raztopljenega v 0,5 mL brezvodnega DMF sem dodal bodisi 1 ekvivalent SA in tako sintetiziral reagent (APMS-SA)1 oz dodal 2 ekvivalenta SA in tako sintetiziral reagent (APMS-SA)2. Tako pri vezavi reagenta (APMS-SA)1 kot (APMS-SA)2 na nanodelce ND-Si sem reagent najprej raztopil v 5 mL etanola in ga dodal k 20 mL vodne suspenzije nanodelcev (0,5 ut.%). Vrednost pH sem uravnal na 11 z uporabo TMAH. Reakcijsko zmes sem pustil mešati 5 ur pri 50 $^{\circ}\text{C}$. Po koncu reakcije sem nanodelce spral z acetonom in jih dispergiriral v destilirani vodi. Tako pripravljene suspenzije nanodelcev sem označil z ND-Si-(APMS-SA)1 in ND-Si-(APMS-SA)2 (slika 33).



Slika 33: Shematski prikaz reakcije med sintetiziranimi silanoma in ND-Si.

3.2.7 Priprava fluorescentnih nanodelcev s prostimi karboksilnimi skupinami na površini

Fluorescentne nanodelce s karboksilnimi skupinami na površini sem pripravil iz nanodelcev f-ND-Si-APMS (slika 34). K 100 mg nanodelcev f-ND-Si-APMS, dispergiranih v 45 mL DMF, sem dodal 3-kratni množinski ekvivalent SA (303 μmol) raztopljen v 5 mL DMF. Reakcija je potekla med intenzivnim mešanjem v 20 urah pri sobni temperaturi v temi. Po koncu reakcije sem nanodelce dobro spral z acetonom in jih redispersiral v destilirani vodi. Tako pripravljeno suspenzijo nanodelcev sem označil s f-ND-Si-APMS-SA. Za biološka testiranja sem te nanodelce označil krajše f-NND (fluorescentni negativno nabiti nanodelci).



Slika 34: Shematski prikaz reakcije med SA in f-ND-Si-APMS.

3.2.8 Priprava celičnih kultur

Celična linija raka prostate PC-3 (CRL-1435, ATCC, Manassas, VA) je bila pripravljena v gojišču DMEM/F12 (1:1) (Gibco, Invitrogen) ob dodatku antibiotikov, 2 mM glutamina in 10% fetalnega govejega seruma. Celično linijo dojke MCF10A neoT je posredovala Bonnie F. Sloane (Wayne State University, Detroit, ZDA). Izvira iz humanih epitelijskih celic dojke (MCF-10) transformiranih z genom neomicinske rezistence in onkogenega Ha-ras. Celice MCF10A neoT so bile pripravljene v gojišču DMEM/F12 (1:1) (Gibco, Invitrogen) z dodanim 5% fetalnim govejim serumom, 1 $\mu\text{g/mL}$ inzulina (Sigma), 0,5 $\mu\text{g/mL}$ hidrokortizona (Sigma), 50 ng/mL epidermalnega rastnega dejavnika (Sigma), glutamina in antibiotikov. Celična linija A431 (CRL-1555, ATCC, Manassas, VA) je bila pripravljena v gojišču DMEM (Gibco, Invitrogen) ob dodatku antibiotikov, 2 mM glutamina in 10% fetalnega govejega seruma. Celična linija HeLa (CCL-2, ATCC, Manassas, VA) je bila pripravljena v enakem gojišču kot celična linija A431.

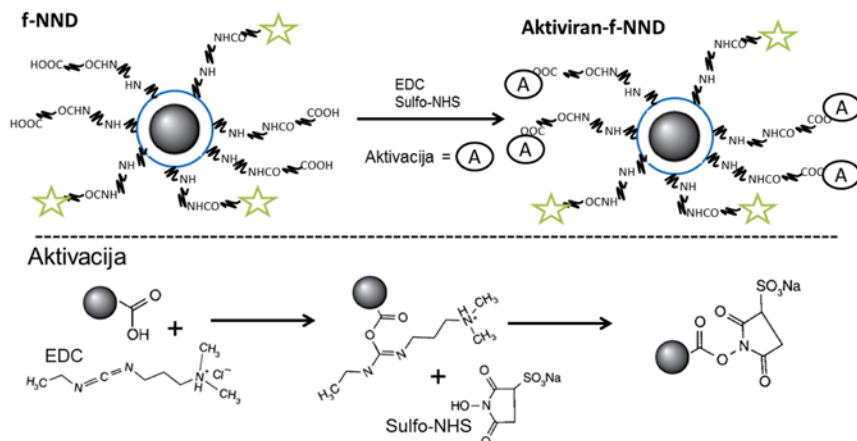
3.2.9 Vezave epidermalnega rastnega dejavnika na fluorescentne nanodelce – biokonjugacija

Pripravil sem pet različnih tipov biokonjugatov, kjer sem na površine amino– ali karboksi–funkcionaliziranih fluorescentnih nanodelcev vezal makromolekule epidermalnega rastnega dejavnika (EGF). Beljakovina EGF predstavlja biološki afinitetni ligand in je osnova za pripravo nanodelcev z aktivnim ciljanjem. Makromolekula EGF ima prosto amino skupino, ki je na voljo za tvorbo kovalentnih vezi s površinskimi funkcionalnimi skupinami na nanodelcih. Obenem je EGF v nevtralni vrednosti pH negativno nabit [135], zato ga lahko na površine nanodelcev adsorbiram s pomočjo elektrostatskih interakcij. Raziskave učinkovitosti vezav so temeljile na določanju obsega

privzema biokonjugatov v ciljne celice A431.

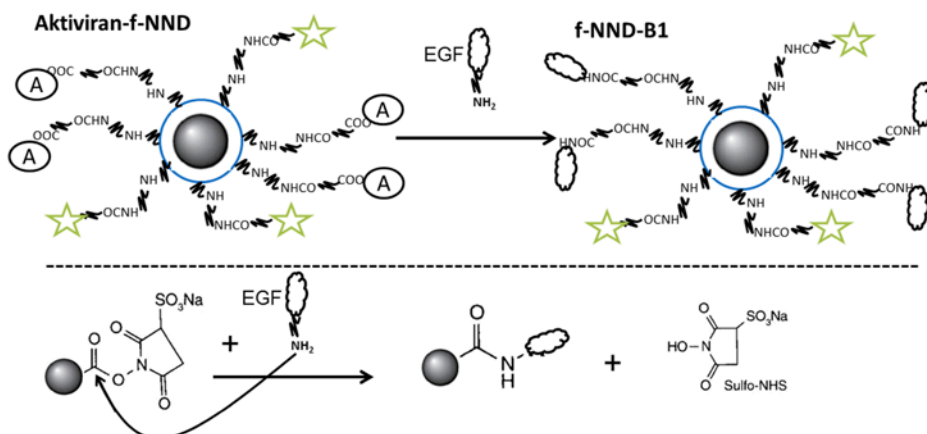
3.2.9.1 Kovalentna vezava EGF na nanodelce f-NND z uporabo karbodiimid kemije (1. tip)

2 mg 1-3-(dimetil aminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorida (EDC) in 3,9 mg N-hidroksisulfosukcinimida (Sulfo-NHS) sem raztopil v 1 mL destilirane vode in to raztopino dodal suspenziji nanodelcev f-NND (2 mL, 0,1 ut. %) v 2-(N-morfolino)etan sulfonski kislini (MES pufer, 1 mM, pH 5,5). Reakcija aktivacije karboksilni skupin je potekala 30 minut (slika 35). Po tem sem nanodelce 3-krat spral z 2 mL pufru PBS z uporabo centrifuge (16 000 g, 5 minut).



Slika 35: Shematski prikaz aktivacije -COOH skupin z EDC in Sulfo-NHS.

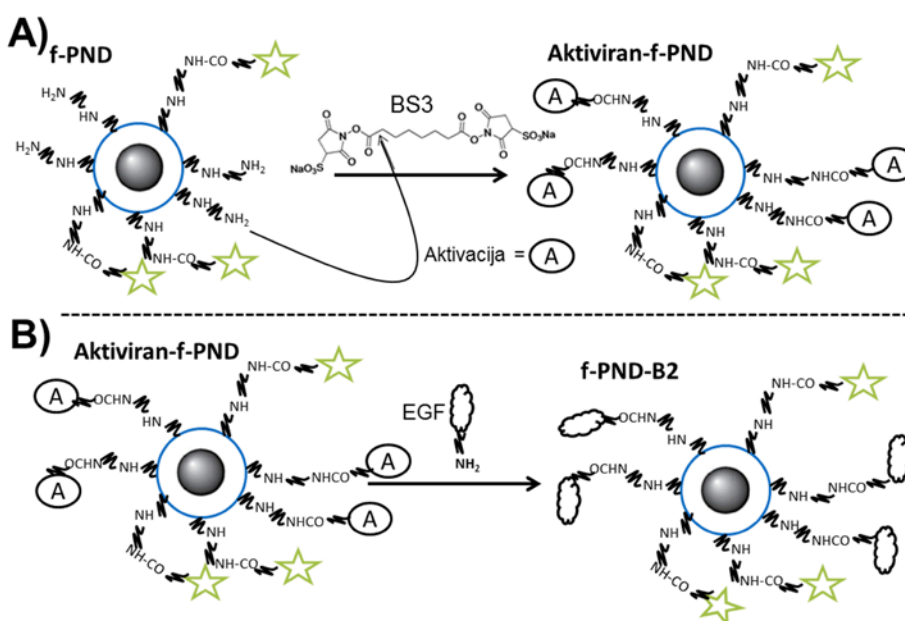
Nato sem v drugi stopnji aktivirane nanodelce dispergiral v pufru PBS in jim dodal EGF (30 μL , 1 mg/mL) ter reakcijsko zmes mešal 2 uri pri 4 $^{\circ}\text{C}$. Po dveh urah sem dodal 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (Tris, 30 μL , 0,1 mM) in mešal še 30 minut. Po koncu vezave sem suspenzijo biokonjugatov ultrafiltriral (30 kDa, NMWL, Millipore) ter tako odstranil ves nevezan EGF in Tris iz suspenzije. Vzporedno sem pripravil kontrolni vzorec, kjer sem namesto EGF uporabil Tris (30 μL , 0,1 mM). Biokonjugat sem imenoval f-NND-B1.



Slika 36: Shematski prikaz vezave EGF na aktivirane f-NND.

3.2.9.2 Kovalentna vezava EGF na nanodelce f-PND z uporabo povezovalne molekule BS3 (2. tip)

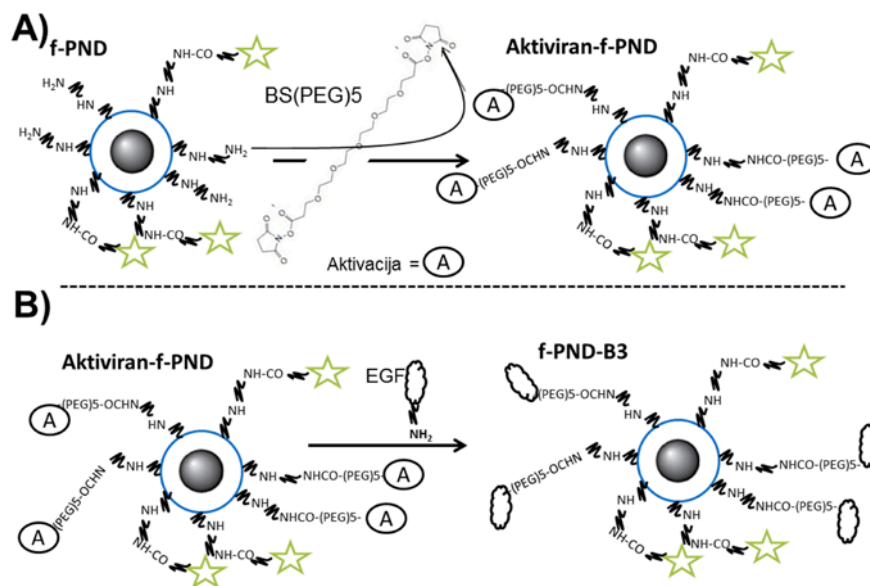
Bis(sulfosukcinimidil) suberat (BS3, 5,7 mg) sem raztopil v 0,5 mL DMF in ga dodal k suspenziji nanodelcev f-ND-Si-APMS (2 mL, 0,05 ut. %) v pufru PBS pri pH vrednosti 7,4 in reakcijsko zmes intenzivno mešal 2 uri (slika 37 (A)). Nato sem nanodelce 3-krat spral s pufrom PBS in tako odstranil ves nevezan BS3. Po spiranju sem nanodelce dispergiriral v pufru PBS in nadaljeval z reakcijo vezave EGF (slika 37 (B)). K suspenziji aktiviranih nanodelcev sem dodal EGF (15 μ L, 1 mg/mL) in reakcijsko zmes mešal 2 uri pri 4 °C. Po dveh urah sem dodal Tris (15 μ L, 0,1 mM) in mešal še 30 minut. Po koncu reakcije sem suspenzijo biokonjugatov spral s 3-krat po 2 mL puфра PBS in s tem odstranil nevezan EGF in Tris. Vzporedno sem pripravil kontrolni vzorec, kjer sem namesto EGF uporabil Tris (15 μ L, 0,1 mM). Biokonjugat sem imenoval f-PND-B2.



Slika 37: Shematski prikaz reakcije aktivacije f-PND z BS3 (A) in vezava EGF na aktivirane f-PND (B).

3.2.9.3 Kovalentna vezava EGF na nanodelce f-PND z uporabo povezovalne molekule BS(PEG)5 (3. tip)

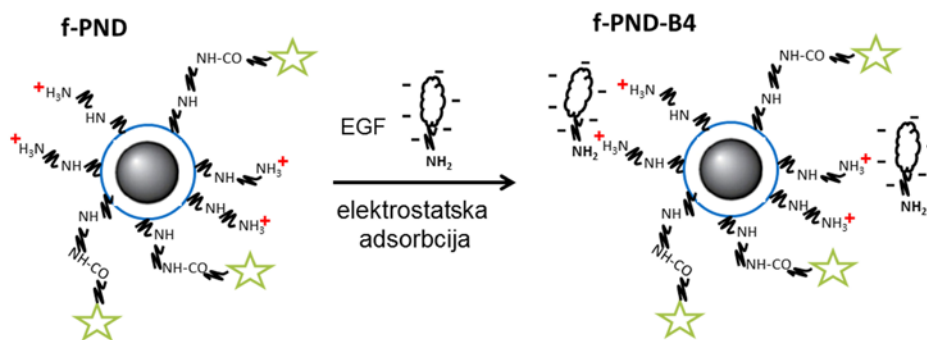
Bis(sukcinimidil)penta(etilenglikol) (BS(PEG)5, 5,3 mg) sem raztopil v 0,5 mL DMF in ga dodal k suspenziji nanodelcev f-ND-Si-APMS (2 mL, 0,05 ut. %) v pufru PBS pri pH vrednosti 7,4 in reakcijsko zmes intenzivno mešal 2 uri (slika 38 (A)). Nato sem nanodelce 3-krat spral s pufrom PBS in tako odstranil ves nevezan BS(PEG)5. Po spiranju sem nanodelce dispergiriral v pufru PBS in nadaljeval z reakcijo vezave EGF (slika 38 (B)). K suspenziji aktiviranih nanodelcev sem dodal EGF (15 μ L, 1 mg/mL) in reakcijsko zmes mešal 2 uri pri 4 °C. Po dveh urah sem dodal Tris (15 μ L, 0,1 mM) in mešal še 30 minut. Po koncu reakcije sem nanodelce spral s 3-krat po 2 mL puфра PBS in s tem odstranil nevezan EGF in Tris. Vzporedno sem pripravil kontrolni vzorec, kjer sem namesto EGF uporabil Tris (15 μ L, 0,1 mM). Biokonjugat sem imenoval f-PND-B3.



Slika 38: Shematski prikaz reakcije aktivacije f-PND z BS(PEG)5 (A) in vezava EGF na aktivirane f-PND (B).

3.2.9.4 Elektrostatska adsorbcija EGF na nanodelce f-ND-Si-APMS (4. tip)

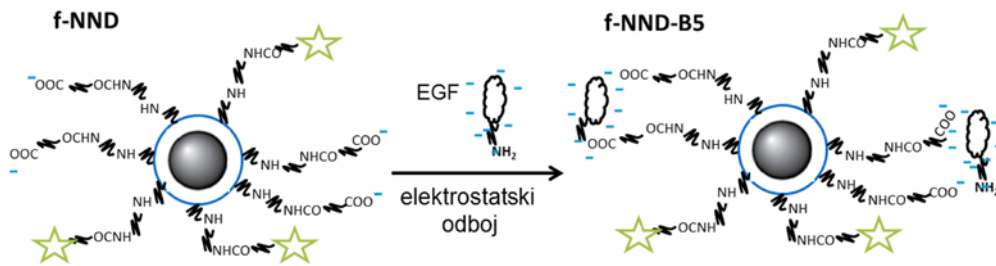
EGF (30 μ L, 1 mg/mL) sem dodal k suspenziji nanodelcev f-ND-Si-APMS (2mL, 0,1 ut.%) dispergiranih v pufru PBS (pH = 7,4) in reakcijsko mešanico intenzivno mešal 2 uri pri 4 °C. Po dveh urah sem dodal Tris (30 μ L, 0,1 mM) in mešal še 30 minut. Po koncu reakcije sem suspenzijo biokonjugatov ultrafiltriral (30 kDa, NMWL, Millipore) in s tem odstranil ves nevezan EGF in Tris iz suspenzije. Vzporedno sem pripravil kontrolni vzorec, kjer sem namesto EGF uporabil Tris (30 μ L, 0,1 mM). Biokonjugat sem imenoval f-PND-B4.



Slika 39: Shematski prikaz elektrostatske adsorbcije EGF na f-PND.

3.2.9.5 Elektrostatska adsorbcija EGF na nanodelce f-ND-Si-APMS-SA (5. tip)

EGF (30 μ L, 1 mg/mL) sem dodal k suspenziji nanodelcev f-ND-Si-APMS-SA (2mL, 0,1 ut.%) dispergiranih v pufru PBS (pH = 7,4) in reakcijsko mešanico intenzivno mešal 2 uri pri 4 °C. Po dveh urah sem dodal Tris (30 μ L, 0,1 mM) in mešal še 30 minut. Po koncu reakcije sem suspenzijo biokonjugatov ultrafiltriral (30 kDa, NMWL, Millipore) in s tem odstranil ves nevezan EGF in Tris iz suspenzije. Vzporedno sem pripravil kontrolni vzorec, kjer sem namesto EGF uporabil Tris (30 μ L, 0,1 mM). Biokonjugat sem imenoval f-NND-B5.



Slika 40: Shematski prikaz elektrostatske interakcije med EGF in f-NND.

3.3 Karakterizacijske tehnike

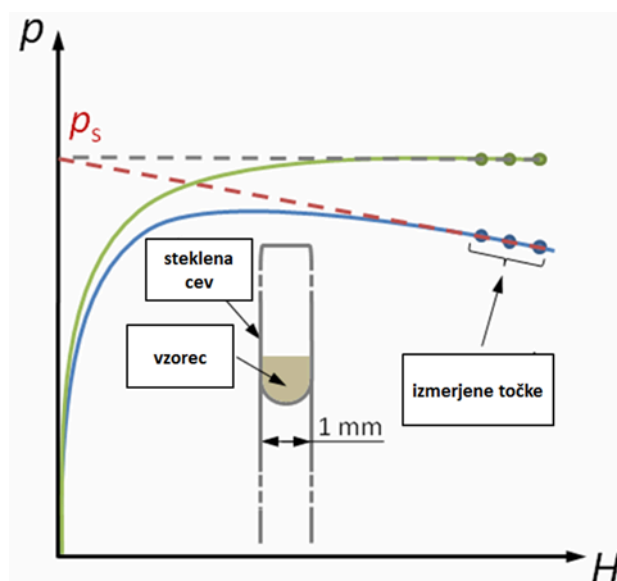
3.3.1 Meritve magnetnih lastnosti nanodelcev

Magnetizacije nanodelcev in nanodelcev prevlečenih s siliko v odvisnosti od magnetnega polja so bile izmerjene z magnetometrom z vibrirajočim vzorcem Lake Shore 7307 VSM. Jakost magnetnega polja je bila uravnavana od -1 T do 1 T.

3.3.1.1 Določitev obsega privzema nanodelcev v celice z magnetometrom s SQUID detektorjem

Za kvantitativno določitev obsega privzema superparamagnetnih nanodelcev v/na celice smo razvili novo metodo, kjer smo uporabili magnetometer SQUID z detektorjem Quantum Design MPMS XL-5.

Po privzemu nanodelcev v celice sem celice zbral v 75 μL pufru PBS in jih prestavil v posebno stekleno cev, primerno za meritve z magnetometrom SQUID. Prednost naše metode pred obstoječimi na SQUID-u je zmožnost meritve intaktnega vzorca celic v suspenziji. Tekoč vzorec sem vstavil na dno podaljšane cevi, kot je prikazano na sliki 41 in s tem zagotovil primerno lego vzorca v sredini cevi. Takšna postavitev najbolj zmanjša diamagnetni prispevek stene cevi. Dno cevi prav tako prispeva k izmerjenemu magnetnemu momentu, ampak ga poleg nosilne tekočine celic (pufer PBS) naknadno odštejemo s prileganjem eksperimentalnih vrednosti, izmerjenih pri visokih magnetnih poljih, linearni funkciji (slika 41). Edini nelinearni prispevek k celotnemu magnetnemu momentu je prispevek nanodelcev. Pri visokem magnetnem polju se krivulja magnetizacije nasiti in je zato nasičena magnetizacija enaka vrednosti y , kjer prilegana funkcija seka ordinato. Na ta način izničimo signal iz nosilca in nosilne tekočine ter tako skrajšamo pripravo vzorca na samo nekaj minut.



Slika 41: Shematski prikaz meritve odvisnosti magnetnega momenta od magnetnega polja, na podlagi katerega sem določil nasičeno magnetizacijo nanodelcev. Modra krivulja predstavlja izmerjene vrednosti, rdeča premica ekstrapolacijo in zelena krivulja izračunan prispevek magnetizma superparamagnetnih nanodelcev.

Najprej je bil izmerjen referenčni vzorec, ki je vseboval znano količino nanodelcev prevlečenih s tanko prevleko silike, kjer je bila nasičena magnetizacija ($M_s = 47 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$). Maso nanodelcev v razredčenem vzorcu lahko izračunamo po naslednji enačbi $m = p_s/M_s$, kjer je p_s izmerjen magnetni moment pri nasičenju. Meritev smo skrajšali na nekaj minut z merjenjem eksperimentalnih točk pri visokih magnetnih poljih. Samo dve točki sta dovolj za natančno določitev vrednosti p_s , iz katere lahko preračunamo maso nanodelcev. S sistematičnim merjenjem vzorcev z znano koncentracijo nanodelcev smo določili, da je metoda točna za vrednosti p_s višje od $10^{-5} \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$.

3.3.2 Rentgenska praškovna difrakcija

Rentgensko praškovno difrakcijo (XRD) v geometriji Θ - 2Θ (PANanalytical X'Pert PRO) sem uporabil za osnovno karakterizacijo sintetiziranih maghemitnih superparamagnetnih nanodelcev. Spektri XRD so bili posneti v območju 2Θ med 20 in 60° , s korakom $0,04^\circ$ in zadrževanjem 7 s na korak.

Iz uklonov XRD sem s pomočjo Sheerer-jeve metode in programa Diffra^{plus}TopasTM lahko izračunamo velikost nanodelcev [136].

Določanje velikosti nanodelcev po Sheerer-jevi metodi temelji na širitvi refleksov v spektru XRD, v skladu z enačbo 20:

$$d_x = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (20)$$

d_x	velikost kristalita
K	oblikovni faktor
λ	valovna dolžina rentgenskega žarka
β	širina uklona na polovični višini
θ	Bragg-ov kot

3.3.3 Presevna elektronska mikroskopija

S presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) smo karakterizirali kakovost prevlek silike na površinah magnetnih nanodelcev. Pri tem je bil uporabljen presewni elektronski mikroskop JEOL JEM 2010F, opremljen z analiznim sistemom EDXS (LINK ISIS EDS 300) pri napetosti 200 kV. Vzorce za TEM sem pripravil s sušenjem suspenzije nanodelcev na bakreni mrežici, ki podpira tanko nosilno plast iz amorfne ogljika.

3.3.3.1 Analiza privzema nanodelcev v celice s TEM

Po inkubaciji in privzemu nanodelcev v celice smo celice sprali s pufrom PBS in jih fiksirali s 4 % paraformaldehidom in 2 % glutaraldehidom v 0,1 M kakodilatnem pufru pri pH vrednosti 7,4 za 2,5 ure pri 4 °C. Po tem času smo celice sprali z 0,1 M kakodilatnim pufrom, ki je vseboval 0,33 M sukroze. Vzorec smo post-fiksirali v 1 % OsO₄ za 1 uro, dehidrirali z mešanico etanol/voda naraščajočih koncentracij in polimerizirali v smolo Epon812. Tanke rezine (debeline 40 – 70 nm), pripravljene z ultramikrotomom Leica EM UC6, smo zbrali na bakreni mrežici za TEM, ki je bila prevlečena s plastjo formvarja. Tak vzorec smo še kontrastirali z uranil acetatom in svinčevim citratom pred karakterizacijo na presewnem elektronskem mikroskopu Philips CM 100 pri napetosti 80 kV.

3.3.4 Termogravimetrična metoda

S termogravimetričnimi meritvami sem določal sestavo magnetne tekočine. V čist stehtan korundni lonček sem injiciral 1 mL vzorca magnetne tekočine in stehtal lonček z vzorcem. Po sušenju vzorca v navadnem sušilniku pri 60 °C čez noč sem vzorec ponovno stehtal. Suh vzorec sem dal v peč na T = 800 °C. Nato sem lonček z vzorcem ohladil in ponovno stehtal. Iz razlik mas po sušenju in po žganju na 800 °C sem določil koncentracije nanodelcev v suspenzijah in masni delež organske faze.

3.3.5 Raziskave kakovosti prevleke silike s testom raztapljanja

Raziskave kakovosti prevlek silike sem izvedel za suspenzije nanodelcev s tankimi plastmi silike. Magnetni nanodelci se zelo dobro raztapljajo v zelo kislem mediju, medtem ko silika v kislem praktično ni topna. Nanodelci s popolno in homogeno prevleko se zato precej počasneje raztapljajo kot tisti, kjer je prevleka silike nepopolna. Pri raziskavi sem spremljal koncentracije prisotnih ionov Fe v raztopini supernatanta po raztapljanju. Nižja kot je bila koncentracija ionov, bolj popolna je bila prevleka silike. Pri testu raztapljanja sem dodal 30 mL HCl (2,0 M) k 50 mL vodne suspenzije, ki je vsebovala 70 mg prevlečenih nanodelcev. Mešanico sem soniciral 1 uro in nato centrifugiral za 5 minut na 12 000 g. Odvzel sem 10 mL bistre raztopine supernatanta in jo razredčil na 100 mL z destilirano vodo, ter s pomočjo atomske adsorpcijske spektroskopije določil koncentracije Fe ionov.

3.3.6 Elektrokinetične meritve

Z elektrokinetičnimi meritvami sem določeval zeta potencial suspenzij nanodelcev. Pri tem sem uporabljal ζ-meter ZetaPALS Brookhaven Instruments Corporation. Vrednosti zeta potencialov suspenzij nanodelcev so bile pokazatelj stanja koloidne satbilnosti nanodelcev pri danih pogojih merjenja in površinske gostote naboja.

3.3.7 Meritve velikosti nanodelcev z dinamičnim sipanjem svetlobe

Hidrodinamske velikosti nanodelcev v suspenzijah sem določeval z dinamičnim sipanjem svetlobe (DLS) na napravi Fritsch Analysette 12 DynaSizer. Z analizo DLS sem pridobil informacije o številčni porazdelitvi velikosti nanodelcev v suspenzijah pri danih pogojih in posredne informacije o stanju koloidne stabilnosti nanodelcev v suspenzijah.

3.3.8 Konduktometrične titracije

S konduktometrično titracijo sem določeval površinsko koncentracijo amino skupin na nanodelcih. Pri tem sem uporabljal konduktometer Knick Portamess® 913 X Cond opremljen s celico za merjenje prevodnosti.

Konduktometrična titracija temelji na spremembi prevodnosti raztopin. V raztopinah oziroma suspenzijah so ioni prenašalci električnega naboja. Prevodnost raztopine se spremeni, če pride do reakcije med ioni ali do spremembe v njihovih koncentracijah. Vsak ion ima specifično molsko prevodnost (tabela 2). Suspenzijam nanodelcev z znano koncentracijo nanodelcev sem dodajal kislino HCl (1 mM), medtem ko sem meril prevodnost suspenzije. V točki 2 na sliki 42 kislina nevtralizira vse primarne in sekundarne skupine na površino nanodelcev vezanih molekul APMS. V tej točki, ki jo imenujemo ekvivalentna točka, so vsi H⁺ porabljeni in vsak naslednji dodatek kisline pomeni proste H⁺ v suspenziji. Ker imajo H⁺ zelo visoko ionsko prevodnost, začne v ekvivalentni točki prevodnost suspenzije hitro naraščati. V primeru, ko se med reakcijo koncentracija bolj prevodnega iona povečuje, prevodnost suspenzije hitreje narašča. Presežno kislino sem za kontrolo titriral z NaOH enake koncentracije. Pri tem so OH⁻ reagirali s prostimi H⁺, kjer je nastajala voda. Zaradi tega je prevodnost suspenzije padala vse do točke 3, kjer se je vsa prebitna kislina porabila. Konduktometrična titracija se lahko uporablja samo v primeru, ko je produkt reakcije oborina, plin ali slabo disociirana snov (voda).

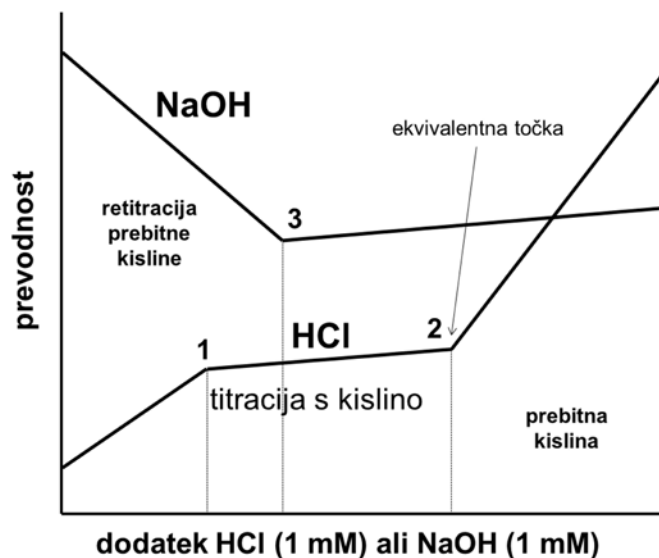
Konduktometrična titracija je zelo uporabna metoda, kadar določamo koncentracije amino skupin na površinah substratov ali delcev, kjer je površinska plast funkcionalnih molekul oziroma skupin zelo visoka. V takšnih primerih so alternativne spektroskopske metode, ki temeljijo na kovalentni vezi med kromoforom in amino skupino, lahko manj zanesljive. Molekule kromoforov so navadno precej večje od protona, zato ne morejo reagirati z vsemi amino skupinami (sterične ovire). V takšnih primerih torej določimo prenizke koncentracije aminov.

Tabela 2: *Specifične ionske prevodnosti ionov v vodi.*

Ion	Ionska prevodnost λ (mS m ² mol ⁻¹)
H ⁺	34,96
Na ⁺	5,01
Cl ⁻	19,91
OH ⁻	7,63

Eksperiment je potekal tako, da sem 5 mL testne suspenzije nanodelcev (20 mg nanodelcev) razredčil na 50 mL z destilirano vodo. Tej suspenziji sem meril prevodnost med dodajanjem raztopine 1,0 mM HCl (aliquoti po 0,25 mL, celokupni volumen 20 mL). Za kontrolo sem suspenzije retitriral z 20 mL raztopine 1,0 mM NaOH. Shematsko sta krivulji titracije s kislino in retitracije z bazo prikazani na sliki 42. Vsak eksperiment sem ponovil 3-krat na novo pripravljene suspenziji in rezultat je povprečje treh meritev.

Dodatek kisline (20 mL) je zagotavljal, da so vse površinske amino skupine nevtralizirane in da je opazen karakterističen prelom krivulje. Iz porabe kisline v točki preloma – ekvivalentni točki (točka 2 na sliki 42) sem preračunal število amino skupin na maso nanodelcev oziroma število amino skupin na 1 nm^2 površine nanodelcev.



Slika 42: Določitev ekvivalentne točke s konduktometrično titracijo.

3.3.9 Infrardeča in masna spektroskopija

Sintetizirana reagentna (APMS-SA)¹ in (APMS-SA)² sta bila ovrednotena s spektrometrom ATR FTIR (Dura Sample IR-Technologies Dunbury, ZDA) in visokoločljivostnim masnim spektrometrom (HRMS) (AutospecQ, Micromass, VB).

3.3.10 Testi citotoksičnosti

Celice MCF10A neoT in celice PC-3 so bile pripravljene v monokulturah na celičnih ploščah, kjer so se razrastle do konfluentnosti. Celice so bile inkubirane z različnimi koncentracijami nanodelcev do 24 ur, nato so bile označene s propidijevim jodidom (PI) in karakterizirane s pretočnim citometrom FACSCalibur na detektorju FL-2 (Becton Dickinson, Inc., ZDA). Uporabljena je bila kompenzacija FL-2–FL-1 za zmanjšanje efekta privzetih fluorescentnih nanodelcev na detektorju FL-2. Celice, ki niso privzele PI smo klasificirali kot žive. Citotoksičnost nanodelcev je bila preračunana na odstotek živih celic v primerjavi s kontrolnim vzorcem, ki je bil inkubiran brez nanodelcev.

3.3.11 Določanje obsega privzema nanodelcev v celice s pretočnim citometrom

Raziskave celičnega privzema fluorescentnih nanodelcev so bile izvedene na pretočnem citometru. Najprej so bile pripravljene celice, ki so se razrasle na ploščah do konfluentnosti. 1 mL vzorca, ki je vseboval $25 \mu\text{g}$ nanodelcev v gojišču, je bil dodan k celicam in nato inkubiran pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ za 4 ure. Po tem so bile celice sprane s pufrom PBS in tako odstranjeni nanodelci, ki se niso privzeli. Celice so bile deadherirane s tripsinom. Kot kontrola je služil vzorec celic, ki je bil inkubiran brez prisotnosti nanodelcev. Uporabljen je bil pretočni citometer FACSCalibur (Becton Dickinson, ZDA). Obseg

privzema fluorescentnih nanodelcev je bil detektiran kot sprememba na detektorju sipane svetlobe in kot sprememba v zeleni fluorescenci celic z uporabo detektorja FL-1.

3.3.12 Fluorescenčna mikroskopija celic

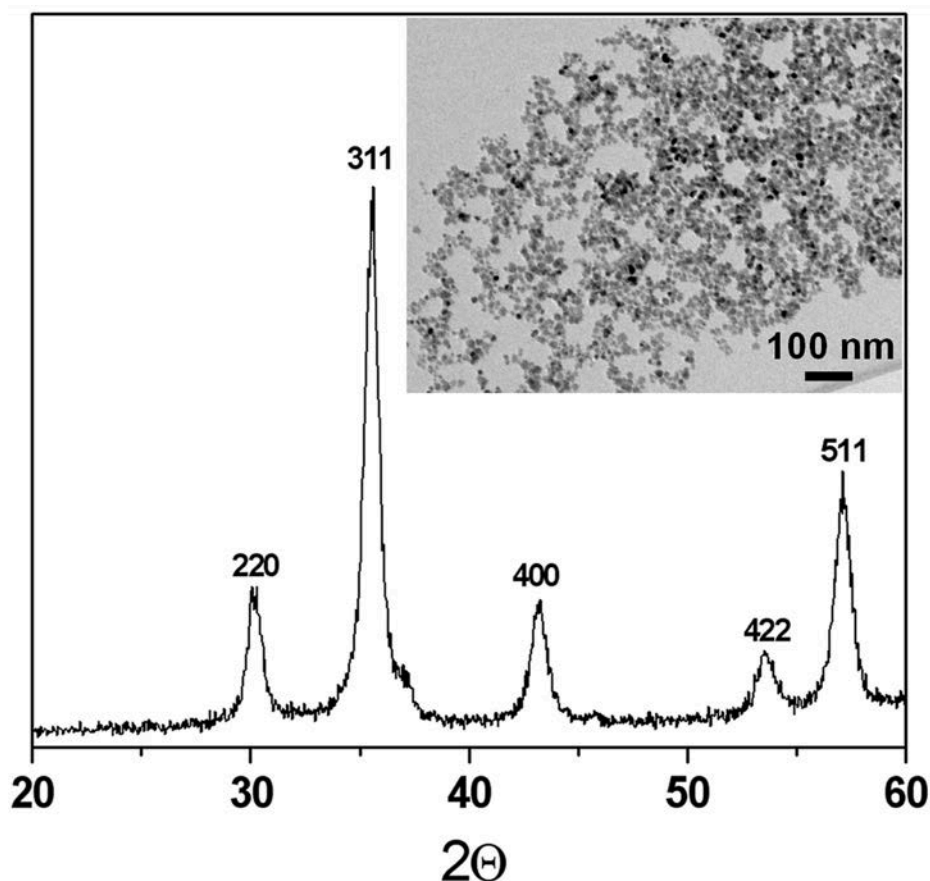
Celice MCF10A neoT in PC-3 so rastle v monokulturah na ploščah do konfluentnosti. K celicam, ki so bile nato inkubirane pri 37 °C za 4 ure, je bil najprej dodan 1 mL suspenzije nanodelcev (25 µg) v gojišču. Po tem so bile celice sprane s pufrom PBS in tako odstranjeni nanodelci, ki se niso privzeli. Nato so bile celice fiksirane s 4 % paraformaldehidom v pufru PBS za 30 minut. Vzorec je bil posnet na mikroskopu Olympus IX/81 opremljenim s filtrom Dapi/FITC/TxRed in obdelan s programom CellR Imaging.

Pri raziskavi kolokalizacije so bile celice inkubirane s fluorescentnimi nanodelci, na kar so bile po inkubaciji sprane s pufrom PBS, fiksirane s 4 % paraformaldehidom v pufru PBS za 30 minut in permealizirane za 10 minut z 0,1 % Triton X-100 v pufru PBS. Nespecifično obarvanje je bilo preprečeno s 3 % BSA v pufru PBS. Lizosomi so bili označeni s kunčjim poliklonskim protitelesom anti-LAMP-1 (cianin) (Sigma, ZDA) in endosomi s protitelesi anti-EEA-1 (Sigma, ZDA). Po dveh urah inkubacije so bile celice 3–krat sprane s pufrom PBS in 2 uri inkubirane s primernim AlexaFluor-555 označenim sekundarnim protitelesom (2:1000, Molecular Probes, Invitrogen, ZDA). Po spiranju s pufrom PBS je bil kit ProLong Antifade (Molecular Probes) nanešen na suho ploščo in sušen čez noč pri 4 °C. Analiza na konfokalnem mikroskopu je bila izvedena pri sobni temperaturi na mikroskopom Carl Zeiss LSM 510. Slike so bile analizirane s programom Carl Zeiss LSM image software 3,0.

4 Rezultati

4.1 Sinteza magnetnih nanodelcev

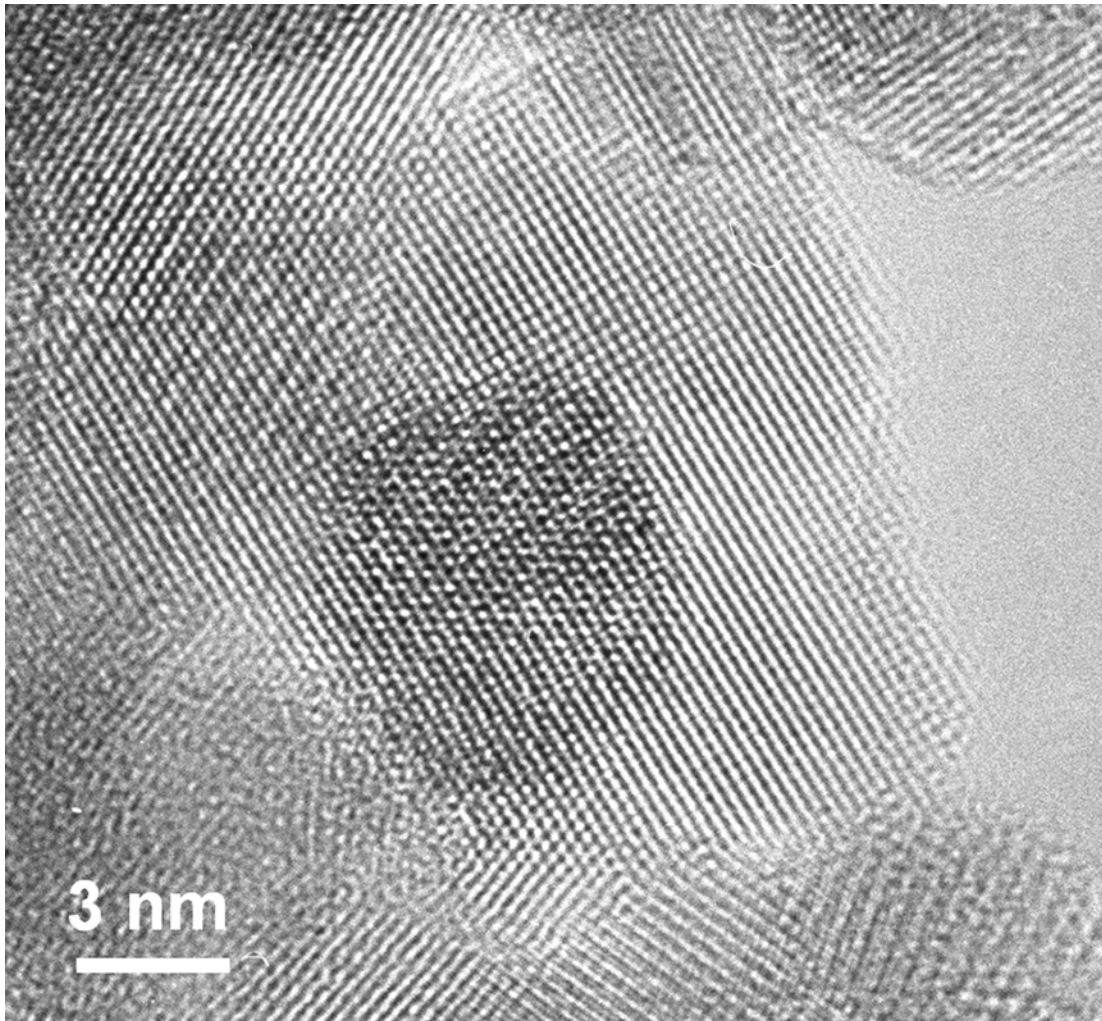
Maghemitne nanodelce sem sintetiziral s soobarjanjem $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ionov v dveh stopnjah iz vodnih raztopin s koncentrirano vodno raztopino amonijevega hidroksida. Sintetizirane magnetne nanodelce sem analiziral z XRD, ki je pokazala uklone spinelne faze (slika 43). Poznamo dva različna železova oksida s spinelno strukturo, in sicer magnetit (Fe_3O_4) in maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Na podlagi analize XRD je težko ločiti med tema spineloma, saj imata zelo podobni kristalni strukturi. V magnetitu je tretjina železovih ionov dvovalentnih, medtem ko so v maghemitu teoretično vsi železovi ioni trivalentni. Klasična kemijska analiza z razklopom in titriranjem je pokazala [137], da je v našem železovem oksidu prisotnih manj kot 3% Fe^{2+} ionov [82], kar pomeni, da je sintetiziran material maghemit.



Slika 43: Rentgenski difraktogram in TEM posnetek sintetiziranih nanodelcev ND.

Iz uklonov XRD sem s pomočjo Sheerer–jeve metode in programa Diffrac^{plus}TopasTM določil velikost kristalitev, ki je znašala 14,4 nm. Izračunana velikost kristalitev na podlagi rentgenskega difraktograma se je dobro ujemala z izmerjeno velikostjo

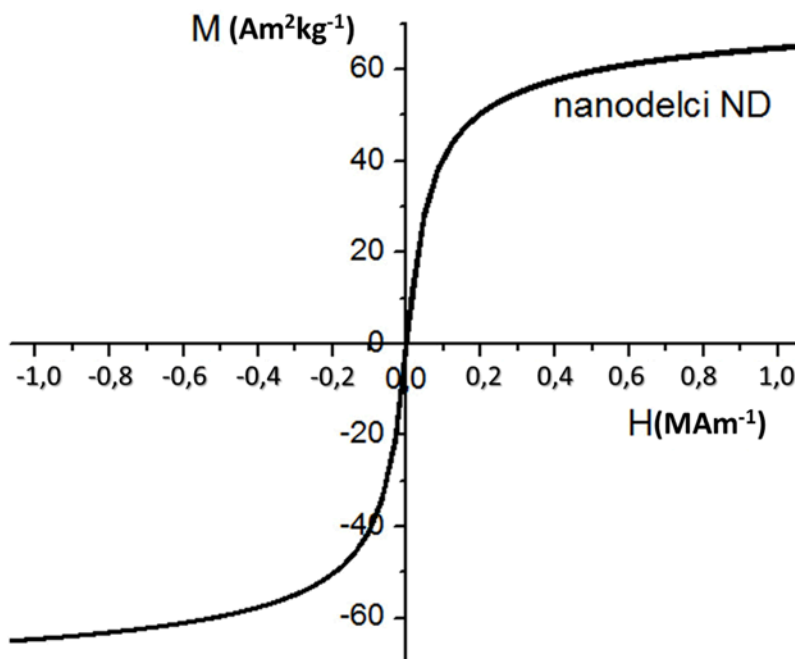
nanodelcev na podlagi posnetkov TEM, kjer sem določil velikost (ekvivalentni premer) $13,6 \pm 2,7$ nm (posnetek TEM na sliki 43). Izračunana specifična površina nanodelcev ND je znašala $84,4$ m²/g.



Slika 44: HREM posnetek sintetiziranih nanodelcev ND.

Slika 44 prikazuje TEM posnetek nanodelcev ND posnet pri pogojih visoke ločljivosti (HREM). Na sliki vidimo periodične proge, ki tvorijo mrežne slike posameznih nanodelcev. Periodične proge se končajo na sami površini nanodelca. To dokazuje, da na nanodelcih ni prisotnen amorfni površinski sloj znatne debeline.

Slika 45 prikazuje meritev specifične magnetizacije nanodelcev ND v odvisnosti od magnetnega polja. Krivulja ne izkazuje remanence, kar kaže na superparamagneten material. Nasičena magnetizacija nanodelcev ND je relativno visoka in znaša $66,1$ Am²kg⁻¹. Zaradi vpliva velike specifične površine pri nanodelcih je njihova nasičena magnetizacija nižja od nasičene magnetizacije grobozrnatega maghemita, ki znaša 74 Am²kg⁻¹ [5].



Slika 45: Specifična magnetizacija sintetiziranih nanodelcev izmerjena z magnetometrom VSM.

4.2 Priprava stabilne suspenzije magnetnih nanodelcev

Pogoj za uspešno izvajanje reakcij na površinah nanodelcev je priprava stabilne suspenzije magnetnih nanodelcev. To pomeni, da je potrebno ustvariti odbojne sile med nanodelci, ki so večje od privlačnih van der Waals-ovih sil. Pri svojem doktorskem delu sem v ta namen izbral citronsko kislino, ki poveča površinski naboj (zeta potencial) nanodelcev v suspenziji in s tem ustvari dovolj močne elektrostatske odbojne sile med nanodelci.

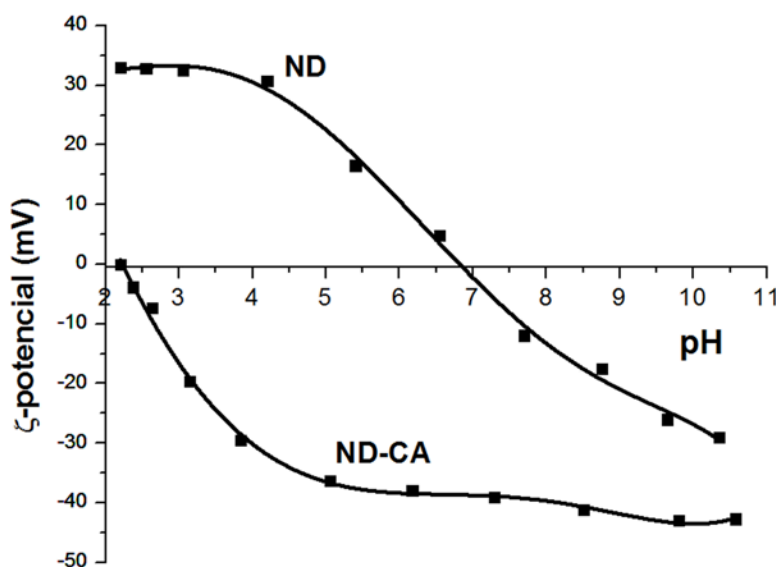
Na površinah nanodelcev ND v vodnem mediju so prisotne površinske hidroksilne skupine, ki so lahko posledica adsorpcije molekul vode ali pa so del strukture nanodelca. V kislem so v protonirani obliki, kar prispeva k pozitivnem zeta potencialu suspenzije nanodelcev v tem območju pH in deprotonirane v alkalnem, kar prispeva k negativnem zeta potencialu nanodelcev ND v alkalnem [12, 138]. Pri vrednosti $\text{pH} \sim 7$ je koncentracija protoniranih in deprotoniranih karboksilnih skupin enaka in to vrednost pH imenujemo izoelektrična točka. Pri tej vrednosti pH je neto naboj enak nič [12]. Suspenzije nanodelcev sicer izkazujejo pozitiven zeta potencial pri $\text{pH} < 7$ in negativen pri vrednostih $\text{pH} > 7$, vendar je po absolutni vrednosti zeta potencial premajhen, da bi zagotavljal primerno koloidno stabilnost suspenzij tekom tvorbe prevlek silike na površinah nanodelcev. Nanodelci imajo prenizko koncentracijo površinskih nabitih skupin, da bi zagotovili dovolj visoko gostoto naboja na površinah (zeta potencial), ki bi omogočala pripravo stabilne koloidne suspenzije nanodelcev. To je bil razlog, da sem pred prevlečenjem nanodelcev s siliko pripravil stabilne koloidne suspenzije. Pri tem sem kot surfaktant izbral citronsko kislino, ki zagotovi optimalno stabilnost suspenzij (elektrostatska stabilizacija) tekom nadaljne reakcije prevlečenja nanodelcev s siliko.

Sintetizirane magnetne nanodelce ND sem pred adsorpcijo citronske kisline na površine nanodelcev dobro spral z razredčeno raztopino NH_4OH ($\text{pH} \sim 10,3$). S tem sem zagotovil, da se nanodelci ND niso približali izoelektrični točki ($\text{pH} \sim 6,8$) in tako preprečil ireverzibilno aglomeracijo sintetiziranih nanodelcev ter omogočil uspešno vezavo citronske kisline. Citronska kislina ima tri karboksilne skupine s pripadajočimi

pK_a vrednostmi, ki so pokazatelj stopnje disociacije. Glede na pH raztopine se citronska kislina nahaja v različnih disociacijskih oblikah, ki so povezane s pK_a vrednostmi karboksilnih skupin. Pri pH vrednostih nižjih od $pH = 1$ citronska kislina v nedisociirani obliki, pri pH vrednostih med $pH = 3 - 5$ ima večina citronske kisline disociirano eno karboksilno skupino, pri pH vrednostih med $pH = 5 - 6,5$ ima citronska kislina v večini dve disociirani karboksilni skupini in pri pH vrednostih višjih od $pH = 9$ je citronska kislina v popolnoma disociirani obliki [139, 140].

Pri vrednosti $pH = 5,2$, kjer sem izvajal adsorbcijo citronske kisline na površine nanodelcev, sta večinoma dve karboksilni skupini citronske kisline disociirani - negativno nabiti [139]. Pri tej vrednosti pH je potekala adsorbcija citronske kisline na površine nanodelcev. Ker nanodelci ND izkazujejo pozitiven zeta potencial pri tej vrednosti pH , kot je razvidno iz slike 46, je pri teh pogojih prišlo do adsorbcije disociiranih karboksilnih skupin citronske kisline na površine nanodelcev. Po koncu reakcije vezave citronske kisline na nanodelce sem zvišal vrednost pH na 10,1, kjer je povsem disociirana tudi tretja karboksilna skupina citronske kisline, ki zagotavlja negativen naboj. Adsorbcija citronske kisline zagotovi povišano gostoto negativnega naboja na površinah nanodelcev, kar pomeni zelo negativen zeta potencial (-40 mV) v območju $pH > 4$ in posledično dobro koloidno stabilnost suspenzije nanodelcev ND-CA v alkalnem. Nadaljne reakcije prevlečenja nanodelcev s siliko sem izvajal zato v alkalnem mediju.

Osnovna stabilna koloidna suspenzija nanodelcev ND-CA je vsebovala največ 2 ut. % nanodelcev in je bila primerna za pripravo tankih prevlek silike [140]. Če sem osnovno suspenzijo nanodelcev ND-CA predhodno spral z acetonom, sem uspel pripraviti stabilno vodno suspenzijo nanodelcev ND-CA z 15 ut. % nanodelcev. V tem primeru iz suspenzije nanodelcev ND-CA odstranimo precej nevezane citronske kisline, ki zaradi povečane ionske jakosti negativno vpliva na koloidno stabilnost. Debelejše prevleke silike na površinah nanodelcev sem lahko pripravil le iz suspenzij ND-CA spranih z acetonom, saj je pri sintezi le-teh sistem občuljivejši na povečano ionsko jakost.



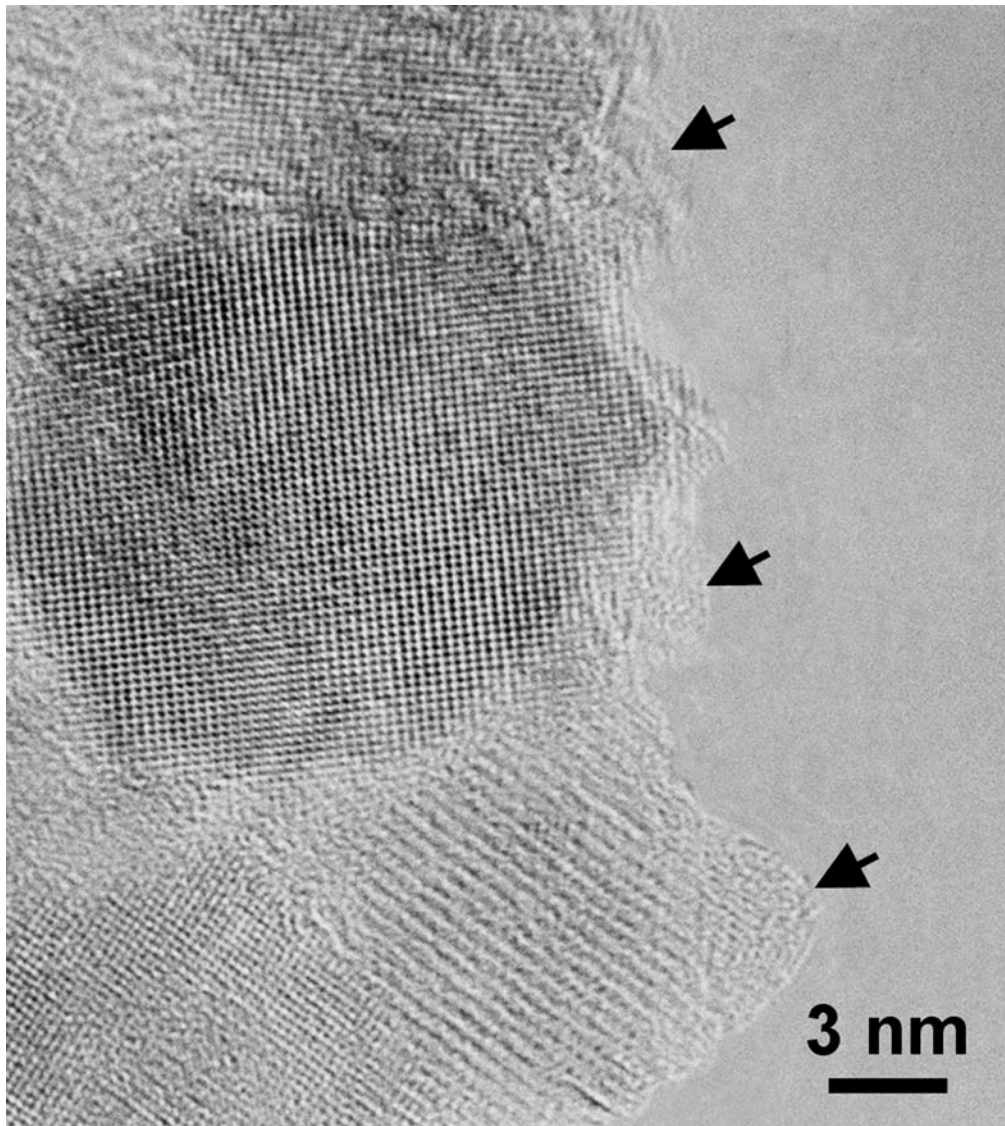
Slika 46: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH suspenzij osnovnih nanodelcev ND-CA in nanodelcev ND.

Termogravimetrična analiza stabilne vodne suspenzije nanodelcev ND-CA je pokazala bodisi 2 ut. % nanodelcev pri suspenziji, ki ni bila očiščena z acetonom in okoli 15 ut. % nanodelcev, kadar je bila suspenzija predhodno očiščena odvečne citronske kisline.

Na sliki 47 je HREM posnetek nanodelcev ND-CA, kjer lahko opazimo precej grobo

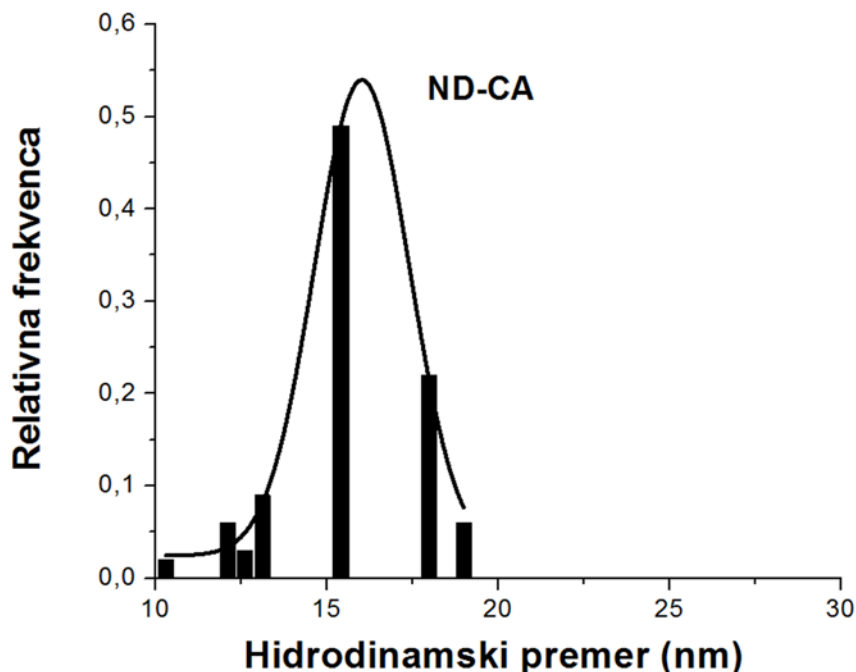
površino nanodelcev, ki nakazuje na možnost reakcije med površino in tekočim medijem. Pogosto sem na površinah nanodelcev ND-CA opazil amorfno fazo v obliki majhnih delcev (označeno s puščico na sliki 47). Analiza EDXS tega področja je pokazala le prisotnost atomov Fe, C in O. Amorfnost faza je pod snopom elektronov pri analizi TEM kristalizirala. Predvidevam lahko, da amorfnost sloj predstavlja železov citrat, ki nastane z interakcijo med citronsko kislino in atomi železa na površini nanodelcev.

Citronska kislina je močan kompleksant, zato se lahko iz površine nanodelcev odtoplja železo v obliki železovega citrata. To je razlog, da je potrebno suspenzije nanodelcev ND-CA pripravljati sproti.



Slika 47: HREM posnetek nanodelcev ND-CA.

Na uspešnost vezave citronske kisline na površine nanodelcev ima največji vpliv vrednost pH, kjer se citronska kislina adsorbira na nanodelce. Poleg tega imajo vpliv tudi količina dodane citronske kisline in temperatura, pri kateri je reakcija vezave potekala [140]. Hidrodinamsko velikost nanodelcev ND-CA v predhodno z acetonom sprani suspenziji (pH \sim 9, γ = 2 ut. %) sem izmeril s pomočjo meritve DLS. Na sliki 48 je prikazana številsko utežena porazdelitev velikosti nanodelcev ND-CA s povprečno hidrodinamsko velikostjo nanodelcev okoli 17 nm. Rezultat se dobro ujema z velikostjo nanodelcev določeno na podlagi posnetkov TEM in analize XRD za nanodelce ND.



Slika 48: Številsko utežena porazdelitev hidrodinamskih velikosti nanodelcev ND-CA v vodni suspenziji pri vrednosti pH 10, izmerjena s pomočjo DLS. Krivulja predstavlja regresijo Gaussove porazdelitvene funkcije na empirično porazdelitev.

4.3 Prevlečenje nanodelcev ND-CA s prevlekami silike

Za nadaljno vezavo različnih molekul na magnetne nanodelce je v številnih primerih njihove uporabe željeno, da lahko na površine nanodelcev vežemo veliko gostoto funkcionalnih molekul z močnimi vezmi (kovalentnimi vezmi). Problem pri nadaljnjih reakcijah na površinah nanodelcev ND je njihova tendenca po aglomeraciji in nizka koncentracija –OH skupin na površini, ki je vzrok za njihovo relativno inertnost. Dobro koloidno stabilnost suspenzije dosežemo z adsorbicijo citronske kisline na površine nanodelcev ND. Tako pripravljena suspenzija nanodelcev ni najuporabnejša za nadaljne vezave različnih organskih molekul. Citronska kislina s svojo prosto karboksilno skupino sicer omogoča nastanek kovalentne vezi z organskimi molekulami, vendar je problematično raztapljanje nanodelcev. Iz površine nanodelcev se namreč odtaplja železov citrat.

Rešitev, ki sem jo v svojem doktorskem delu izbral, je enakomerna prevleka silike. Takšna prevleka zagotavlja visoko koncentracijo silanolnih Si–OH skupin na svoji površini, ki omogočajo nastanek močnih kovalentnih vezi s silanskimi molekulami.

Prevleka silike lahko nukleira na površinah nanodelcev po hidrolizi TEOS-a in kondenzaciji Si(OH)₄. Ker je TEOS slabo topen v vodni raztopini, ga je potrebno vodni suspenziji nanodelcev dodati v obliki etanolne raztopine. Prevleka silike se lahko tvori s heterogeno nukleacijo silike na površinah, kar privede do nastanka enakomernih prevlek. Kompetitivna reakcija je homogena nukleacija silike v raztopini in tvorba nanodelcev silike. Za pripravo tankih enakomernih plasti silike je željeno, da izberemo takšne sintezne pogoje, ki omogočajo heterogeno nukleacijo. To pa zavisi od koncentracije suspenzije nanodelcev, koncentracije etanola med reakcijo, tipa in količine katalizatorja. Vse to vpliva na hitrost hidrolize TEOS-a in na hitrost kondenzacije Si(OH)₄. Mehanizem reakcije z enačbami je podan v uvodnem poglavju 1.5.1 »Prevlečenje nanodelcev s siliko«.

4.3.1 Priprava tankih (do 2 nm) prevlek silike

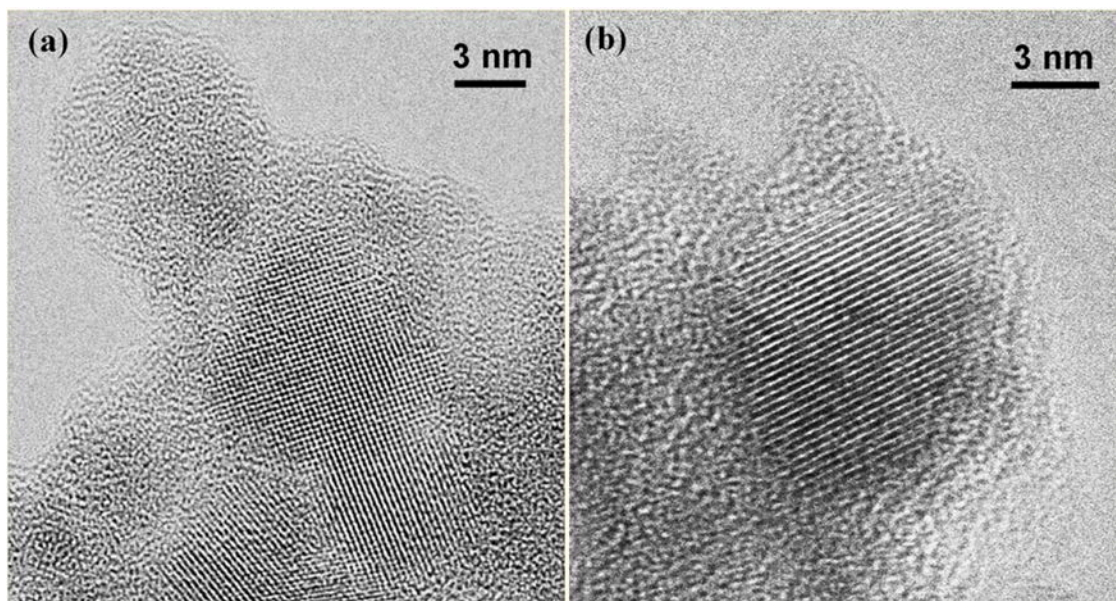
V svojem doktorskem delu sem raziskoval reakcijske pogoje za sintezo enakomernih prevlek silike na površinah nanodelcev. V ta namen sem sintetiziral tanke prevleke silike, pri čemer sem preučeval vpliv različnih parametrov na kakovost prevlek. Enakomerne prevleke silike na površinah nanodelcev nastanejo kot posledica reakcije heterogene nukleacije silike. Reakcijske pogoje, ki sem jih pri raziskavi prevlečenja nanodelcev s siliko spreminjal, sem podal v tabeli 3.

Tabela 3: Seznam sintetiziranih vzorcev, pri katerih sem spreminjal reakcijske pogoje. Podani so tudi rezultati meritev nasičene magnetizacije M_s , analize sestave nanodelcev EDXS in koncentracije ionov Fe v raztopini pri testu raztapljanja. (/) pomeni, da vzorec ni bil izmerjen.

Vzorec	Koncentracija TEOS-a v EtOH (ut.%)	Koncentracija suspenzije (ut.%)	M_s ($\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$)	Sestava izmerjena z EDXS (ut.% SiO_2)	Konc. Fe (mg/L)
ND-Si2-N11	10	2	/	38,2±4,3	28,5
ND-Si2-K11	10	2	/	33,5±4,7	26,0
ND-Si2-N12	10	2	/	35,3±3,9	28,1
ND-Si2-K12_1	10	2	/	32,1±3,3	17,9
ND-Si2-K12_2	3	2	/	/	/
ND-Si2-K12_3	1	2	/	/	/
ND-Si2-K12_4	10	0,5	31,5	35,0±3,0	14,3
ND-Si2-K12_5	10	0,1	/	7,50±1,5	29,7
ND-Si1-K12	10	0,5	46,3	16,3±2,2	/
ND-Si0.5-K12	10	0,5	50,9	6,20±0,6	/
ND-Si0.25-K12	10	0,5	58,5	4,70±0,6	/

Tanke prevleke silike na površinah dobro dispergiranih nanodelcev ND-CA (osnovna suspenzija) sem sintetiziral s hidrolizo TEOS-a in polikondenzacijo nastale $\text{Si}(\text{OH})_4$ v prisotnosti alkalnega katalizatorja. Pri tem sem sistematično spreminjal eksperimentalne pogoje, da bi na ta način ugotovil njihov vpliv na kakovost (enakomernost) prevlek.

Najprej sem preučeval vpliv tipa katalizatorja. Na sliki 49 sta prikazana HREM posnetka nanodelcev ND-Si2-N12 in ND-Si2-K12_1. Nanodelce ND-Si2-N12 sem prevlekel z uporabo katalizatorja NH_4OH in nanodelce ND-Si2-K12_1 z uporabo katalizatorja KOH , pri čemer so bili vsi ostali reakcijski pogoji identični (razmerje TEOS/etanol, pH ~ 12, dodatek TEOS-a). Pri teh pogojih prevlečenja nanodelcev sem sintetiziral relativno enakomerno prevleko silike, ki se jasno vidi na površinah kristaliničnih nanodelcev.



Slika 49: HREM posnetka nanodelcev prevlečenih z 2 nm debelo prevleko SiO_2 z uporabo katalizatorja NH_4OH (vzorec ND-Si2-N12) (a) ali KOH (vzorec ND-Si2-K12_1) (b).

Amorfne prevleke smo analizirali z analizo EDXS pri visoki lateralni resoluciji in potrdili visoko vsebnost atomov Si, kar potrjuje, da je prevleka amorfna plast silike. Kvantitativna analiza EDXS, ki smo jo izvajali na vsaj 10 različnih področjih za vsak vzorec, je pokazala primerljive vrednosti z nominalno vrednostjo 2 nm debele prevleke silike. Vsebnost Si znaša 36,2 ut.%, medtem ko preostali odstotek do 100 % predstavlja železov oksid. Nominalno vrednost sem izračunal na podlagi specifične površine, srednje velikosti nanodelcev in predvidene debeline prevleke. V primeru uporabe katalizatorja KOH smo zaznali povišano vrednost kalija v amorfni področjih, kjer pa je njegovo vsebnost težko določiti, saj hitro migrira pod snopom elektronov. Na podlagi analize TEM smo pri vzorcu nanodelcev ND-Si2-K12_1 le redko opazili področja, ki niso bila prekrita s prevleko. Pri vzorcu nanodelcev ND-Si2-N12, kjer je bil uporabljen katalizator NH_4OH , smo pa ponekod opazili nanodelce silike, ki so nastali kot produkt homogene nukleacije in so se adsorbirali na magnetne nanodelce (slika 49 (a), delec zgoraj desno). Primerjava obeh vzorcev nakazuje, da je v primeru uporabe katalizatorja KOH prevleka bolj enakomerna, čeprav je hkrati tudi bolj groba. Večja nagubanost prevleke je lahko prednost pri nadaljnjih reakcijah na površinah nanodelcev, saj poveča specifično površino. Predvidevam, da prisotnost kalija vpliva na rast prevleke.

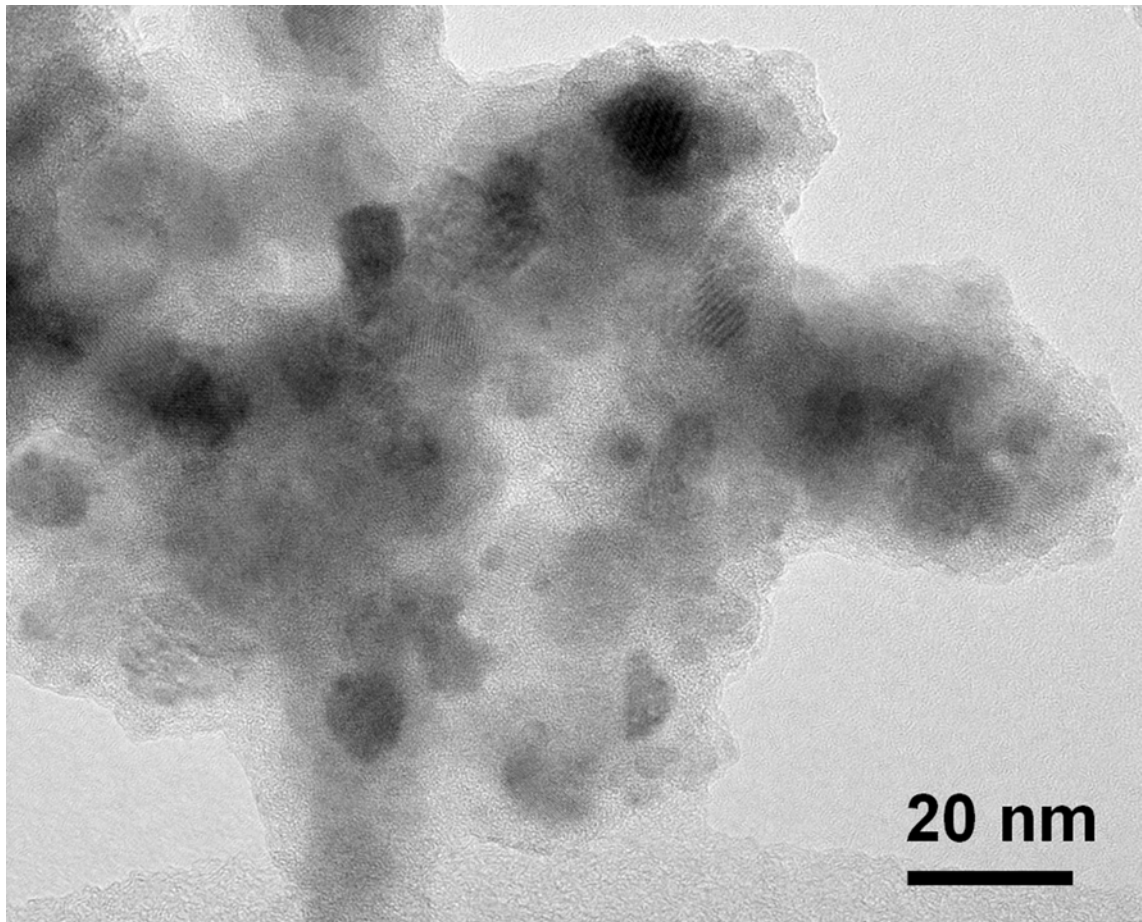
Samo na podlagi analiz TEM je težko natančno oceniti kakovost prevlek, saj lahko na ta način pregledamo le nekaj 10 nanodelcev. S tem razlogom sem izbral test raztapljanja nanodelcev v kislem, ki daje informacijo o kakovosti prevlek za celoten vzorec. Maghemitni nanodelci se v kislem dobro raztapljajo, medtem ko je prevleka silike praktično netopna. Nanodelci z bolj enakomerno prevleko se zato počasneje raztapljajo kot tisti, ki imajo nepopolne prevleke. V primeru raztapljanja neprevlečenih nanodelcev ND je koncentracija ionov Fe znašala 32 mg/L. Rezultati testa raztapljanja so podani v tabeli 3 in so pokazali, da uporaba katalizatorja KOH vodi do nastanka bolj enakomernih prevlek silike. Koncentracije ionov Fe v raztopini supernatanta po raztapljanju v kislem so v primeru uporabe katalizatorja KOH nižje, kot v primeru uporabe NH_4OH . Različni dodatki baze (vrednost pH 11 ali 12) tekom reakcije prav tako vplivajo na kakovost prevleke. Test raztapljanja je pokazal enakomernejše prevleke pri višji vrednosti pH.

Sposobnost kontroliranja koncentracije silicijeve kisline v suspenziji nam omogoča, da reakcijo vodimo v smer heterogene nukleacije. To lahko dosežemo, če je hitrost hidrolize

TEOS-a nekoliko nižja od hitrosti kondenzacije nastale Si(OH)_4 [76]. Če dosežemo prenasičenje silicijeve kisline, torej če je hidroliza TEOS-a hitrejša od kondenzacije Si(OH)_4 , potem se zelo verjetno del Si(OH)_4 homogeno kondenzira v suspenziji.

Vpliv vrednosti pH na hitrost hidrolize TEOS-a in kondenzacije nastale Si(OH)_4 je preučeval že Pope s sodelavci [57]. V nevtralnem področju je hitrost hidrolize TEOS-a precej nižja od hitrosti kondenzacije Si(OH)_4 , v alkalnem pri vrednosti pH 11 in še očitneje pri pH 12 pa je hitrost hidrolize že precej višja od hitrosti kondenzacije. Na podlagi vpliva vrednosti pH na potek reakcije bi lahko sklepal, da pri vrednosti pH 12 preferenčno poteka homogena nukleacija. Rezultati naših analiz pa kažejo, da sem pri vrednosti pH 12 in uporabi katalizatorja KOH uspel sintetizirati enakomerne prevleke silike brez prisotnosti nanodelcev silike. To nakazuje, da vrednost pH ni edini oziroma najpomembnejši dejavnik pri favoriziranju heterogene nukleacije, temveč imajo pomembno vlogo tudi koncentracija etanola in koncentracija vodne suspenzije med potekom reakcije prevlečenja.

Preučeval sem vpliv koncentracije etanola v reakcijski zmesi na kakovost prevlek, pri čemer sem ob konstantni količini TEOS-a zmanjševal koncentracijo raztopine TEOS/etanol oziroma razredčil reakcijsko zmes z etanolom. Ker ima etanol nižjo dielektrično konstanto v primerjavi z vodo, sem s tem znižal absolutno vrednost zeta potenciala nanodelcem v etanolno-vodni suspenziji. To je vplivalo na povečano aglomeracijo nanodelcev med samo reakcijo prevlečenja s siliko, kar je imelo za posledico neenakomerno prevlečenje skupkov nanodelcev. Na sliki 50 lahko opazimo neenakomerno prevlečene aglomerate nanodelcev, kjer so neprevlečeni nanodelci pogosto v kontaktu drug z drugim.

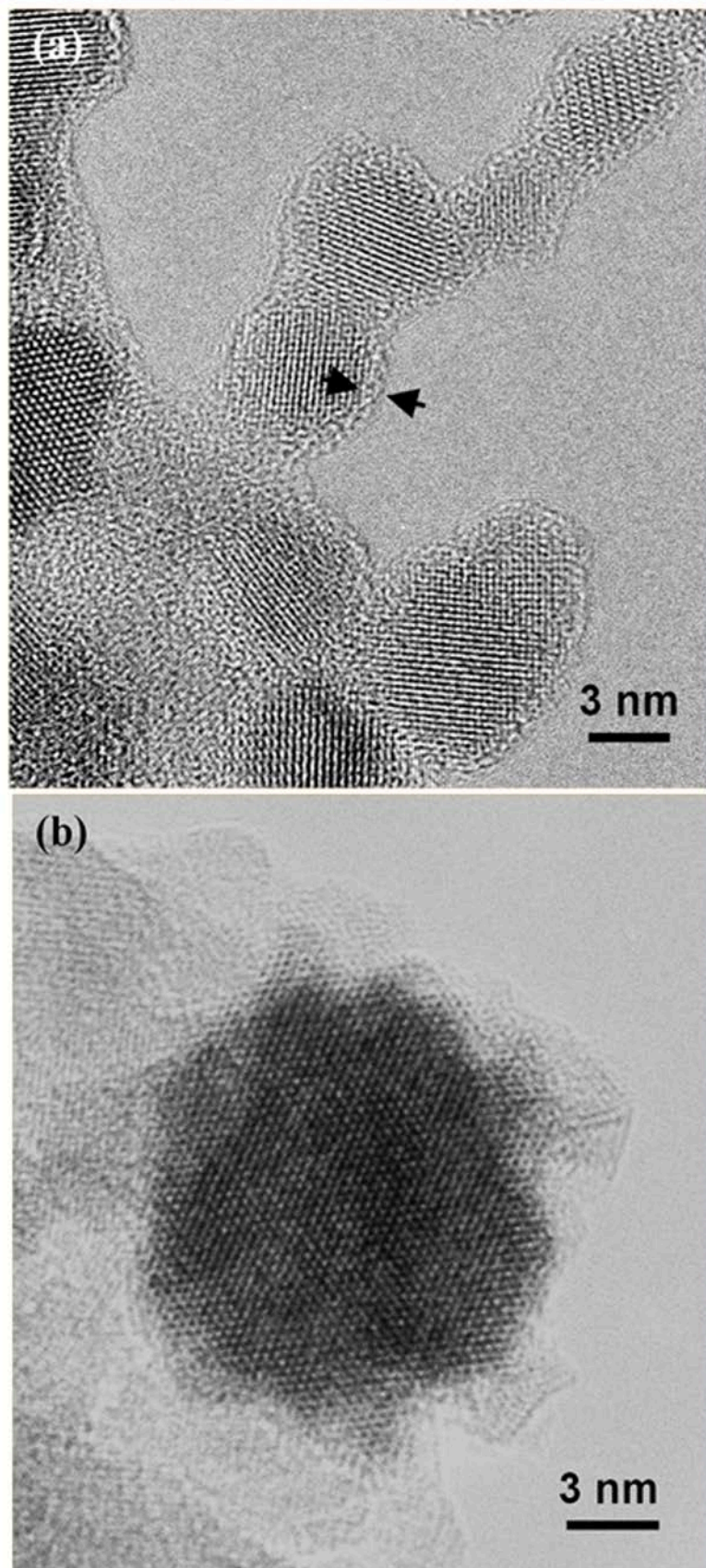


Slika 50: TEM posnetek prevlečenih nanodelcev ND-Si2-K12_3 sintetiziranih v suspenziji s povišano koncentracijo etanola (1 ut.% raztopina TEOS v EtOH).

Na enakomernost prevlek silike pomembno vpliva tudi koncentracija vodne suspenzije nanodelcev. Uporaba razredčene suspenzije nanodelcev ND-CA (0,5 ut.%) je bistveno izboljšala enakomernost prevlek silike v primerjavi z bolj koncentrirano suspenzijo nanodelcev (2 ut.%). V tem primeru nisem nikoli opazil področja nanodelcev, ki ne bi bil prekrit s prevleko silike. Analiza EDXS vzorca nanodelcev ND-Si2-K12_4 je pokazala vsebnosti silike $35,0 \pm 3,0$ ut.%, kar je zelo blizu izračunani sestavi prevlečenih nanodelcev z debelino prevleke 2 nm. Nadaljno redčenje suspenzije (0,1 ut.%) ni pokazalo izboljšanja kakovosti prevleke.

Zaključimo lahko, da je najprimernejši izbor parametrov za pripravo enakomernih prevlek silike na površinah nanodelcev suspenzija z 0,5 ut.% nanodelcev, koncentracija etanolne raztopine TEOS-a 10 ut.%, vrednost pH 12 in uporaba katalizatorja KOH. Pri tem izboru parametrov sem pri pripravi najtanjših prevlek silike zmanjšal le količino TEOS-a tako, da je količina TEOS-a pripadala nominalni vrednosti debeline prevleke 1 nm (ND-Si1-K12), 0,5 nm (ND-Si0.5-K12) in ocenjeni debelini eno-sloja silike oziroma silicijevega (oksi)hidroksida $\sim 0,25$ nm (ND-Si0.25-K12).

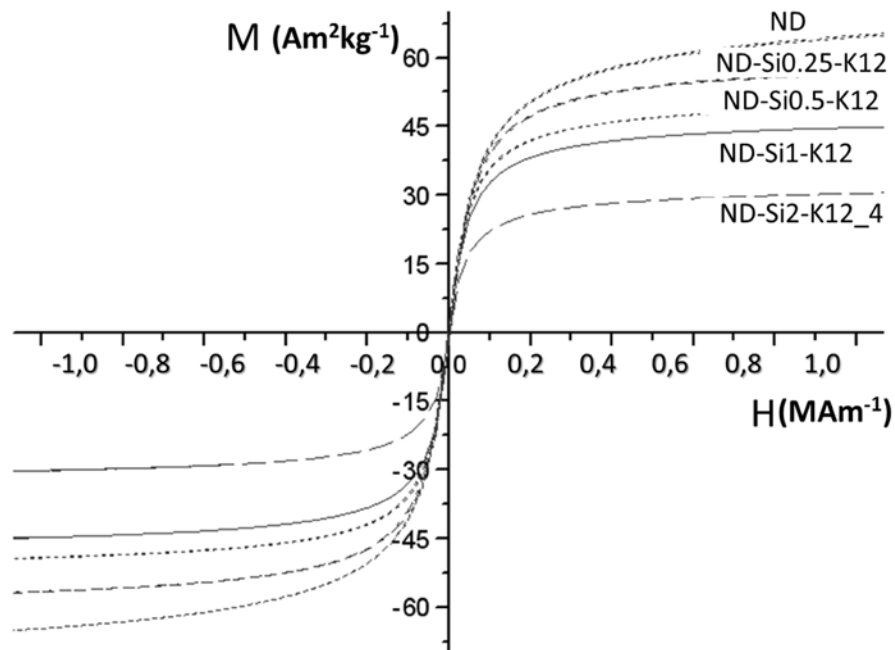
Na sliki 51 je prikazan HREM posnetek nanodelcev ND-Si0.5-K12 in nanodelcev ND-Si0.25-K12. Pri vzorcu nanodelcev z debelino prevleke 0,5 nm lahko opazimo, da so vse površine nanodelcev prekrte z zelo tanko in neprekinjeno amorfno prevleko silike. Če količino dodanega TEOS-a zmanjšamo na vrednost, ki pripada ocenjeni debelini eno-sloja, potem lahko opazimo le parcialno pokritost površin nanodelcev z amorfno prevleko. Amorfna faza je lahko silika, lahko pa je tudi posledica delnega raztapljanja površine v suspenziji ND-CA pred nanosom silike. Analiza EDXS nanodelcev ND-Si0.25-K12 pokaže sicer zelo dobro ujemanje eksperimentalne vrednosti ($4,7 \pm 0,6$ ut.%) z izračunano vrednostjo (4,1 ut.%) vsebnosti silike pri ocenjeni debelini eno-sloja. Semikvantitativna analiza (primerjanje višine karakterističnih vrhov Fe, Si in O v spektru EDXS) je pokazala, da se vsebnost Si med posameznimi nanodelci ne spreminja bistveno. Rezultat kaže, da površinska plast molekul silicijevega (oksi)hidroksida enakomerno prekriva celotno površino nanodelcev.



Slika 51: HREM posnetka nanodelcev $ND-Si_{0.5}-K12$ (a) in $ND-Si_{0.25}-K12$ (b).

Test raztapljanja v kislem je pri prevlekah silike tanjših od 2 nm nesmiseln, saj tako tanke prevleke ne izkazujejo praktično nobene ovire v masnem transportu pri raztapljanju

maghemita.



Slika 52: Meritve magnetizacije (M) v odvisnosti od magnetnega polja (H) za sintetizirane nanodelce ND in nanodelce prevlečene z različno debelimi prevlekami silike.

Slika 52 prikazuje krivulje meritev magnetizacij v odvisnosti od magnetnega polja za nanodelce ND in nanodelce prevlečene z različno debelimi prevlekami silike. Pri vseh vzorcih je bila remanenca enaka nič, kar potrjuje superparamagnetno stanje. Magnetizacija nanodelcev ND pri vrednosti polja 1 MA m^{-1} , kjer doseže nasičenje, je znašala $66,1 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$. Z naraščajočo debelino nemagnetne prevleke silike se je nasičena magnetizacija gradientno zniževala. Če upoštevamo utežni odstotek nemagnetnega materiala silike v primeru 2 nm debele prevleke, potem bi se morala nasičena magnetizacija zmanjšati za okoli 36 %. Opazimo lahko, da se je v primeru 2 nm debele prevleke nasičena magnetizacija zmanjšala za več kot 50 %. Ta razkorak je lahko povezan s selekcijo nanodelcev med procesom adsorpcije citronske kisline. Ko pripravljamo stabilne suspenzije nanodelcev ND-CA, se lahko večji nanodelci (z višjo magnetizacijo) preferenčno posedejo med centrifugiranjem in jih nato odstranimo iz suspenzije. Zadržimo tako nanodelce s povprečno nekoliko manjšo velikostjo.

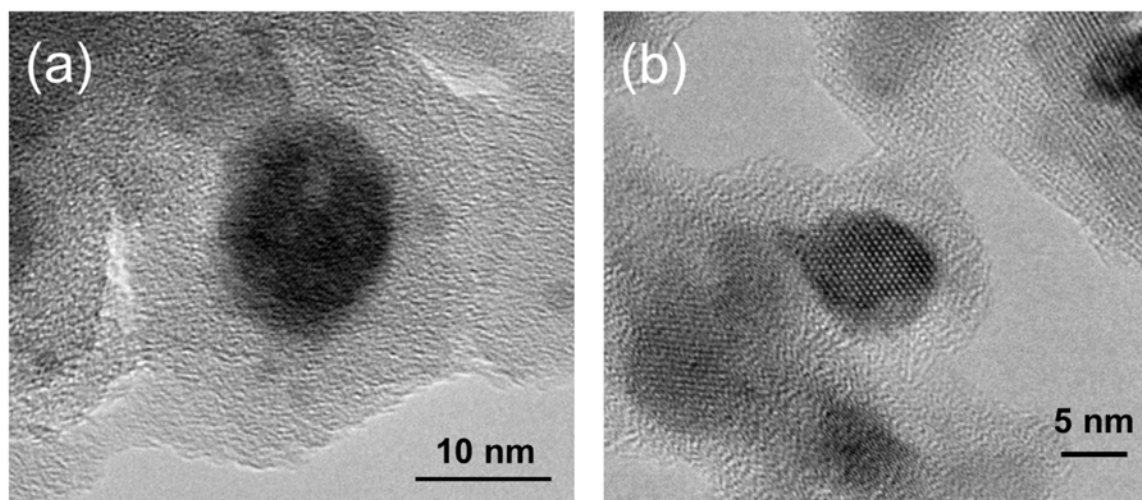
Za vse nadaljne reakcije na površinah nanodelcev sem uporabil nanodelce z enakomerno 1 nm debelo prevleko silike, označene z ND-Si1-K12 in krajše kar ND-Si.

4.3.2 Priprava debelejših prevlek silike

Pri raziskavi priprave tankih prevlek silike sem izbral primerne reakcijske pogoje, ki favorizirajo heterogeno nukleacijo silike na površinah nanodelcev. Pri tej raziskavi sem želel pokazati, da z izbranimi parametri lahko pripravim tudi debelejšše prevleke. Debelejšše prevleke silike ponujajo dobro možnost vgradnje različnih molekul (npr. fluorescentnih barvil), pri čemer imamo celotno površino nanodelcev na voljo za vezavo drugih molekul. Problem debelejših prevlek je material silike, ki je nemagneten in z debelino zelo hitro slabša (razredči) magnetne lastnosti nanodelca do te mere, da takšni nanodelci niso več najoptimalnejši za uporabo v biomedicini.

Potrebno je poudariti, da sem za pripravo debelejših prevlek silike uporabil stabilno

suspenzijo nanodelcev ND-CA, ki so bili predhodno dobro sprani z acetonom. Takšna suspenzija ohrani koloidno stabilnost tekom prevlečenja nanodelcev z debelejšimi prevlekami silike, kjer reakcija poteka ob večjem dodatku etanola (večja količina TEOS-a).



Slika 53: TEM posnetka nanodelcev prevlečenih z ~ 8 nm (a) in ~ 5 nm (b) debelo prevleko silike.

Slika 53 prikazuje TEM posnetek posameznih nanodelcev, prevlečenih z debelimi prevlekami silike. Prevleka silike je amorfna in je na sliki prikazana kot svetlejši pas okoli temnejšega kristaliničnega nanodelca.

4.4 Funkcionalizacija nanodelcev ND-Si z amino silani

S prevlečenjem nanodelcev s tankimi in homogenimi plastmi silike sem na površine nanodelcev uvedel visoko koncentracijo površinskih silanolnih Si-OH skupin. Te skupine so neposredno vezane na atome Si, ki gradijo prevleko silike. Zaradi neposredne bližine površine in njihove velike gostote, imajo te skupine omejen steričen prostor, kar poslabša njihovo zmožnost tvorbe vezi z različnimi organskimi molekulami. Površine nanodelcev z visoko koncentracijo silanolnih Si-OH skupin pa so zelo primerne za tvorbo močnih siloksnanskih (Si-O-Si-) vezi z alkoksi silanskimi molekulami. Te anorgansko-organske molekule imajo centralni atom Si, na katerega so navadno vezane do tri alkoksi skupine in ena alkilna veriga s terminalno funkcionalno skupino. Pri svojem doktorskem delu sem se odločil za uporabo amino silanov, kjer je na terminalnem delu alkilne verige amino skupina, ki ima zaradi oddaljenosti od površine nanodelca večji steričen prostor in boljše reaktivnost za tvorbo kovalentne vezi s širokim naborom različnih organskih molekul. Vezavo silanskih molekul na površino nanodelcev, ki na površine nanodelcev uvedejo za biokonjugacijo ugodne funkcionalne skupine, sem imenoval funkcionalizacija.

Pri svojem delu sem želel pokazati, da je mogoče kontrolirati koncentracijo vezanih molekul amino silanov na nanodelcih ND-Si in tako uravnati površinsko koncentracijo amino skupin. Pri tem sem preučeval vezave 4 različnih molekul amino silanov, kot so prikazane na sliki 25 v poglavju »Materiali in metode«.

Pri funkcionalizacijah nanodelcev ND-Si z amino silani sem v vseh štirih primerih reakcijo izvajal pod popolnoma enakimi pogoji. Pri kemijskih reakcijah na površinah nanodelcev je za homogenost vezav po vseh površinah nanodelcev potrebno zagotoviti zelo dobro koloidno stabilnost reakcijske suspenzije. V primeru, da se tekom reakcije začne pojavljati aglomeracija, ne moremo pričakovati homogenega produkta, saj so površine nanodelcev v aglomeratu nedostopne molekulam, ki jih želimo vezati.

V primerih nanodelcev ND-Si-APS, ND-Si-AHMS in ND-Si-EPAS sem kmalu po začetku reakcije vezave silanov na površine nanodelcev ND-Si opazil aglomeracijo. Najizrazitejša je bila pri sintezi nanodelcev ND-Si-AHMS. Tako pripravljene suspenzije nanodelcev niso uporabne za biomedicinske namene, saj neomogočajo primerne kontrole pri nadaljni vezavi organskih molekul.

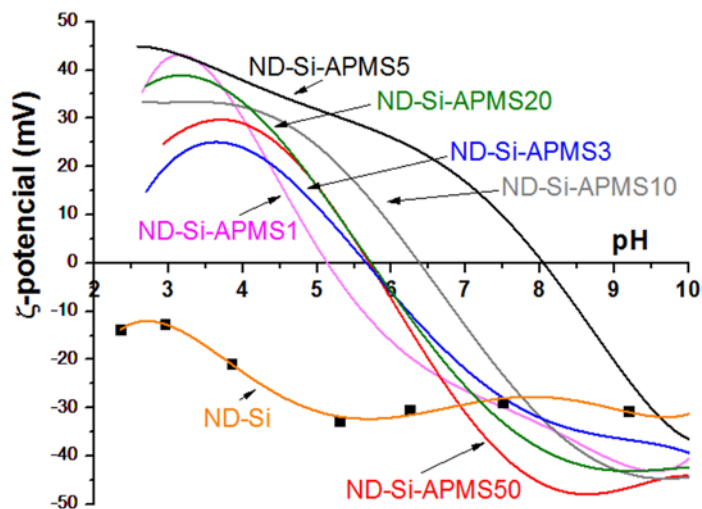
Moon s sodelavci je pokazal [81], da se lahko molekule silana vežejo na površino silike preko dveh siloksanjskih vezi s centralnim atomom Si na molekuli silana. Tretja alkoksi skupina pa je po hidrolizi sterično ovirana za vezavo na površino nanodelca, toda lahko tvori siloksanjsko vez z drugo molekulo silana v njeni bližini. Ta proces se nadaljuje in imenujemo ga lahko zamreženje. Nanodelci tako nimajo površin prekritih s enakomernim plaščem silanskih molekul in so obenem zamreženi med seboj v aglomeratih. To se je verjetno zgodilo v primeru nanodelcev ND-Si-APS, ND-Si-AHMS in ND-Si-EPAS. Rešitev, ki sem jo uporabil pri svojem delu, je bila silanska molekula APMS (na sliki 25). Gre za amino silan, ki ima dve alkoksi skupini, eno alkilno verigo z amini (s primarno in sekundarno amino skupino) in metilno skupino, ki je vezana na centralni atom Si in ne more hidrolizirati. Bistvena je zamenjava tretje alkoksi skupine z metilno skupino, saj metilna skupina ne hidrolizira in zato ne more tvoriti siloksanjske vezi z drugo molekulo silana. V tem se silan APMS razlikuje od ostalih amino silanov v raziskavi. Metilna skupina na silanu APMS onemogoča zamreženje in tako omogoča pripravo nanodelcev z enakomernim eno-slojem molekul APMS na površinah nanodelcev ND-Si-APMS. Reakcijska zmes je bila tekom reakcije vezave silana APMS popolnoma stabilna (ne aglomerirana) ne glede na koncentracijo APMS. Dodatki APMS so podani kot teoretična množina molekul APMS (μmol) na 1 m^2 površine nanodelcev.

Pri funkcionalizaciji s silanom APMS sem preučeval vpliv različnih dodatkov silana na površinsko koncentracijo amino skupin. Rezultate o izoelektričnih točkah različnih vodnih suspenzij nanodelcev in izmerjeni površinski koncentraciji amino skupin sem podal v tabeli 4.

Tabela 4: Seznam vzorcev vodnih suspenzij nanodelcev serije ND-Si-APMSx in njihove pripadajoče vrednosti izoelektričnih točk ter koncentracij amino skupin na 1 nm^2 površine.

Vzorec	Dodatek APMS ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Izoelektrična točka suspenzije	Koncentracija aminov ($\text{št}/\text{nm}^2$)
ND-Si-APMS1	1	5,2	$1,2 \pm 0,2$
ND-Si-APMS3	3	5,7	$3,7 \pm 0,2$
ND-Si-APMS5	5	8,0	$4,6 \pm 0,2$
ND-Si-APMS10	10	6,4	$4,4 \pm 0,2$
ND-Si-APMS20	20	5,6	$4,3 \pm 0,2$
ND-Si-APMS50	50	5,6	$4,0 \pm 0,2$

Učinkovitost funkcionalizacije s silanom APMS sem preveril z meritvami zeta potencialov stabilnih vodnih suspenzijah nanodelcev kot je prikazano na sliki 54. Nanodelci ND-Si oziroma njihova površina silike je pri vrednostih $\text{pH} > 2$ negativno nabita, kjer je na površini oblika $-\text{O}^-$, ki zagotavlja negativen naboj. Vrednost zeta potenciala nanodelcev ND-Si doseže -30 mV že pri vrednosti $\text{pH} 5$. Relativno visoke absolutne vrednosti zeta potencialov zagotavljajo močan elektrostatski odboj med nanodelci, kar je ugodno za koloidno stabilnost suspenzije v večjem delu območja pH .



Slika 54: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH suspenzij nanodelcev ND-Si in serije suspenzij nanodelcev ND-Si-APMSx.

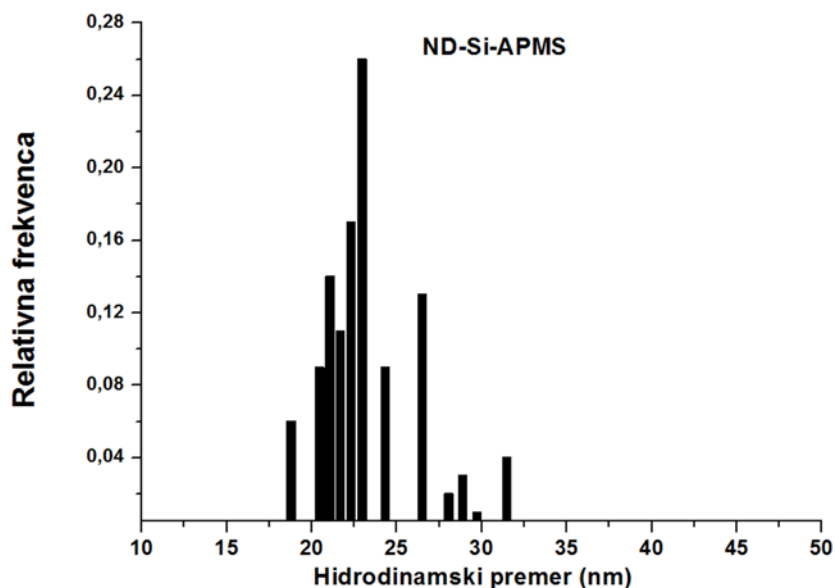
Koncentracija dodanega silana APMS v reakcijsko zmes vpliva na vrednost pH izoelektrične točke, kjer se z višanjem koncentracije APMS zvišuje tudi izoelektrična točka. Nanodelci ND-Si-APMS1, pri katerih je bil dodatek APMS-ja le $1 \mu\text{mol}$ na 1 m^2 površine nanodelcev, izkazujejo bistveno zvišanje izoelektrične točke na vrednost pH 5,2. Ko zvišujem koncentracijo APMS-ja, se vrednost pH izoelektrične točke progresivno zvišuje vse do koncentracije $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, kjer doseže vrednost 8,0. Pri višjih koncentracijah APMS, vse do $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, pa začne vrednost pH izoelektrične točke padati.

Rezultati nakazujejo na to, da se površine nanodelcev ND-Si popolnoma zasedejo z APMS že pri koncentraciji $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$.

Koncentracijo amino skupin na površinah nanodelcev ND-Si-APMSx sem določal s konduktometričnimi titracijami. Vsaka vezana molekula APMS ima dve amino skupini, kar pomeni, da sta potrebna dva protona kisline HCl za reakcijo z eno molekulo APMS. Med titriranjem suspenzije z znano maso nanodelcev ND-Si-APMSx sem spremljal prevodnost in porabo kisline. Iz porabe kisline v ekvivalentni točki, kjer se prevodnost sunkovito poveča, sem glede na maso nanodelcev in njihovo ocenjeno specifično površino določil število amino skupin na 1 nm^2 površine nanodelcev. Rezultate sem zbral v tabeli 4. Rezultati iz konduktometričnih titracij se zelo dobro ujemajo z izsledki iz meritev zeta potencialov, saj so tudi titracije potrdile, da se površina nanodelcev nasiti z APMS pri nanodelcih ND-Si-APMS5. Pri tem vzorcu sem določil 4,6 amino skupine na 1 nm^2 površine nanodelca, kar predstavlja 2,3 molekule APMS na 1 nm^2 . Ob predpostavki, da je APMS vezan v eno-plasti na površinah nanodelcev, lahko sklepam, da gre za nasičeno površino. Rezultat lahko primerjam s pogosto uporabljenim silanom APS, kjer so uspeli vezati približno 4 molekule na 1 nm^2 površine nanodelcev [82]. Razlog za nižjo površinsko koncentracijo molekul APMS v primerjavi z APS je v tem, da je molekula APMS nekoliko večja, saj zaradi metilne skupine, ki ne more hidrolizirati, molekula APMS zasede večji steričen prostor. Drugi razlog pa je morda v tem, da APS ne tvori enakomernega eno-sloja, temveč so na površino nanodelcev oziroma aglomeratov nanodelcev vezani zamreženi delci APS. Ti skupki molekul APS so bogati z amino skupinami, ki jih s konduktometrično titracijo zaznamo in tako prispevajo k na videz višji površinski koncentraciji.

Na sliki 55 je prikazana številska porazdelitev hidrodinamskih velikosti nanodelcev ND-Si-APMS5 v vodni suspenziji koncentracije 2 ut.% in vrednosti pH 9. Povprečen hidrodinamski premer nanodelcev ND-Si-APMS5 je znašal okoli 22 nm, kar nakazuje, da

suspenzija ne vsebuje večjih aglomeratov.

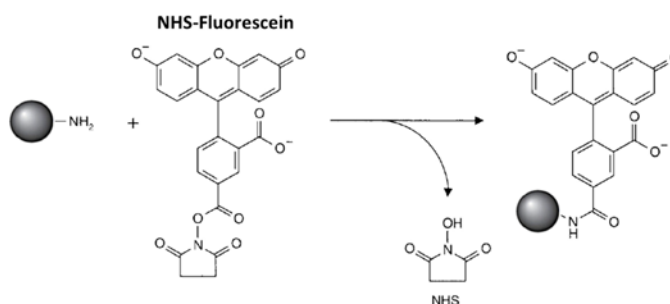


Slika 55: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti nanodelcev ND-Si-APMS v vodni suspenziji pri vrednosti pH 9 izmerjene s pomočjo DLS.

V nadaljevanju sem uporabljal nanodelce ND-Si-APMS5, ki sem jih označil krajše kar ND-Si-APMS.

4.5 Fluorescentni nanodelci s prostimi amino skupinami

Številne biomedicinske raziskave nanodelcev temeljijo na zaznavanju nanodelcev na osnovi njihove fluorescence. V ta namen sem na del amino skupin na površinah nanodelcev kovalentno vezal molekule fluoresceina. Pri tem sem uporabil s sukcinimidil estrom aktivirane molekule fluoresceina, ki tvorijo močne kovalentne vezi s prostimi terminalnimi amino skupinami na površinah nanodelcev ND-Si-APMS. Shematsko je mehanizem reakcije prikazan na sliki 56.



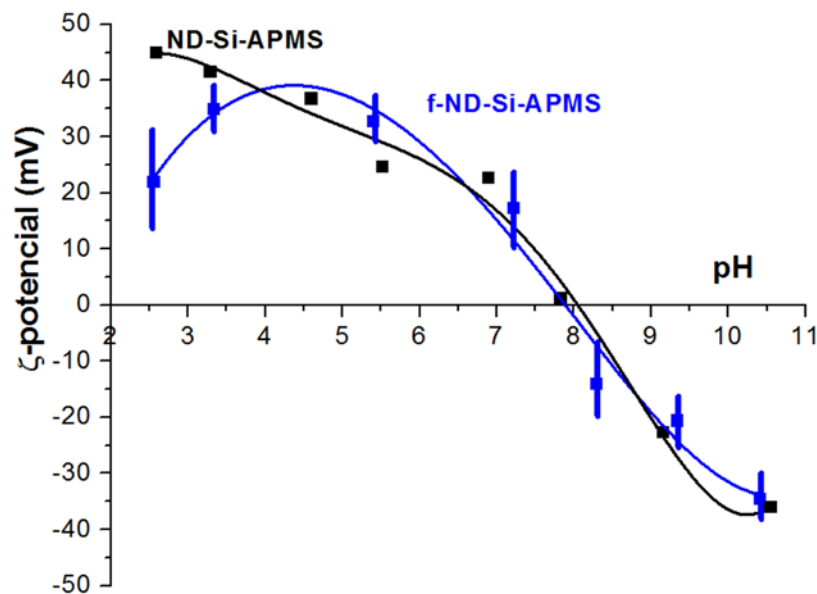
Slika 56: Shematski prikaz vezave NHS-Fluoresceina na nanodelce s površinskimi amini.

NHS-Fluorescein je aktivirana oblika fluoresceina, ki s svojo karboksi sukcinimidil estrsko skupino tvori amidno vez s primarno amino skupino na površini nanodelcev v rahlo alkalnem mediju. Pri reakciji nastaja stranski produkt N-hidroksi sukcinimid (NHS) [40].

Po končani reakciji vezave fluoresceina na nanodelce sem sintetizirane fluorescentne nanodelce f-ND-Si-APMS dobro spral z destilirano vodo. Po enem tednu sem stabilno suspenzijo fluorescentnih nanodelcev ponovno filtriral in zbiral filtrat, ki sem ga preveril

s fluorescenčno spektroskopijo. V primeru dobro spranih nanodelcev v filtratu nisem detektiral fluorescence. Razlika v fluorescenci med vzorcem in kontrolo je bila navadno nekaj 100-kratna. Z meritvijo številske porazdelitve hidrodinamskih velikosti nanodelcev (DLS) v vodnih suspenzijah sem ugotovil, da se velikost nanodelcev v vodni suspenziji po vezavi fluoresceina bistveno ne spremeni.

S konduktometrično titracijo sem določil površinsko koncentracijo prostih amino skupin na fluorescentnih nanodelcih, kjer so protoni kisline reagirali le s prostimi amino skupinami. Rezultat je pokazal praktično enako koncentracijo amino skupin (4,6 na nm² površine), kot sem jo določil pri nanodelcih ND-Si-APMS. To pomeni, da se je fluorescein vezal le na delež površinskih amino skupin. Napaka pri meritvi s konduktometričnimi titracijami znaša okoli 6 %. Sklepam lahko, da se je fluorescein vezal na kvečjemu do 6 % površinskih amino skupin. Rezultat se sklada z meritvijo zeta potenciala vodne suspenzije nanodelcev, kjer sta bili krivulji zeta potencialov za suspenziji nanodelcev f-ND-Si-APMS in ND-Si-APMS praktično identični (slika 57).



Slika 57: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH vodnih suspenzij nanodelcev ND-Si-APMS in nanodelcev f-ND-Si-APMS.

Nanodelci f-ND-Si-APMS izkazujejo pozitiven zeta potencial (+ 15 mV) v vodnih suspenzijah v območju fiziološke vrednosti pH ~ 7. Zeta potencial suspenzije nanodelcev f-ND-Si-APMS v pufru PBS (pH 7,4) se je znižal na + 10 mV in v gojišču (PBS + goveji serum (FBS)) na + 4 mV. To pomeni, da se zeta potencial nanodelcev v kompleksnejših sistemih bistveno spremeni in verjetno pomembno vpliva na nadaljna biološka testiranja. Za nadaljna biološka testiranja nanodelcev f-ND-Si-APMS sem jih krajše označil kar f-PND (fluorescentni pozitivno nabiti nanodelci).

4.6 Nanodelci s terminalnimi karboksilnimi skupinami

Pri številnih uporabah nanodelcev v biomedicini je željeno, da lahko na površino nanodelca vežemo vsaj dva ali več različnih tipov organskih molekul oziroma makromolekul. Na primer, na 10 % funkcionalnih skupin vežemo monoklonska protitelesa in na preostalih 90 % skupin zdravilno učinkovino. Ena od najenostavnejših možnosti za pripravo takšnih večnamenskih nanodelcev je, da na površino nanodelcev vežemo molekule amino silana v prvi stopnji in nato v drugi stopnji znan delež

površinskih amino skupin s primerno kemijo spremenimo v karboksilne kisline. Na ta način lahko pripravimo nanodelce z npr. 90% površinskih amino skupin in 10% površinskih karboksilnih skupin.

Za uvedbo karboksilnih skupin na površine nanodelcev ND-Si-APMS sem uporabil sukcin anhidrid (SA), ki pri sobni temperaturi v topilu DMF tvori kovalentno vez z amino skupino (slika 31, »Materiali in metode«). Nukleofilna amino skupina na površini nanodelca ND-Si-APMS napade karbonilni atom C na molekuli SA in tako tvori amidno vez. Ciklična molekula SA se pri tem odpre in zagotovi prosto terminalno karboksilno skupino.

V raziskavi pokažem, da lahko s spreminjanjem količine dodane SA kontroliram razmerje med prostimi amino skupinami in uvedenimi karboksilnimi skupinami na površinah nanodelcev. Dodatki SA so podani kot teoretično molarno razmerje med SA in APMS, pri čemer sem upošteval koncentracijo APMS na nanodelcih (2,3 molekule APMS/nm²) in ocenjeno specifično površino nanodelcev.

Rezultate o izoelektričnih točkah in izmerjenem odstotku uvedenih karboksilnih skupin (100% = % amino skupin + % karboksilnih skupin) sem podal v tabeli 5.

Tabela 5: Seznam vzorcev suspenzij nanodelcev ND-Si-APMS-xSA, njihove pripadajoče izoelektrične točke in odstotek uvedenih karboksilnih skupin.

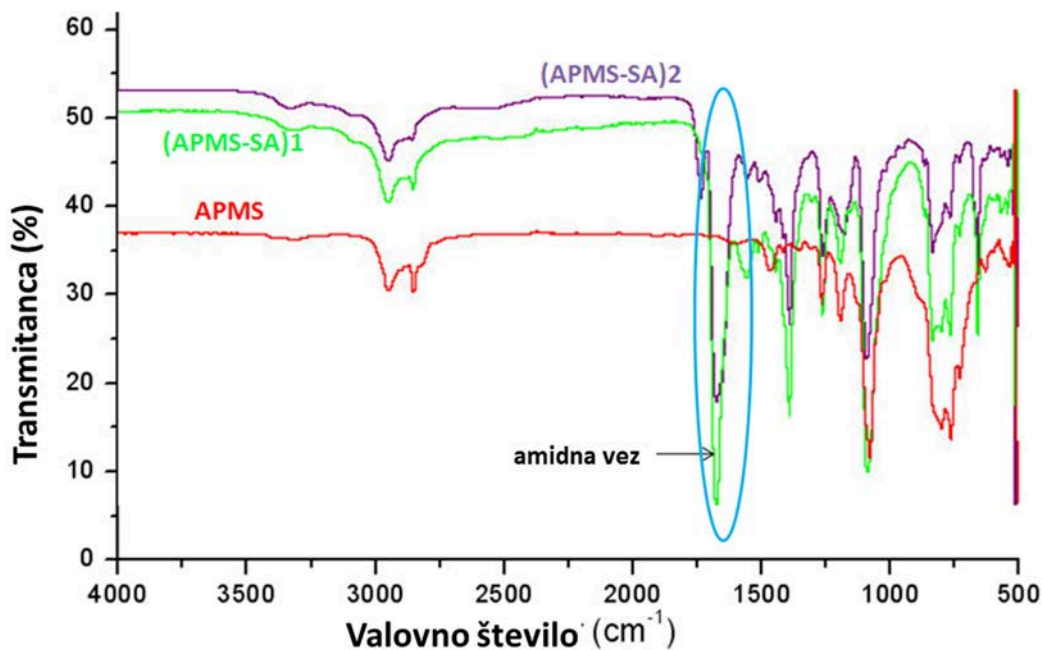
Vzorec	Dodatek SA	Izoelektrična točka	% uvedenih (-COOH)
ND-Si-APMS-3SA	3	4,0	50±6
ND-Si-APMS-1SA	1	4,0	44±6
ND-Si-APMS-0.5SA	0,5	4,0	37±6
ND-Si-APMS-0.25SA	0,25	4,2	25±6
ND-Si-APMS -0.1SA	0,1	4,4	6±6

Odstotek uvedenih karboksilnih skupin sem določil na podlagi konduktometričnih titracij po postopku, ki sem ga opisal za določanje amino skupin na nanodelcih ND-Si-APMS. Tudi pri vzorcih serije ND-Si-APMS-xSA sem določeval proste amino skupine, ki so reagirale v reakciji z dodano HCl. Iz porabe kisline sem preračunal koncentracijo prostih amino skupin in posledično odstotek uvedenih karboksilnih skupin. Rezultati nakazujejo, da se s povečevanjem molarne razmerja SA/APMS sorazmerno povečuje odstotek uvedenih karboksilnih kislin. Pri najmanjšem dodatku SA (SA/APMS = 0,1) je bil odstotek uvedenih karboksilnih kislin zelo nizek, medtem ko je pri dodatku SA/APMS = 0,5 že približno 37% vseh površinskih skupin karboksilnih. Zanimivo je, da je pri 3-kratnem prebitku SA, ko bi pričakoval, da ne bo več prostih amino skupin, le polovica površinskih skupin karboksilnih. Ciklična molekula SA verjetno ne more reagirati s sekundarno amino skupino na vezani molekuli APMS zaradi steričnih ovir. Koncentracija amino skupin (primarnih in sekundarnih) na površini nanodelcev ND-Si-APMS je 4,6 skupine na 1 nm² površine nanodelca, kar nakazuje, da so molekule APMS na površini nanodelcev tako goste, da so notranje sekundarne amino skupine praktično nedostopne za reakcijo z molekulami SA.

Z reakcijo med molekulo APMS in SA, brez prisotnosti nanodelcev, sem želel potrditi svojo hipotezo o nezmožnosti reakcije med sekundarno amino skupino APMS-ja vezanega na nanodelec in molekulo SA. Pri enakih pogojih, kot sem jih izbral pri reakciji uvedbe karboksilnih skupin na nanodelce, sem izvedel reakcijo med SA in APMS. Pri tem sem se odločil za molarna razmerja med SA/APMS 1 ali 2 in tako sintetiziral nova reagenta (APMS-SA)₁ in (APMS-SA)₂. Potek reakcij je shematko prikazan na sliki 32 v

poglavju »Materiali in metode«. Sintetizirana silana sem vezal na površino nanodelcev ND-Si po enakem postopku, kot sem ga uporabil pri vezavi silana APMS pri nanodelcih ND-Si-APMS. Tako pripravljena vzorca nanodelcev sem imenoval ND-Si-(APMS-SA)1 in ND-Si-(APMS-SA)2, kot je prikazano na sliki 33 v poglavju »Materiali in metode«.

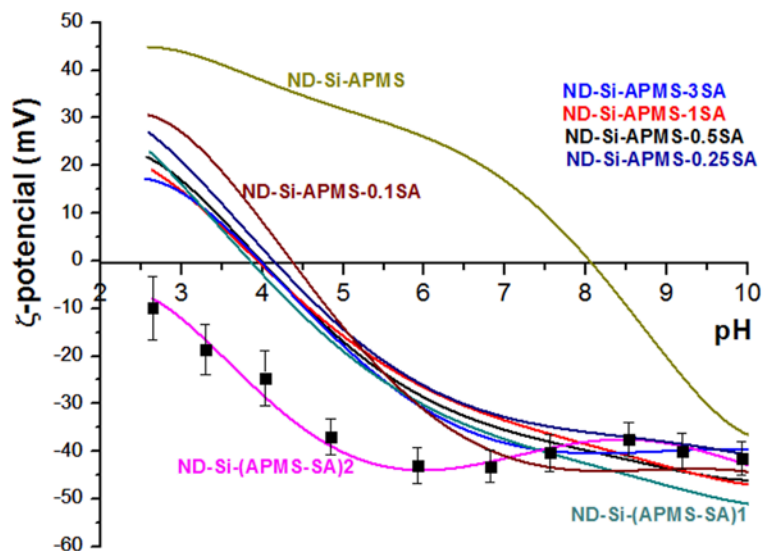
Takšna razmerja med SA/APMS sem izbral zato, ker pri molarnem razmerju 1 (SA/APMS = 1), molekula SA preferenčno reagira s primarno amino skupino molekule APMS. V primeru 2-kratnega prebitka molekul SA, pa molekule SA reagirajo tudi s sekundarno amino skupino proste molekule APMS v raztopini. Sintetizirana reagenta sem ovrednotil z masno spektroskopijo (HRMS). Pri reagentu (APMS-SA)1 sem izmeril molekulski ion $(MH)^+$ m/z 307,1689, ki je primerljiv z izračunano vrednostjo m/z 307,1703 za $C_{12}H_{26}N_2O_5Si_1$. Pri reagentu (APMS-SA)2 sem izmeril molekulski ion $(MH)^+$ m/z 405,1699, ki je primerljiv z izračunano vrednostjo m/z 405,1693 za $C_{16}H_{30}N_2O_8Si_1$. Rezultati potrjujejo predvideno strukturo sintetiziranih reagentov. Sintetizirana reagenta sem ovrednotil tudi z analizo ATR-FTIR. Na sliki 58 so prikazani spektri IR za izhodni silan APMS in novo sintetizirana reagenta (APMS-SA)1 in (APMS-SA)2. Pri sintetiziranih reagentih lahko opazim karakterističen vrh pri 1650 cm^{-1} , ki je značilen za amidno vez. V izhodnem silanu APMS ni amidne vezi, zato tudi pri tem valovnem številu ni vrha.



Slika 58: ATR-FTIR spekter silana APMS in dveh sintetiziranih reagentov (APMS-SA)1 in (APMS-SA)2.

Konduktometrična titracija suspenzije nanodelcev ND-Si-(APMS-SA)2 je pokazala, da se je že pri prvem majhnem dodatku kisline prevodnost močno zvišala. Ekvivalentne točke nisem opazil. Pri retitraciji prebitne kisline z bazo NaOH je bila poraba baze enaka celotni količini dodane HCl. To nakazuje, da v suspenziji ni bilo prisotnih amino skupin.

Poleg tega sem pri vzorcih suspenzij ND-Si-APMS-xSA, ND-Si-(APMS-SA)1 in ND-Si-(APMS-SA)2 pomeril vrednosti zeta potencialov. Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH so prikazane na sliki 59.



Slika 59: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH suspenzij nanodelcev ND-Si-APMS-xSA, ND-Si-(APMS-SA)1 in ND-Si-(APMS-SA)2.

Krivulje odvisnosti zeta potencialov od vrednosti pH nakazujejo na pravilnost postavljene hipoteze. Potek krivulj zeta potencialov za vse vzorce suspenzij serij nanodelcev ND-Si-APMS-xSA je bil praktično zelo podoben in znotraj napake meritev. Vse vrednosti izoelektričnih točk so bile tesno skupaj med vrednostjo pH 4 in 4,5. Že pri najmanjšem dodatku SA (0,1) se je vrednost izoelektrične točke pomaknila iz vrednosti pH 8 na 4,5, kar nakazuje na visoko občutljivost metode. Krivulje zeta potencialov serije nanodelcev ND-Si-APMS-xSA pa so bile hkrati zelo podobne krivulji zeta potencialov nanodelcev ND-Si-(APMS-SA)1. To potrjuje hipotezo, da gre med ND-Si-APMS-3SA, ND-Si-APMS-1SA in ND-Si-(APMS-SA)1 za praktično zelo podoben končni produkt funkcionalizacije, kjer je v prvih dveh primerih (ND-Si-APMS-3SA in ND-Si-APMS-1SA) potekla reakcija med površinskimi primarnimi amino skupinami in SA ter v primeru ND-Si-(APMS-SA)1, med sintetiziranim reagentom (APMS-SA)1 in nanodelci ND-Si. V primeru nanodelcev ND-Si-(APMS-SA)2 pa v vzorcu ni bilo prostih amino skupin, kar se je pokazalo v premiku izoelektrične točke v zelo kislo območje k pH ~ 2.

Pokazal sem, da v primeru dvostopenjske sinteze, kjer v prvi stopnji na površine nanodelcev ND-Si vezem molekule APMS v najvišji površinski koncentraciji in kjer v drugi stopnji spremenim del površinskih aminov (samo primarnih) v karboksilne skupine (serije ND-Si-APMS-xSA), lahko kontroliram razmerje med površinskimi amino in karboksilnimi skupinami.

4.7 Fluorescentni nanodelci s prostimi karboksilnimi skupinami

Za namene biomedicinskih raziskav sem poleg že opisanih fluorescentnih nanodelcev s prostimi amino skupinami sintetiziral tudi fluorescentne nanodelce s prostimi karboksilnimi skupinami na površini. Kot izhodiščne nanodelce pri tej sintezi sem uporabil nanodelce f-ND-Si-APMS, kjer sem na proste površinske amino skupine uvedel karboksilne skupine. Na sliki 34 v poglavju »Materiali in metode« je shematsko prikazana priprava nanodelcev f-ND-Si-APMS-SA.

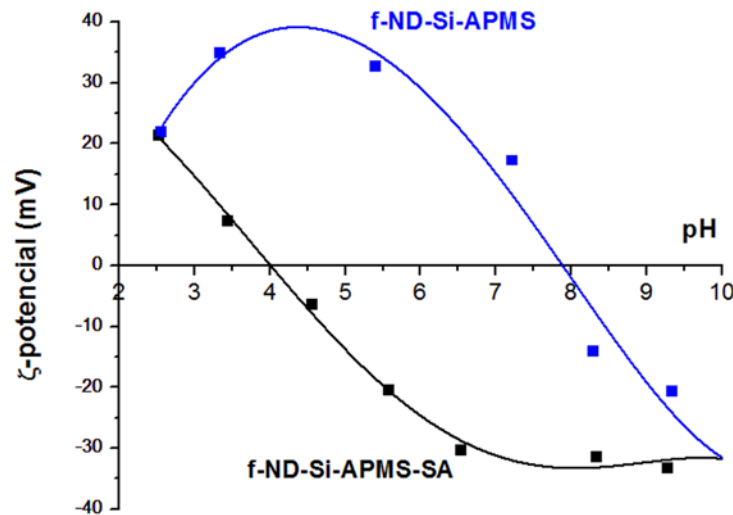
Z meritvijo številske porazdelitve hidrodinamskih velikosti nanodelcev (DLS) v suspenziji sem ugotovil, da se velikost nanodelcev po uvedbi karboksilnih skupin bistveno ne spremeni.

Podobno kot sem pri uvedbi karboksilnih skupin na površine nanodelcev z amino

skupinami, sem tudi v tem primeru uporabil presežek molekul SA (3-kratni). Množina SA je bila zadostna, da je lahko reakcija potekla z vsemi amino skupinami.

Suspenzijo nanodelcev f-ND-Si-APMS-SA sem ovrednotil s fluorescenčno mikroskopijo, kjer je bila vrednost fluorescence nesignifikantno drugačna od izvirne suspenzije nanodelcev f-ND-Si-APMS. To pomeni, da reakcija uvajanja karboksilnih skupin na fluorescentne nanodelce s površinskimi amini ne vpliva na fluorescenco oziroma ohrani molekule fluoresceina.

Suspenziji nanodelcev f-ND-Si-APMS-SA sem izmeril zeta potenciala, ki so prikazani na sliki 60.

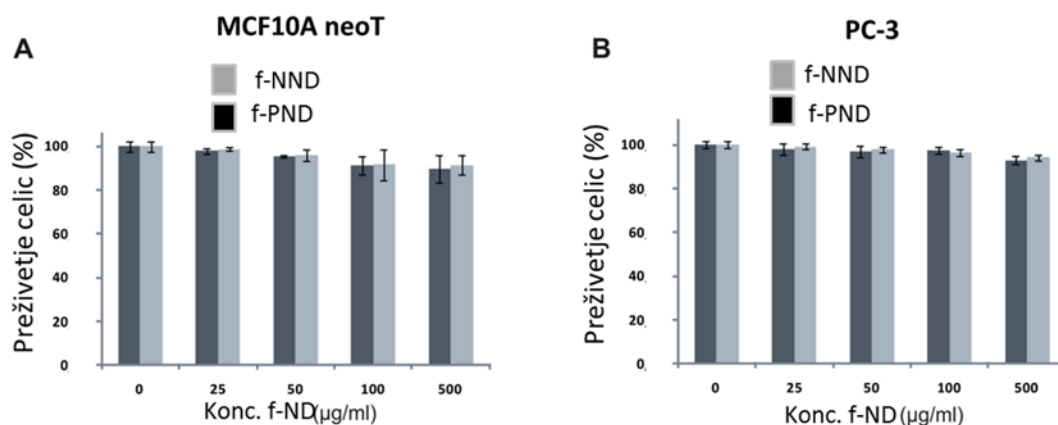


Slika 60: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH suspenzij nanodelcev f-ND-Si-APMS-SA in f-ND-Si-APMS.

Premik izoelektrične točke iz vrednosti pH ~ 8 na vrednost 4 je praktično identičen premiku kot se je zgodil po uvedbi karboksilnih skupin na nanodelce ND-Si-APMS. Na podlagi tega lahko zaključim, da so vse proste primarne amino skupine na nanodelcih f-ND-Si-APMS zreagirale z molekulami SA in tako postale proste karboksilne skupine. Vodne suspenzije nanodelcev f-ND-Si-APMS-SA izkazujejo negativen zeta potencial (-30 mV) v območju fiziološke vrednosti pH ~ 7. Zeta potencial suspenzije nanodelcev f-ND-Si-APMS-SA v pufru PBS (pH 7,4) se je po absolutni vrednosti znižal na -26 mV in v gojišču (PBS + goveji serum (FBS)) na -19 mV. To pomeni, da se zeta potencial nanodelcev v kompleksnejših sistemih bistveno spremeni in verjetno pomembno vpliva na nadaljna biološka testiranja. Za nadaljna biološka testiranja nanodelcev f-ND-Si-APMS-SA sem jih krajše označil kar f-NND (fluorescentni negativno nabiti nanodelci).

4.8 Testi citotoksičnosti

Vpliv privzema fluorescentnih nanodelcev na preživetje celic MCF10A neoT in PC-3 je bil analiziran s pretočnim citometrom (slika 61). Rezultati pokažejo relativno majhen vpliv privzetih nanodelcev na preživetje celic. Med nanodelci f-NND in f-PND ni bilo bistvenih razlik v toksičnosti. Preživetje celic se sicer počasi znižuje s povejšano koncentracijo inkubiranih nanodelcev, vendar je pri najvišji koncentraciji nanodelcev (500 $\mu\text{g/mL}$) preživetje celic še vedno 90% v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Pri naših nadaljnjih testiranjih je bila uporabljena nizka koncentracija nanodelcev (25 μg na 1 mL gojišča) ter skrajšani čas (4 ure), da je bil tako kar najbolj zmanjšan vpliv nanodelcev na preživetje celic.



Slika 61: Preživetje celic MCF10A neoT (A) in PC-3 (B), ki so bile inkubirane pri različnih koncentracijah fluorescentnih nanodelcev v 24 urah. Meritev je bila izvedena na pretočnem citometru in je normalizirana na rast celic brez prisotnosti nanodelcev.

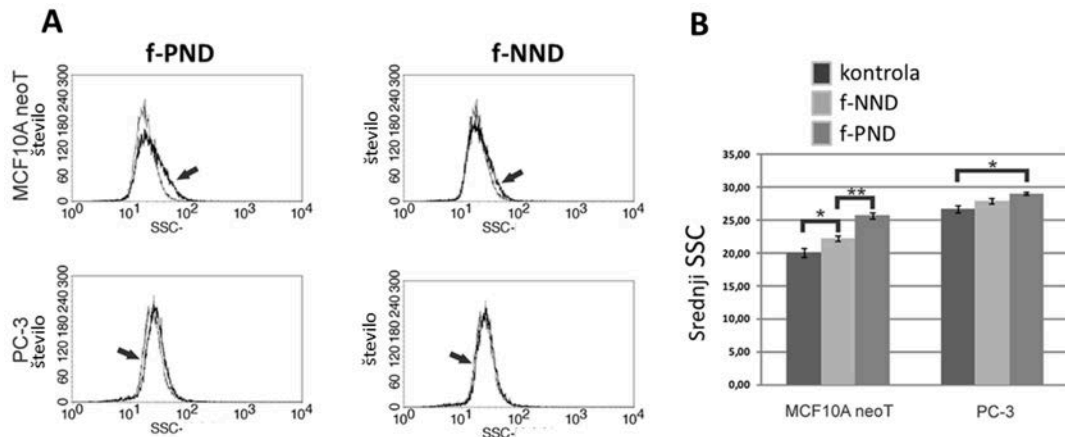
4.9 Določanje privzema nanodelcev v celice

Osnovna karakterizacija pri biološkem raziskovanju nanodelcev je določanje obsega njihovega privzema v celice. Pripravil sem fluorescentne nanodelce z različnim površinskim nabojem (zeta potencialom). Nanodelci f-PND so imeli pozitiven zeta potencial, medtem ko so imeli nanodelci f-NND negativnega. Preučeval sem vpliv različnega naboja (zeta potenciala) nanodelcev na obseg privzema nanodelcev v celice. Pri raziskavah privzema nanodelcev v celice obstajajo različne metode za kvantitativno in kvalitativno določanje obsega privzema. V svojem doktorskem delu sem uporabljal različne tehnike na pretočnem citometru, fluorescenčno mikroskopijo, presevno elektronsko mikroskopijo in magnetometrijo SQUID. Pri slednji smo razvili metodo kvantitativnega merjenja obsega privzema superparamagnetnih nanodelcev v živih celicah.

4.9.1 Pretočni citometer

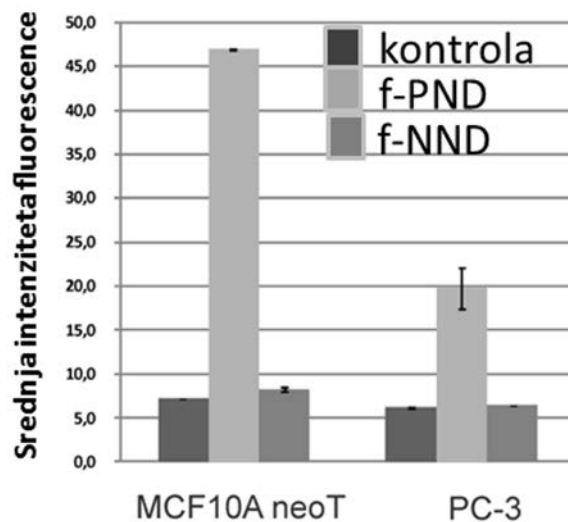
Določitev obsega privzema fluorescentnih nanodelcev v celice je bil izveden s pretočnim citometrom, kjer sta bili uporabljeni dve različni tehniki. Prva tehnika se nanaša na spremembe v morfologiji celic po privzemu nanodelcev v celice. S povečanim privzemom nanodelcev v celico se poveča znotrajcelična strukturiranost, ki prispeva k sipanju svetlobe. Tehnika ne temelji na merjenju fluorescence. Spremembe, ki so posledica privzema nanodelcev, lahko spremljamo kot povečanje intenzitete svetlobe sipane pod pravim kotom z detektorjem SSC. Druga tehnika temelji na detekciji spremembe zelene fluorescence (FL-1) v celicah, ki je posledica privzema fluorescentnih nanodelcev.

Pri prvi tehniki, kjer je bil uporabljen detektor SSC, je bilo opazno majhno povišanje intenzitete sipane svetlobe na celicah pri nanodelcih f-PND kot tudi pri nanodelcih f-NND (slika 62 (A)). Primerjava med obema vrstama nanodelcev je pokazala nekoliko višjo intenziteto sipane svetlobe v primeru privzema nanodelcev f-PND (slika 62 (B)) pri obeh tipih celic. Sprememba v intenziteti SSC celic po inkubiranju z nanodelci je manjša od tiste, ki so jo opisali v literaturi [141]. Razlog temu je lahko 20-krat nižja koncentracija dodanih nanodelcev k celicam v našem primeru in krajši čas inkubiranja.



Slika 62: Obseg privzema nanodelcev v celice določen s pretočnim citometrom (intenziteta SSC). Spremembe v profilu intenzitete SSC po privzemu nanodelcev (debelejša krivulja)(A) in srednje vrednosti intenzitete SSC (B). Srednja vrednost \pm SD, kjer je * $P < 0,05$ in ** $P < 0,001$.

Pri drugi tehniki, ki je temeljila na fluorescenci, pa je bil ovrednoten obseg privzema na podlagi sprememb v zeleni fluorescenci celic po inkubiranju celic s fluorescentnimi nanodelci. S to tehniko smo zaznali bistvene razlike v obsegu privzema med nanodelci f-PND in f-NND (slika 63).



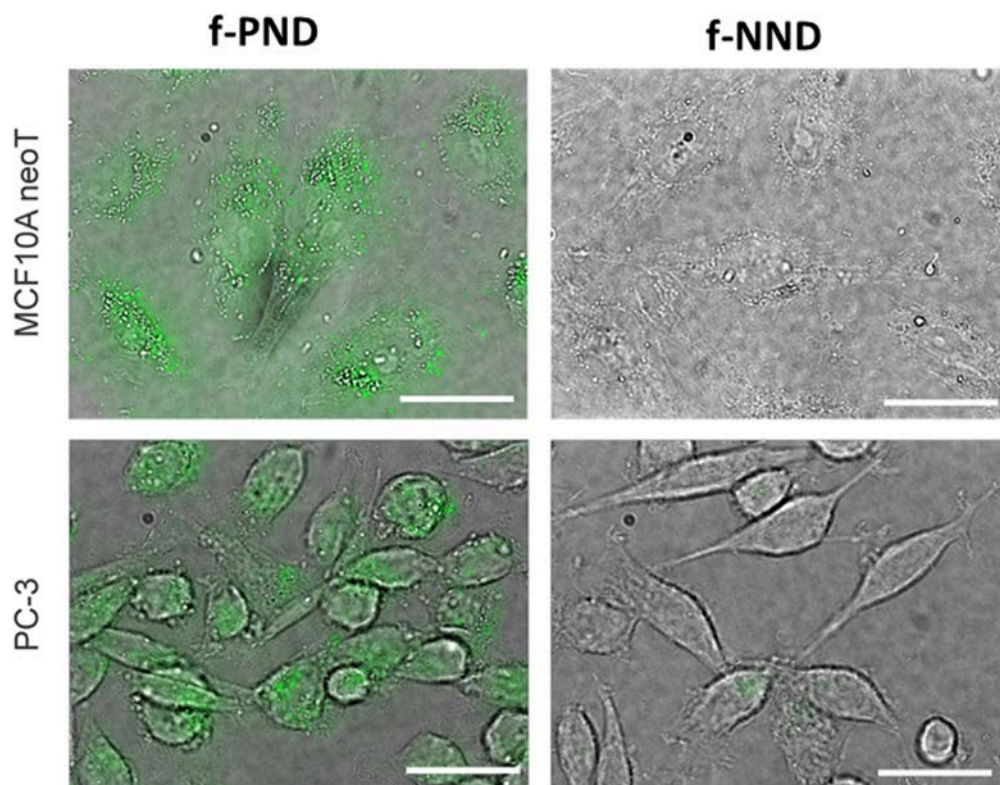
Slika 63: Obseg privzema nanodelcev v celice, določen na podlagi sprememb v intenziteti fluorescence celic (FL-1) s pretočnim citometrom.

Obseg privzema pozitivno nabitih nanodelcev f-PND je bil bistveno večji od obsega privzema nanodelcev z negativno vrednostjo zeta potenciala f-NND. Opazim lahko, da celice MCF10A neoT privzamejo nanodelce v večjem obsegu kot celice PC-3. Rezultati se skladajo z objavljenimi rezultati, kjer so preučevali vpliv naboja nanodelcev na obseg njihovega privzema v celice [141]. Znano je, da so zunanje površine celičnih membran negativno nabite [142]. To pomeni, da pozitivno nabite nanodelce elektrostatski privlak zadrži v bližini membrane, kar pomembno vpliva na obseg njihovega privzema v celice.

4.9.2 Fluorescenčna mikroskopija

Rezultati fluorescenčne mikroskopije celic MCF10A neoT in PC-3 se skladajo z ugotovitvami na podlagi pretočne citometrije. Obseg privzema pozitivno nabitih nanodelcev f-PND je bistveno večji kot je pri negativno nabitih nanodelcih f-NND (slika

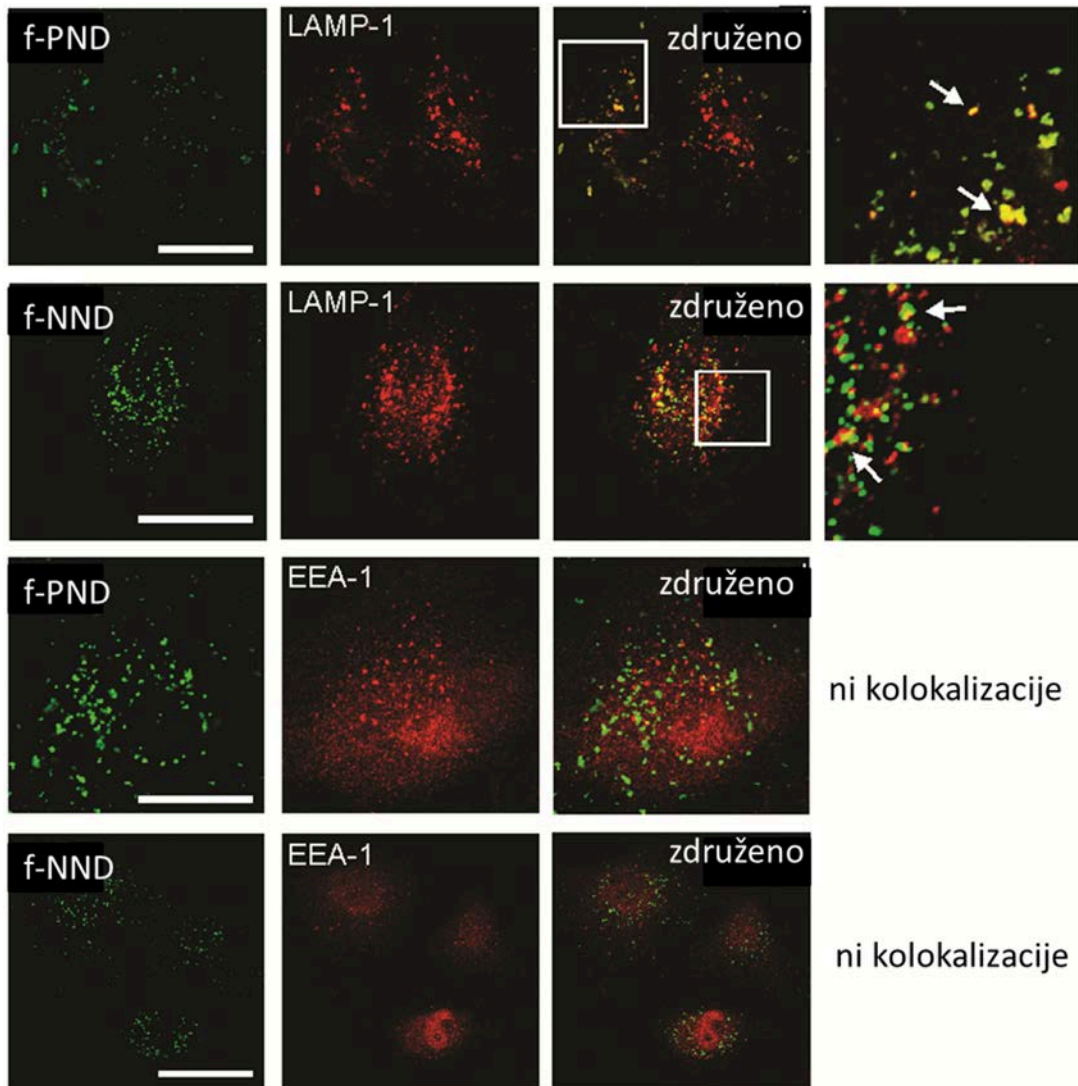
64). Zelena barva je posledica fluorescence nanodelcev, kjer je večja intenziteta barve povezana z višjo koncentracijo fluorescentnih nanodelcev. Nanodelci f-NND se zelo slabo privzamejo v oba tipa celic.



Slika 64: Posnetki iz fluorescenčnega mikroskopa, kjer sem vzorce slikal pod enakimi pogoji. Posnetki so rezultat združevanja slik iz fluorescence in optične mikroskopije. Merilo predstavlja 20 μm .

Znotrajcelična lokalizacija nanodelcev je bila raziskovana na celicah MCF10A neoT s pomočjo raziskave kolokalizacije fluorescentnih nanodelcev in specifičnih označevalcev s konfokalnim mikroskopom. Kot označevalci lizosomov so bili uporabljeni označena kunčja poliklonska protitelesa anti-LAMP-1 in za endosome označena protitelesa anti-EEA-1. Protitelesa so bila označena z drugačnim fluoroforom (barvo) kot je barva vezanega fluoresceina na nanodelcih.

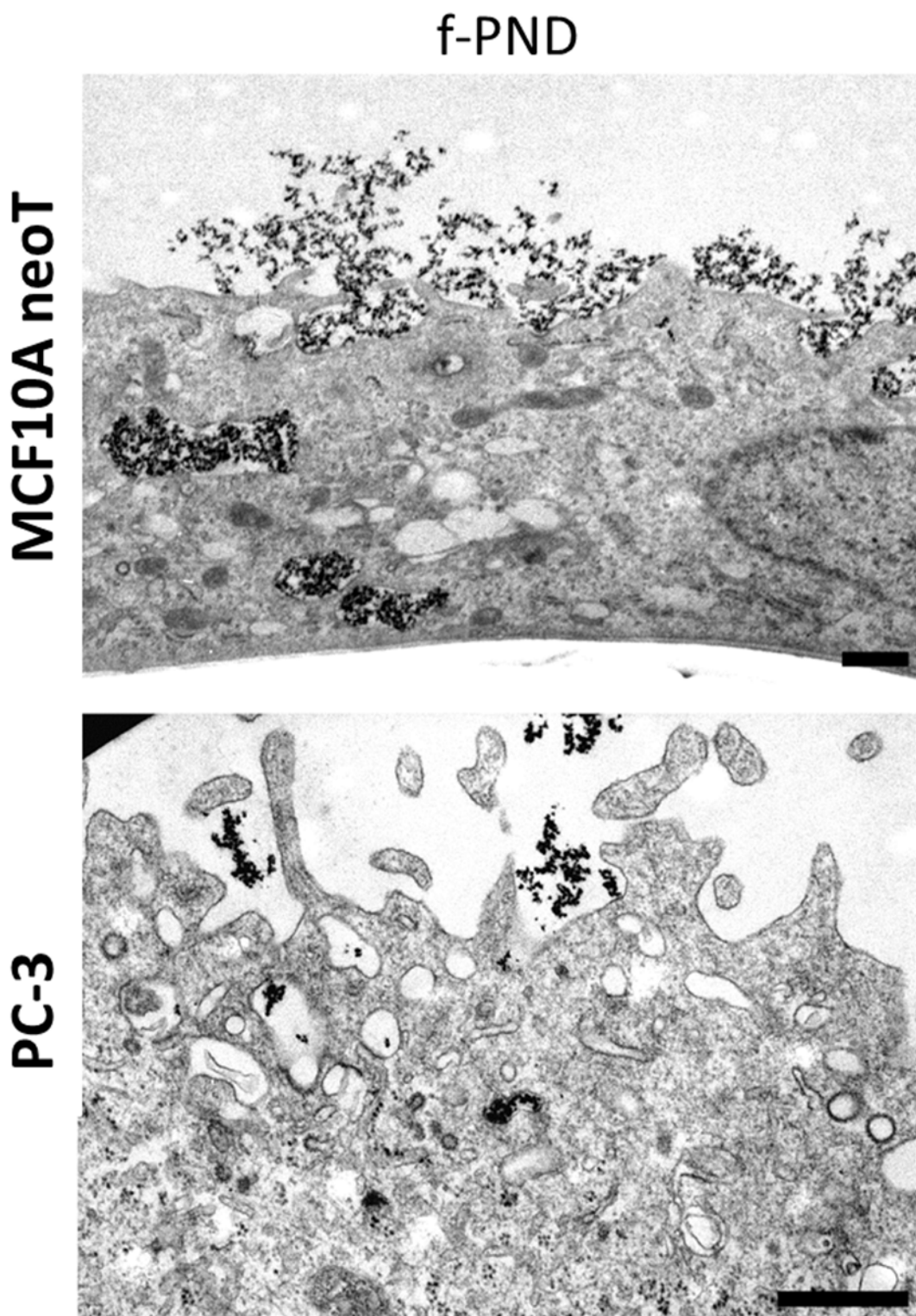
Rezultati analize kolokalizacije so pokazali, da nanodelci f-PND in f-NND kolokalizirajo le z označevalcem anti-LAMP-1. To nakazuje, da se oba tipa fluorescentnih nanodelcev v svojem obsegu celičnega privzema po 4 urah inkubacije nahajata le v lizosomih in ne v endosomih (slika 65).



Slika 65: Kolokalizacija nanodelcev *f*-PND in *f*-NND (zelená fluorescenca) s specifičnimi označevalci lizosomov (*LAMP-1*) in endosomov (*EEA-1*) v celicah MCF10A neoT. Povečava področij kolokalizacije nanodelcev z označevalcem *LAMP-1* je v stolpcu 4 in pripada belem kvadratu v stolpcu 3. Merilo predstavlja 20 μm .

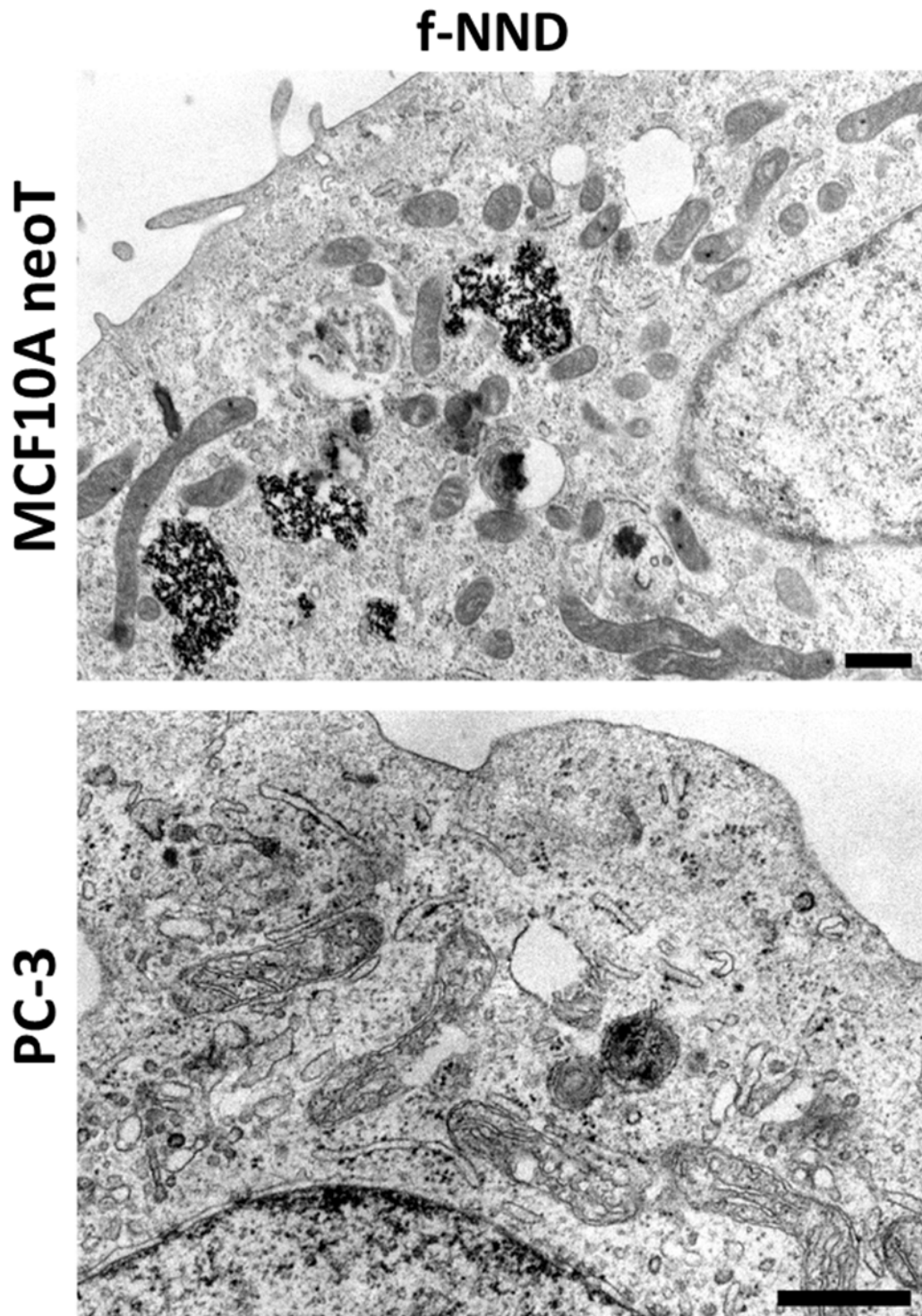
4.9.3 Presevna elektronska mikroskopija

Prezem nanodelcev v celice in njihova subcelularna porazdelitev je bila ovrednotena s presevno elektronsko mikroskopijo (slika 66). Iz slik je razvidno, da je med nanodelci *f*-PND in plazemskimi membranami celic MCF10A neoT in PC-3 prišlo do interakcij.



Slika 66: Ultrastrukturna lokalizacija superparamagnetnih nanodelcev f-PND. Merilo znaša 500 nm.

Celice MCF10A neoT so tvorile številne protruzije, ki so karakteristične za fagocitozo. Pri tem tipu celic so bili nanodelci f-PND skoncentrirani v številnih fagocitotskih veziklih. Pri celicah PC-3 so bili nanodelci f-PND manj opazni v endocitotskih membranskih veziklih, kar nakazuje na manj aktiven privzem nanodelcev v ta tip celic v primerjavi s celicami MCF10A neoT.



Slika 67: Ultrastrukturalna lokalizacija superparamagnetnih nanodelcev f-NND. Merilo znaša 500 nm.

Nanodelcev f-NND ni bilo opaziti v bližini plazemskih membran pri nobenem tipu preučevanih celic (slika 67). Opazni pa so bili v velikih endocitotskih veziklih celic MCF10A neoT. Nanodelce f-NND je bilo mogoče zaznati tudi v lizosomih celic PC-3, kar nakazuje, da je mehanizem privzema nanodelcev f-NND lahko tudi endocitoza v tekoči fazi. Na podlagi opaženih razlik iz posnetkov TEM lahko potrdim, da se nanodelci f-PND močnejše vežejo na plazemske membrane celic, saj jih ni bilo mogoče odstraniti med spiranjem celic po inkubiranju. Privzem nanodelcev v celice MCF10A neo T je

precej intenzivnejši od obsega privzema nanodelcev v celice PC-3. Sklepam lahko, da je mehanizem privzema nanodelcev v celice pogojen z vrednostjo zeta potencialov nanodelcev in tipom celic (fagocitoza pri MCF10A neoT in ne povsem jasno pri celicah PC-3). Ti rezultati se dobro ujemajo z izsledki analiz s pretočno citometrijo.

4.9.4 Obseg privzema določen z magnetometrom SQUID

Privzem superparamagnetnih nanodelcev f-PND in f-NND v celice sem ovrednotil z meritvami magnetizacije s pomočjo magnetometra SQUID po postopku, opisanem v poglavju »Materiali in metode«. Rezultate sem podal v tabeli 6.

Tabela 6: Magnetni moment v nasičenju (p_s) masa nanodelcev (m) in odstotek (P) privzetih nanodelcev na podlagi meritev SQUID. (/) pomeni, da je vrednost pod mejo detekcije.

Vzorec	p_s (brez enote)	m (μg)	P (%)
f-PND@(MCF10A neoT)	$4,0 \times 10^{-4}$	8,5	34,0
f-PND@(PC-3)	$3,9 \times 10^{-4}$	8,3	33,2
f-NND@(MCF10A neoT)	$4,0 \times 10^{-6}$	/	/
f-NND@(PC-3)	$1,6 \times 10^{-6}$	/	/

Z magnetometrom SQUID, ki velja za eno najbolj občutljivejših fizikalnih naprav, so bile izmerjene magnetne lastnosti suspenzijam celic po inkubiranju z nanodelci. S pomočjo enostavne enačbe je bila izračunana masa magnetnih nanodelcev. Rezultat obsega privzema je podan v obliki masnega odstotka P vseh dodanih nanodelcev k celicam (25 μg).

Nanodelci s pozitivnim zeta potencialom f-PND so bili privzeti v oba tipa celic v relativno velikem obsegu. Približno 1/3 vseh dodanih nanodelcev so celice privzele oziroma adsorbirale na svoje površine. Nanodelci z negativnim zeta potencialom f-NND pa so bili privzeti v zelo nizkem obsegu, pod mejo občutljivosti naše metode. Na podlagi meritev magnetnih lastnosti lahko zaključim, da so se nanodelci f-PND privzeli v celice v obsegu, ki je nekaj redov velikosti večji od obsega privzema nanodelcev f-NND.

Rezultati določanja obsega privzema nanodelcev z različnim nabojem v celice se relativno dobro ujemajo. Vse tehnike so pokazale, da se nanodelci s pozitivnim nabojem (f-PND) privzamejo v celice v precej večjem obsegu v primerjavi z nanodelci f-NND.

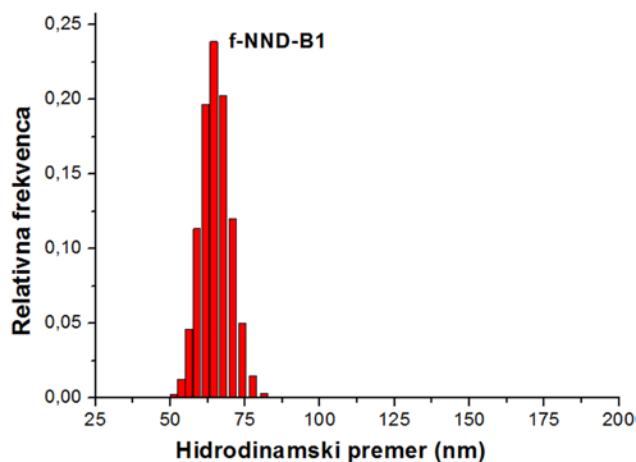
4.10 Priprava biokonjugatov

Za specifičen namen uporabe superparamagnetnih nanodelcev v biomedicini je potrebno na njihove funkcionalizirane površine vezati primerne biološke molekule oziroma makromolekule. V svojem doktorskem delu sem izbral beljakovino epidermalnega rastnega dejavnika (EGF), ki ima sposobnost prepoznavanja receptorjev za EGF (EGFR). Za številne tipe rakavih celic je značilno povečano izražanje receptorjev za EGF, saj se rakave celice značilno hitro in precej nekontrolirano delijo ter tako izkazujejo večje potrebe po gradnikih v primerjavi z zdravimi celicami. Pri delu sta bila izbrana dva tipa celic, in sicer celice A431, ki imajo povečano število receptorjev in celice HeLa, ki nimajo receptorjev za EGF. V raziskavi je bil poudarek na raziskovanju vpliva tipa vezave med nanodelci in makromolekulo na njihovo specifičnost prepoznavanja celic A431. Vezavo bioloških molekul na površine nanodelcev sem imenoval biokonjugacija in produkt vezave biokonjugat.

V raziskavi smo primerjali 5 različnih tipov interakcij med fluorescentnimi nanodelci in makromolekulami EGF. Preračunano teoretično število molekul EGF na nanodelec je

bilo pri vseh tipih vezav konstantno, in sicer 10 molekul EGF na nanodelec. Pri izračunu sem upošteval preračunano maso nanodelca $6,5 \times 10^{-18}$ g. Ob koncu reakcije biokonjugacije sem v reakcijske zmesi dodal prebitno množino Tris-a in reakcijske zmesi pustil mešati še za 30 minut. Molekule Tris-a so preko svoje amino skupine tvorile amidne vezi z aktiviranimi karboksilnimi skupinami na nanodelcih, ki so ostale proste po reakciji z EGF. Molekula Tris ima 3 proste hidroksilne skupine, ki so zagotovile, da so bile površine biokonjugatov pri vseh tipih vezav relativno podobne. Na ta način sem v največji meri izločil vpliv izrazito negativnega naboja pri nanodelcih f-NND in pozitivnega naboja pri nanodelcih f-PND na nespecifičnost privzema biokonjugatov v celice. Vzporedno sem vsem tipom biokonjugatov pripravil kontrolne vzorce, kjer sem pri reakciji biokonjugacije namesto EGF-a uporabil Tris.

Pri 1. tipu vezave sem pripravil biokonjugat z uporabo kemije karbodiimida EDC. Reakcija vezave EGF na površine nanodelcev je potekla v dveh stopnjah, kot sta prikazani na slikah 35 in 36, Materiali in metode. V prvi stopnji sem aktiviral prosto karboksilno skupino na površini nanodelcev s karbodiimidom EDC. Aktivirana karboksilna skupina hitro reagira s Sulfo-NHS, ki spremeni z EDC aktivirano karboksilno skupino v stabilnejšo aktivirano obliko, ester sukcinimida. Reakcija aktivacije je potekla v pufru MES (pH 5,5). Naslednja stopnja, vezava EGF, pa je potekla v pufru PBS (7,4). Prosta amino skupina na makromolekuli EGF reagira s sukcinimidom in tvori amidno vez. Pri tem nastaja Sulfo-NHS kot stranski produkt. Reakcija biokonjugacije je trajala 2 uri, kar je dovolj, da je potekla reakcija med molekulami EGF in karboksilnimi skupinami na površinah nanodelcev. Biokonjugate prvega tipa sem ovrednotil z meritvami hidrodinamskih velikosti delcev v suspenziji z uporabo DLS (slika 68).



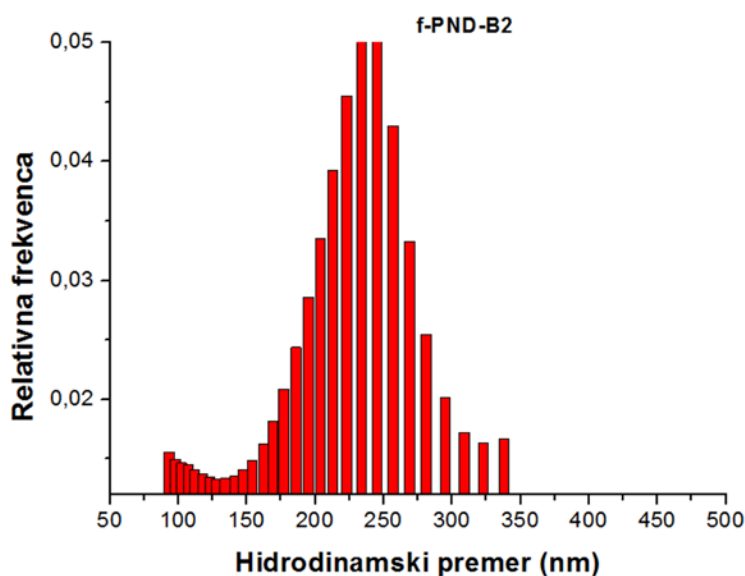
Slika 68: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov f-NND-B1 v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.

Na podlagi rezultatov številčne porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov tipa 1 lahko zaključim, da gre za monodisperzen vzorec s povprečnim hidrodinamskim premerom okoli 60 nm. Z vezavo makromolekul EGF na nanodelce se zaradi močno povečanega hidrodinamskega plašča na površinah biokonjugatov močno poveča njihov hidrodinamski premer. Monodisperznost vzorca nam posredno pove, da so reakcije na površinah koloidov zelo verjetno potekale enakomerno po vsej površini, sicer bi nastajali aglomerati.

Pri 2. tipu vezave sem pripravil biokonjugat med nanodelci f-PND in EGF, ki nastane z uporabo distančne povezovalne molekule BS3 (slika 37, Materiali in metode). Slednja teoretično tvori eno amidno vez z amino skupino na površini nanodelca f-PND in drugo amidno vez z molekulo EGF. V prvi stopnji reakcije sem vezal molekule BS3 na površine

nanodelcev f-PND. Molekula BS3 je distančna povezovalna molekula, ki je reaktivna samo z enim tipom funkcionalnih skupin, amini. Teoretično lahko z enim delom tvori amidno vez z aminom na nanodelcu, kjer pa terminalni del molekule BS3 ostane intakten in tako na voljo za biokonjugacijo. Da sem kar najbolje preprečil kovalentno povezovanje nanodelcev f-PND med seboj preko povezovalne molekule BS3, sem v prvi stopnji dodal 10-kratni prebitek molekul BS3 napram amino skupinam na površinah nanodelcev. Velik prebitek povezovalne molekule, ki povezuje dve enaki funkcionalni skupini, poveča verjetnost, da se bo takšna povezovalna molekula vezala le z enim delom na nanodelec in da bo terminalni del ostal intakten ter tako na voljo za vezavo z amino skupino EGF-a [143]. Po končani prvi stopnji reakcije sem suspenzijo delcev spral in v enakem pufru PBS (pH 7,4) nadaljeval z vezavo EGF. Nanodelci z vezano povezovalno molekulo BS3 imajo na površino terminalno sukcinimidno skupino, ki tvori amidno vez z aminom na EGF.

Biokonjugate drugega tipa sem ovrednotil z meritvami hidrodinamskih velikosti v suspenziji z uporabo DLS (slika 69).



Slika 69: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov f-PND-B2 v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.

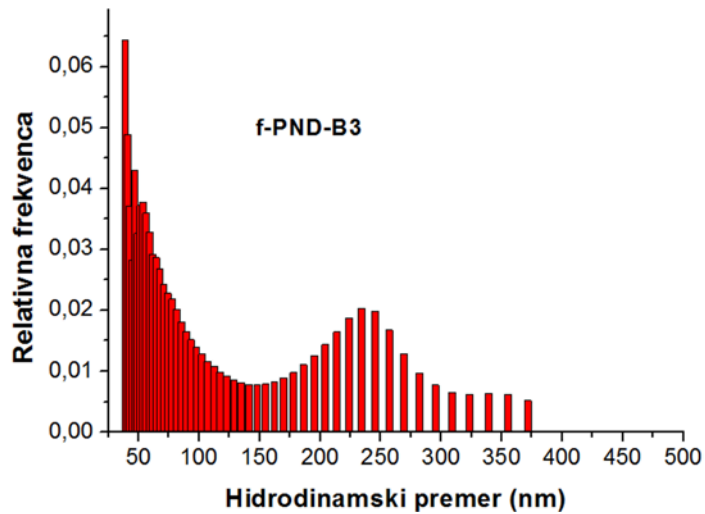
Iz slike 69 je razvidno, da so pri tem tipu biokonjugacije nastali različno veliki aglomerati nanodelcev. Gre za zelo široko porazdelitev velikosti (od 70 nm do 350 nm). Verjetno je nastalo nekaj primernih biokonjugatov (velikost okoli 70 nm), vendar poleg tega tudi večje število aglomeratov velikosti okoli 250 nm. Tako slabo definirani biokonjugati niso primerni za nadaljna testiranja na celicah.

Vzrok široki porazdelitvi velikosti je v reakciji med nanodelci f-PND in BS3, kjer je prišlo kljub velikem prebitku BS3 do povezovanja samih nanodelcev in nastanka aglomeratov.

Pri 3. tipu vezav sem pripravil biokonjugat med nanodelci f-PND in EGF, ki nastane z uporabo pegilirane distančne povezovalne molekule BS(PEG)5. Slednja, prav tako kot BS3, teoretično tvori eno amidno vez z amino skupino na površini nanodelca f-PND in drugo amidno vez z molekulo EGF. S pegilirano povezovalno molekulo BS(PEG)5 sem želel primerjati vpliv alkilne verige (biokonjugat 2) in verige PEG (biokonjugat 3) na končno funkcionalnost biokonjugatov. Potek izvedbe in mehanizem biokonjugacije tipa 3 je enak kot pri tipu 2. Na sliki 38 (Materiali in metode) je shematsko prikazan potek reakcije biokonjugacije, ki sem ga izvedel na zelo podoben način kot v primeru drugega

tipa biokonjugatov.

Biokonjugate tretjega tipa sem ovrednotil z meritvami hidrodinamskih velikosti v suspenziji z uporabo DLS (slika 70).



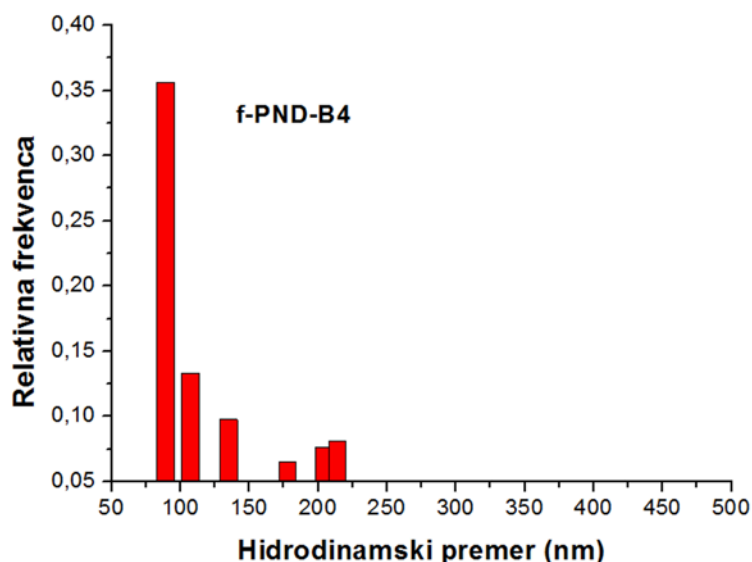
Slika 70: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov *f-PND-B3* v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.

Iz slike 70 je razvidno, da so tudi pri tem tipu biokonjugacije nastali različno veliki aglomerati nanodelcev. Gre za zelo široko bimodalno porazdelitev velikosti (en vrh pri okoli 50 nm in drugi pri 250 nm). Verjetno je nastalo nekaj primernih biokonjugatov (velikost okoli 50 – 70 nm), vendar poleg tega tudi večje število aglomeratov različnih velikosti. Tako slabo definirani biokonjugati niso primerni za nadaljna testiranja na celicah, podobno kot pri biokonjugaciji 2.

Vzrok široki porazdelitvi velikosti je v reakciji med nanodelci *f-PND* in *BS(PEG)5*, kjer je prišlo kljub velikem prebitku pegiliranega *BS(PEG)5* do povezovanja samih nanodelcev in nastanka aglomeratov.

Pri 4. tipu vezave sem pripravil biokonjugate, ki so nastali pod vplivom elektrostatske interakcije med pozitivno nabitimi nanodelci *f-PND* in negativno nabito makromolekulo *EGF* [135]. V tem primeru sem v suspenzijo PBS (pH 7,4) z pozitivno nabitimi nanodelci *f-PND* dodajal negativno nabite molekule *EGF*. Na sliki 39 (Materiali in metode) je shematsko prikazan potek reakcije biokonjugacije.

Biokonjugate četrtega tipa sem ovrednotil z meritvami hidrodinamskih velikosti v suspenziji z uporabo DLS (slika 71).

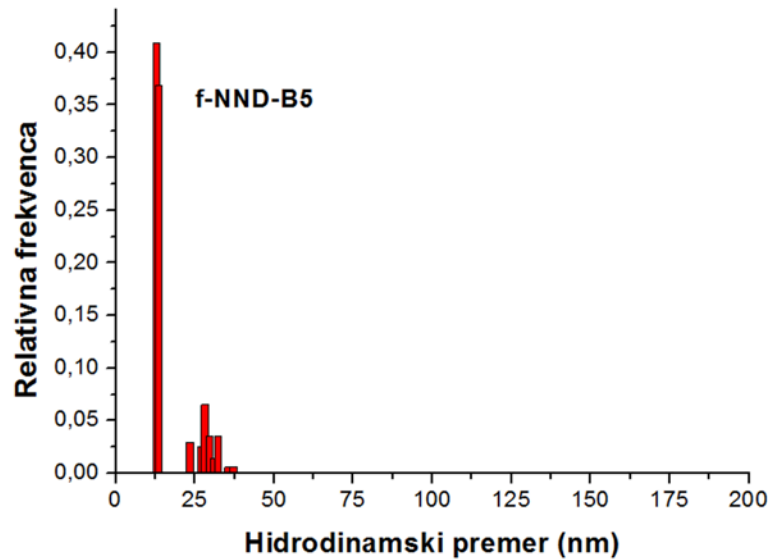


Slika 71: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov *f-PND-B4* v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.

Na podlagi rezultatov številčne porazdelitve hidrodinamskih velikosti delcev v suspenziji biokonjugatov tipa 4 lahko zaključim, da gre v tem primeru za izrazito bimodalno porazdelitev velikosti (en vrh pri okoli 70 nm in drugi pri okoli 230 nm), kjer je številčno največ biokonjugatov primernih velikosti, manjših od 100 nm. Iz histograma je razvidno, da je največje število nanodelcev primernih hidrodinamskih velikosti, okoli 70 nm. Razlog za delno aglomeracijo je v težavni kontroli biokonjugacije, ki temelji na elektrostatskih interakcijah. Ugotovil sem, da hitrost dodajanja raztopine EGF k suspenziji nanodelcev pomembno vpliva na stopnjo aglomeracije. Pomembno je, da raztopino EGF dodajamo k suspenziji nanodelcev počasi med mešanjem, sicer lahko pride do lokalno povišane koncentracije EGF-a v suspenziji nanodelcev, kar vodi v aglomeracijo. Upoštevati je potrebno, da smo pri reakcijah z biološkimi makromolekulami kot je EGF, precej omejeni. Že soniciranje na ultrazvočni kopeli, s katerim bi zmanjšali aglomeracijo, je lahko za molekule EGF uničujoče. Kljub manjši aglomeraciji je večina biokonjugatov primernih velikosti, zato sem se odločil za nadaljne analize s konjugati tipa 4.

Pri 5. tipu vezav sem preučeval interakcijo med negativno nabitimi nanodelci *f-NND* in negativno nabito makromolekulo EGF. S tem tipom interakcije sem želel potrditi elektrostatski odboj med enakoznačno nabitimi nanodelci in EGF, ki bi ga naj po koncu reakcije med spiranjem popolnoma odstranil. Na sliki 40 (Materiali in metode) je shematsko prikazan potek reakcije biokonjugacije.

Biokonjugate petega tipa sem ovrednotil z meritvami hidrodinamskih velikosti delcev v suspenziji z uporabo DLS (slika 72).



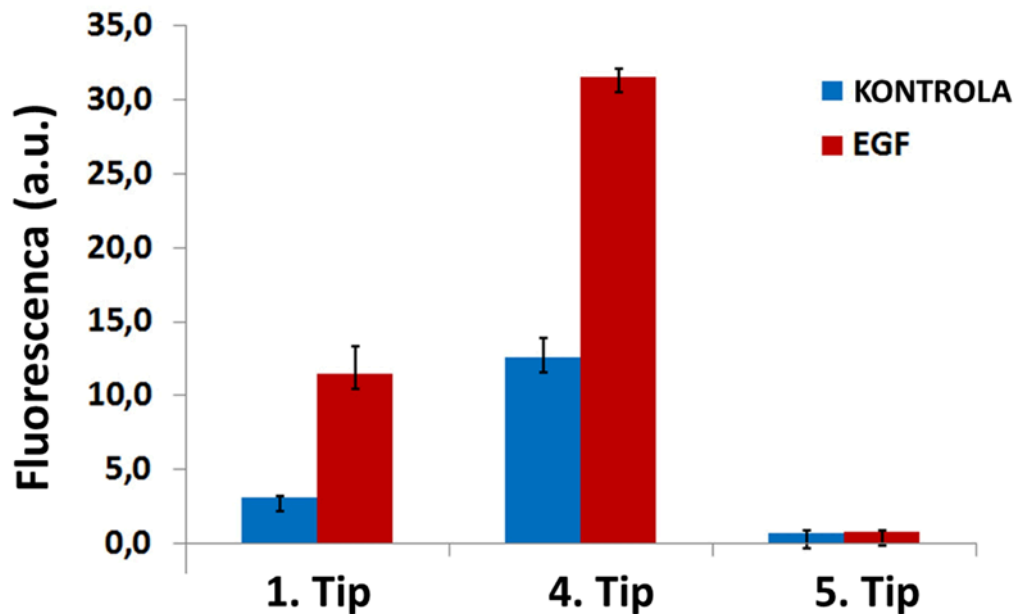
Slika 72: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov *f-PND-B5* v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.

Na podlagi rezultatov številčne porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov v suspenziji tipa 5 lahko zaključim, da gre tudi v tem primeru za bimodalno porazdelitev velikosti nanodelcev v suspenziji. Vrh pri okoli 13 nm lahko predstavlja najverjetneje hidrodinamsko velikost prostih makromolekul EGF v suspenziji. Drugi vrh pri velikosti okoli 28 nm predstavlja hidrodinamsko velikost nanodelcev, ki niso konjugirani z EGF.

Rezultati iz DLS nakazujejo, da ni prišlo do interakcije med nanodelci in EGF. Kljub temu sem s tem tipom biokonjugatov nadaljeval z raziskavami na celicah, kjer so mi služili za dodatno kontrolo.

4.11 Biokonjugati in njihova specifičnost prepoznavanja EGFR pozitivnih celic

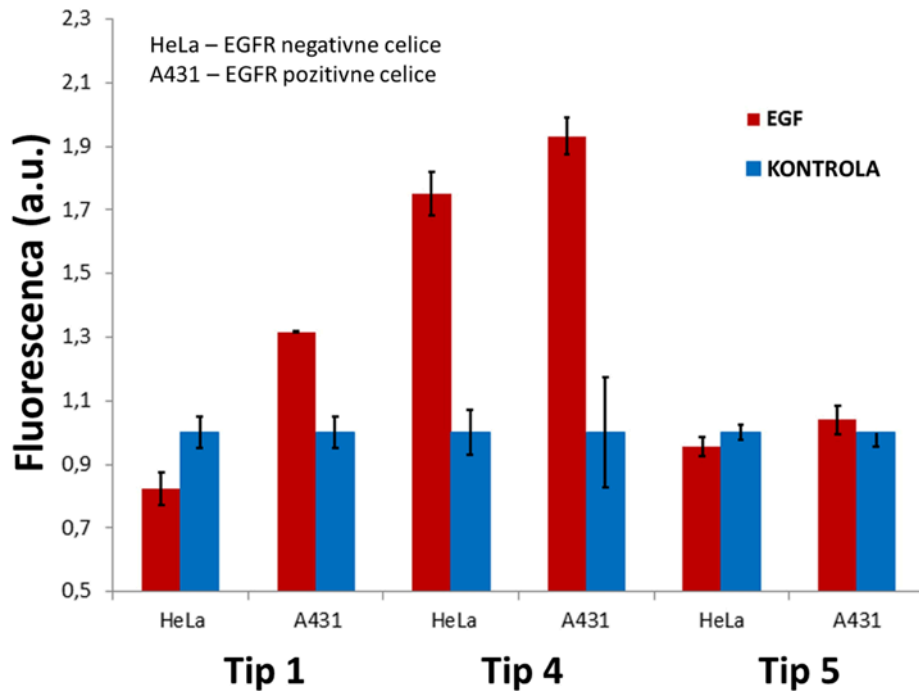
Nadaljne raziskave sem izvedel le za tri tipe biokonjugatov, ki na podlagi rezultatov DLS niso izkazovali intenzivne aglomeracije. Vse tri tipe biokonjugatov sem podrobneje analiziral tako, da sem preveril uspešnost vezave makromolekule EGF na površine fluorescentnih nanodelcev. Pri tem sem uporabil test vezave specifičnih sekundarnih protiteles označenih z Alexa Fluor555, ki specifično prepoznavajo le konformacijsko optimalno vezane molekule EGF na površinah biokonjugatov. Bolj optimalno in v večjem obsegu kot so vezane molekule EGF na biokonjugatih, večja je izmerjena fluorescenca, ki je posledica specifične vezave sekundarnega protitelesa označenega z Alexa Fluor555. Rezultati so prikazani na sliki 73.



Slika 73: Določanje uspešnosti vezave EGF na površine nanodelcev na osnovi merjenja fluorescence.

Na podlagi rezultatov vezav sekundarnih protiteles na površine biokonjugatov lahko sklepam, da so se le-ti v bistveno večji meri vezali na biokonjugate tipa 1 in 4 v primerjavi z njihovimi kontrolnimi vzorci. To potrjuje, da sem v primeru konjugatov tipa 1 in 4 uspešno biofunkcionaliziral nanodelce z makromolekulami EGF. V primeru biokonjugata tipa 5 nisem zaznal bistvene razlike v fluorescenci med vzorcem in kontrolo, kar nakazuje na to, da se molekule EGF niso vezale na površine biokonjugatov.

Specifičnost prepoznavanja tarčnih celic A431 je temeljila na določanju obsega privzema fluorescentnih biokonjugatov (slika 74). Večji kot je obseg privzema biokonjugatov v ciljane celice A431, normaliziran s kontrolnim vzorcem (fluorescentni nanodelci brez EGF) in kontrolnimi celicami HeLa, boljša je specifičnost prepoznavanja tarčnih celic.



Slika 74: Določanje privzema nanodelcev na osnovi merjenja fluorescence za tri raziskovane tipe biokonjugatov.

Rezultati potrjujejo, da je bila največja specifičnost prepoznavanja celic A431 dosežena pri prvem tipu biokonjugatov. Pri tem tipu je obseg privzema biokonjugatov v ciljane celice HeLa manjši od obsega privzema fluorescentnih nanodelcev kontrolnega vzorca, medtem ko je pri ciljanih celicah A431 obseg privzema biokonjugatov signifikantno večji od kontrolnega vzorca. To potrjuje, da je šlo v prvem primeru za specifično ciljanje celic A431. V primeru biokonjugatov tipa 4 je obseg privzema biokonjugatov precej večji od kontrolnega vzorca tako v ciljanih kot v ne ciljanih celicah, kar nakazuje, da je šlo v tem primeru za nespecifično ciljanje celic. V primeru biokonjugatov tipa 5 pa tako med biokonjugati in kontrolnimi vzorci kot tudi med ciljanimi in ne ciljanimi celicami ni bilo signifikantnih razlik. To potrjuje tezo iz rezultatov DLS, da biokonjugati tipa 5 nimajo vezanih molekul EGF na svojih površinah, saj sem jih zaradi elektrostatskega odboja med spiranjem odstranil iz suspenzije.

5 Razprava

Primerno funkcionalizirani magnetni nanodelci, z vezanimi afinitetnimi ligandi in/ali drugimi organskimi molekulami, izkazujejo velik potencial na področju biomedicine in farmacije. Zelo intenzivne so raziskave njihove uporabnosti na področjih ciljanega dostavljanja učinkovin, na področju slikanja z magnetno resonanco, kjer so magnetni nanodelci uporabni kot kontrastno sredstvo, na področju hipertermičnega zdravljenja tumorskega tkiva, kjer prihaja do pregretja lokalnega tkiva pod vplivom delovanja izmeničnega magnetnega polja in na področju separacij v biofarmaceutiki. Vsem uporabam magnetnih nanodelcev na področju biomedicine oziroma nanomedicine je skupna potreba po izjemno dobrem poznavanju in razumevanju vseh sinteznih korakov do priprave uporabnega sistema nanodelec – prevleka – funkcionalizacijski plašč – afinitetni ligandi/fluorescentna barvila.

Za sintezo magnetnih nanodelcev sem izbral metodo soobarjanja, ki omogoča relativno ekonomično pripravo maghemitnih nanodelcev. Soobarjanje ionov Fe^{2+} in Fe^{3+} sem izvedel v dveh stopnjah. V prvi stopnji sem raztopini Fe^{2+} in Fe^{3+} ionov dvignil vrednost pH iz $\sim 2,3$ na pH 3,0 z razredčeno vodno raztopino NH_4OH . Pri tej vrednosti pH se obarjajo le ioni Fe^{3+} v obliki hidroksida $\text{Fe}(\text{OH})_3$, ki se transformira v oksi hidroksid FeOOH [25]. V tej stopnji lahko s spreminjanjem časa zadrževanja pri vrednosti pH 3,0 vplivamo na končno velikost sintetiziranih nanodelcev. Znano je [25, 140], da ohranjanje vrednosti pH 3,0 do 30 minut pomembno vpliva na velikost nanodelcev, medtem ko daljše zadrževanje ne vpliva več bistveno na velikost nanodelcev. Pri podaljšanih časih zadrževanja pri vrednosti pH 3,0 se koncentracija ionov Fe^{3+} zniža pod vrednost potrebno za tvorbo novih jeder, vendar je še vseeno zadosti velika za obarjanje ionov Fe^{3+} na površinah nukleusov FeOOH .

V drugi stopnji sem dodal koncentrirano raztopino NH_4OH s čimer sem v trenutku zvišal vrednost pH na 11. Pri tej vrednosti pH se oborijo tudi ioni Fe^{2+} , ki skupaj z FeOOH tvorijo najprej magnetit (Fe_3O_4), ki se naknadno oksidira v biološko sprejemljivejši maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [91, 92]. Staranje suspenzije sintetiziranih nanodelcev po drugi stopnji ima nepomemben vpliv na končno velikost magnetnih nanodelcev [25, 140]. Velikost magnetnih nanodelcev odločilno vpliva na magnetne lastnosti in posledično na njihovo uporabnost v biomedicini. Nanodelci maghemita so v superparamagnetnem stanju pri velikostih pod ~ 15 nm.

Metoda soobarjanja železovih ionov zagotavlja kristalinične nanodelce, kjer je kontroliranje velikosti sintetiziranih nanodelcev precej težavno.

Sintetizirani magnetni nanodelci izkazujejo tendenco po aglomeraciji, ki je problematična z vidika nadaljne funkcionalizacije nanodelcev. Stabilna suspenzija magnetnih nanodelcev je pogoj za uspešno pripravo večnamenskih nanodelcev. Aglomeracijo povzročijo van der Waals-ove privlačne sile, ki prevladajo nad odbojnimi elektrostatskimi silami med nanodelci. Z adsorbicijo citronske kisline na površine nanodelcev sem zvišal absolutno vrednost zeta potenciala, kar pomeni povečano gostoto negativnega naboja na površinah nanodelcev. Takšne suspenzije nanodelcev so koloidno stabilne, saj prispevek elektrostatskih odbojnih sil prevlada nad privlačnimi van der Waals-ovimi silami.

Citronsko kislino sem adsorbiral na površine sintetiziranih nanodelcev v vodnem

mediju, kjer sem po dodatku citronske kisline v suspenzijo uravnal vrednost pH na 5,2. Pri tej vrednosti pH sta večinoma dve karboksilni skupini (60 mol.%) citronske kisline disociirani ($-\text{COO}^-$) in se vežeta na pozitivno nabito površino magnetnih nanodelcev [139, 140]. Po koncu reakcije adsorbcije citronske kisline na površine nanodelcev sem dvignil vrednost pH na 10,1, kjer je popolnoma disociirana tudi tretja – nevezana karboksilna skupina. Slednja zagotovi povečano gostoto negativnega naboja na površinah nanodelcev, kar omogoča pripravo stabilne suspenzije nanodelcev.

Adsorbirana citronska kislina sicer s svojo prosto karboksilno skupino omogoča tvorbo kovalentne vezi s primernimi organskimi molekulami, vendar je sama citronska kislina na površinah nanodelcev le adsorbirana. Citronska kislina se možno veže (kompleksira) na atome Fe na površini nanodelca, vendar se s časom v obliki železovega citrata odcepi iz površine nanodelca in tako raztaplja nanodelce. Pri tem gre tudi za ravnotežni proces med adsorbirano citrsko kislino na površinah in prosto citrsko kislino v suspenziji, kjer se v primeru razredčenja suspenzije nanodelcev oziroma spiranja suspenzije vedno znova vzpostavlja novo ravnotežje med adsorbirano in nevezano obliko.

Adsorbicija citronske kisline na površine nanodelcev je pri mojem doktorskem delu služila zgolj pripravi stabilne suspenzije nanodelcev in ne nadaljni vezavi različnih organskih molekul (konjugacijam).

Za močno vezavo različnih bioloških (makro)molekul na površine nanodelcev je željeno, da površine nanodelcev prevlečemo bodisi z organskimi ali anorganskimi prevlekami. Lastnosti obeh tipov prevlek sem podrobneje opisal v uvodnem poglavju 1.5 »Biokompatibilne prevleke nanodelcev«. Organske prevleke so navadno adsorbirane na površine nanodelcev. Za razliko od citronske kisline, ki je adsorbirana preko dveh nabitih karboksilnih skupin in služi elektrostatski stabilizaciji nanodelcev v suspenziji, je pri polimernih molekulah navadno ogromno število funkcionalnih skupin, preko katerih se polimerna molekula lahko adsorbira na površine nanodelcev. Kljub temu, da jakost posamezne interakcije ni posebej močna, k celokupni interakciji pomembno prispeva najverjetneje veliko število šibkih vezi na 1 polimerno molekulo. Pri nadaljnjih reakcijah vezave različnih organskih molekul na prevlečene nanodelce se lahko zgodi, da pride do razgradnje organskih prevlek, še posebej, če reakcije izvajamo pod ostrimi reakcijskimi pogoji. Organske prevleke so precej razvejane in imajo visoko koncentracijo funkcionalnih skupin, preko katerih lahko neposredno kovalentno vežemo biološko zanimive molekule. Drugo skupino predstavljajo anorganske prevleke, ki so navadno zelo rigidne strukture in so močno vezane z atomi na površini nanodelca. Površine anorganskih prevlek lahko tvorijo močne specifične interakcije z organskimi molekulami in omogočijo uvedbo različnih funkcionalnih skupin v visokih koncentracijah. Takšna primera sta interakcija med površino Au in skupino $-\text{SH}$ [60, 61] ali reakcija prevleke silike z alkoksi silani [57].

Sposobnost tvorbe močnih vezi, možnost uvedbe različnih funkcionalnih skupin v visokih koncentracijah in zmožnost izvajanja reakcij pri zelo različnih reakcijskih pogojih dajejo prednost prevleki silike pred ostalimi prevlekami. Prevleka silike je nemagnetna, zato se magnetne lastnosti magnetnih nanodelcev, prevlečenih s siliko, z debelino prevleke hitro slabšajo. S tem razlogom sem se odločil za poglobljeno raziskavo priprave najtanjših, neprekinjenih in homogenih prevlek silike. V literaturi velja sinteza takšne prevleke za raziskovalni izziv [64, 65].

Pripravo prevlek silike na površinah nanodelcev, stabiliziranih s citrsko kislino, je raziskoval že Deng s sodelavci [71]. Prevleka silike ima veliko gostoto površinskih silanolnih skupin $\text{Si}-\text{OH}$, kar pomeni veliko število vezalnih mest za vezavo silanov, ki na površine nanodelcev uvedejo različne funkcionalne skupine. Pri raziskavi priprave tanke in enakomerne prevleke silike sem preučeval vpliv vrednosti pH suspenzije, tipa katalizatorja, koncentracije suspenzije nanodelcev in utežnega odstotka TEOS-a v etanolu

na kakovost prevlek silike. Amorfnost plast silike nastane s hidrolizo TEOS-a in kondenzacijo $\text{Si}(\text{OH})_4$, pri čemer je potrebno izbrati pogoje, kjer je favorizirana heterogena nukleacija. Z izborom parametrov sem vplival predvsem na hitrost hidrolize TEOS-a in na hitrost kondenzacije silicijeve kisline. Vrednost pH pomembno vpliva na obe hitrosti. V nevtralnem sta tako hidroliza kot kondenzacija zelo počasni, medtem ko se z višanjem vrednosti pH na 11 bolj poviša hitrost hidrolize. Pri tem nastaja silika, ki začne homogeno nukleirati, ko koncentracija preseže kritično vrednost. To navadno vodi do nastanka nanodelcev silike in neenakomerne prevleke. V našem primeru, kjer sem sintetiziral zelo tanke prevleke, je dodatek TEOS-a tako majhen, da koncentracija ni presegla kritične vrednosti, kar bi lahko vodilo do homogene nukleacije pri visoki vrednosti pH 12. Katalizator ima pomembno vlogo pri nagubanosti oziroma zrnatosti prevleke silike. V primeru uporabe katalizatorja KOH je sintetizirana prevleka bolj zrnata, pa kljub temu homogena in enakomerna. Povečana zrnatost vpliva na povečano specifično površino in posledično višjo koncentracijo vezanih silanskih molekul. To je bila prednost pred prevleko, ki je bila sintetizirana s pomočjo katalizatorja NH_4OH . Dodatek etanola sicer ugodno upočasni reakcije, vendar negativno vpliva na stabilnost suspenzije, saj precej zniža dielektrično konstanto medija, kar zmanjša elektrostatski odboj med nanodelci [57].

Kakovost in debeline prevlek sem preverjal z analizami posnetkov HREM in določanjem sestave materiala s pomočjo EDXS. Z analizo EDXS sem določal odstotek atomov Fe, O in Si na posameznih nanodelcih. Izmerjene vrednosti sem primerjal s teoretičnimi sestavami nanodelcev, prevlečenih z različno debelimi prevlekami silike. Na podlagi analiz s presevnim elektronskim mikroskopom lahko dobimo informacije le o manjšem številu nanodelcev (nekaj 100 nanodelcev), kar pa je težko posplošiti na oceno celotnega vzorca. Odločil sem se za dodatne analize, ki nam dajo informacije o kakovosti prevlek za večji del vzorca. Pri tem sem se odločil za meritve magnetnih lastnosti (nekaj mg nanodelcev), kjer se s spreminjanjem debeline nemagnetne prevleke spreminja nasičena magnetizacija materiala. Z magnetnimi meritvami sem pokazal, da se nasičena magnetizacija suhe snovi sorazmerno zmanjšuje z večanjem debeline nemagnetne prevleke silike. Poleg magnetnih meritev sem uporabil metodo raztapljanja nanodelcev v kislem. Magnetni nanodelci se v zelo kislem mediju raztapljajo, medtem ko je prevleka silike v kislem netopna. To pomeni, da nepopolna in neenakomerna prevleka silike na nanodelcih v manjši meri ovira raztapljanje magnetnih nanodelcev kot popolna in enakomerna prevleka. Manjša kot je določena koncentracija ionov Fe v raztopini po raztapljanju, bolj kakovostna je prevleka.

Poudariti je potrebno, da lahko funkcionalizacijo nanodelcev s silani izvedemo tudi brez predhodnega prevlečenja nanodelcev s plastjo silike. Pri tej neposredni funkcionalizaciji je, zaradi slabe koloidne stabilnosti nanodelcev tekom reakcije in nižje koncentracije $-\text{OH}$ skupin na površinah neprekritih oksidnih nanodelcev, možno vezati precej nižje koncentracije silanov [82]. Za povečanje reaktivnosti površin nanodelcev napram silanom je zadostna že zelo tanka prevleka silike. Pri eno-plastni debelini prevleke silike ($\text{Si}-\text{OH}$) se magnetne lastnosti ne poslabšajo bistveno, obenem pa na tako prekrita nanodelca lahko učinkovito vezemo molekule silanov.

Nanodelci, prevlečeni s siliko, zagotavljajo visoko koncentracijo površinskih silanolnih $-\text{OH}$ skupin, ki pa ne ponujajo velikih možnosti za vezavo različnih organskih molekul. Organske molekule in še večje biološke makromolekule potrebujejo precejšen steričen prostor za uspešno vezavo, kar pa konformacijsko zelo omejene, neposredno na površino vezane silanolne $-\text{Si}-\text{OH}$ skupine ne omogočajo. Na trgu obstajajo različne silanske molekule, ki imajo na terminalnem koncu alkilne verige različne za biokonjugacijo primerne funkcionalne skupine. S tem razlogom je potrebno nanodelce, prevlečene s siliko, nadalje funkcionalizirati z vezavo alkoksi silanov. Slednji so

anorgansko-organske molekule, ki na eni strani po hidrolizi alkoksi skupin tvorijo močne siloksanske vezi (Si-O-Si) s površino prevleke silike, na drugi strani pa uvedejo na nanodelec primerno distancirane funkcionalne skupine. V literaturi je najpogosteje opisana uvedba amino skupine [81, 144].

Raziskava uvedbe amino skupin na površine nanodelcev je temeljila na vezavi štirih različnih amino silanov. Mehanizem hidrolize in kondenzacije alkoksi skupin amino silanskih molekul je podoben kot pri TEOS-u. Mehanizem reakcij vezave molekul silanov na površine nanodelcev sem podrobneje razložil v uvodnem poglavju 1.6 »Funkcionalizacija nanodelcev s silani«. Pomembne razlike so v kinetikah reakcije hidrolize alkoksi skupin, saj je zaradi ene alkilne verige in treh alkoksi skupin hidroliza trialkoksi silanov počasnejša od tetraalkoksi silana - TEOS-a. Zaradi tega sem reakcije vezave silanov izvajal pri povišanih temperaturah (50 °C). Poleg tega so razlike tudi v končnem produktu, ki je posledica kondenzacije. Silicijeva kislina, ki nastane s hidrolizo TEOS-a, hitro reagira preko vseh štirih vezi z drugimi molekulami silicijeve kisline in tvori polikondenzate. Pri trialkoksi silanih je zaradi ene alkilne verige ta proces nekoliko oviran, kar je ugodno pri tvorbi enakomerne plasti silanskih molekul na površinah nanodelcev prevlečenih s siliko.

Najprej sem uporabil (3-aminopropil)trietoksi silan APS, ki je v literaturi najpogosteje omenjen. Tekom reakcije vezave APS na nanodelce, prevlečene s siliko, se je pojavila aglomeracija, zaradi česar ne moremo pričakovati enakomernega produkta. Pri kemijskih reakcijah na površinah nanodelcev je za enakomernost vezav po vsej površini nanodelca potrebno zagotoviti zelo dobro koloidno stabilnost reakcijske zmesi. Molekule APS tvorijo po hidrolizi v vodi najprej H-vezi med seboj (silanolne -OH skupine) in s površinskimi -OH skupinami na nanodelcih, prevlečenih s siliko. Po tem začno reaktivne silanolne skupine, ki nastanejo po hidrolizi alkoksi skupin, kondenzirati. Če reakcija poteka prehitro, potem je velika verjetnost, da reaktivne silanolne skupine silana v suspenziji reagirajo med seboj. Ti skupki kondenziranih molekul silanolov zamrežujejo tudi nanodelce, kar povzroča aglomeracijo. Tako postanejo površine nanodelcev v aglomeratih nedostopne amino silanskim molekulam APS, ki jih želimo vezati. Podobno se je aglomeracija pojavila še pri dveh testiranih trialkoksi silanih, in sicer pri N-(3-aminoheksil)propilmetiltrimetoksi silanu AHMS in N-(3-tritoksisililpropil)etilendiaminu EPAS. Pri slednjih dveh silanih sem raziskoval vpliv spremembe v polarnosti alkilne verige na homogenost produkta. Molekula AHMS je manj polarna v primerjavi z molekulo EPAS, saj ima AHMS daljšo alkilno (heksilno) verigo med primarno in sekundarno amino skupino. Ker je bila aglomeracija tekom reakcije funkcionalizacije najintenzivnejša pri silanu AHMS, lahko sklepam, da ima manjša polarnost alkilne verige negativen vpliv na enakomernost sloja funkcionalizacijskih molekul. Pri vseh treh testiranih trialkoksi silanih se je tekom reakcije pojavila aglomeracija, kar pomeni, da so takšni nanodelci neuporabni za nadaljne biofunkcionalizacije.

Sklepal sem, da so tri alkoksi skupine na silanu, ki lahko hidrolizirajo in tvorijo siloksanske vezi, preveč za nastanek enakomernega sloja silanskih molekul v eno-sloju. Moon s sodelavci je pokazal [81], da se lahko molekule silana vežejo na površino silike preko dveh siloksanskih vezi. Tretja alkoksi skupina je po hidrolizi sterično ovirana za vezavo na površino nanodelca in lahko tvori siloksansko vez z drugo molekulo silana v njeni bližini, kar vodi v nastanek polikondenziranega skupka silanskih molekul. Nanodelci tako nimajo površin prekritih s homogenim plaščem silanskih molekul v eno-sloju in so obenem zamreženi med seboj preko polikondenziranih skupkov v aglomerate.

Rešitev, ki sem jo uporabil pri svojem delu, je bila silanska molekula 3-(2-aminoetilamino)propilmetildimetoksi silana APMS. Gre za amino silan, ki ima dve alkoksi skupini, eno alkilno verigo z amini (s primarno in sekundarno amino skupino) in metilno skupino, ki je vezana na centralni atom Si in ne more hidrolizirati. Bistvena je

zamenjava tretje alkoksi skupine z metilno skupino, saj metilna skupina ne hidrolizira in zato ne more tvoriti siloksanske vezi z drugo molekulo silana. V tem se silan APMS pomembno razlikuje od ostalih amino silanov v raziskavi. Metilna skupina na silanu APMS onemogoča nastanek polikondenzatov in tako omogoča pripravo nanodelcev z enakomernim eno-slojem molekul APMS na površinah nanodelcev. Reakcijska suspenzija je bila tekom reakcije vezave silana APMS popolnoma koloidno stabilna (nanodelci se niso aglomerirali). S preprostim spreminjanjem koncentracije dodanega APMS sem kontrolirano spreminjal površinsko koncentracijo silanskih molekul oziroma amino skupin. Površinske koncentracije amino skupin sem kvantitativno določeval s konduktometričnimi titracijami. V stanju nasičene površine s površinskimi molekulami silana APMS sem določil okoli 4,6 amino skupin na 1 nm^2 površine nanodelcev, kar predstavlja 2,3 molekule APMS na 1 nm^2 . V literaturi najpogosteje uporabljen silan APS so uspeli na površine nanodelcev vezati v višjih koncentracijah, in sicer okoli 4 molekule na 1 nm^2 površine nanodelcev [82]. Razlog za nižjo površinsko koncentracijo molekul APMS v primerjavi z APS je v tem, da je molekula APMS nekoliko večja, saj zaradi metilne skupine, ki ne more hidrolizirati, molekula APMS zasede večji steričen prostor. Drugi razlog pa je morda v tem, da APS ne tvori enakomernega eno-sloja, temveč na površino nanodelcev oziroma aglomeratov vezane zamrežene kondenzirane skupke APS. Ti skupki molekul APS so bogati z amino skupinami, ki jih s konduktometrično titracijo zaznamo in tako prispevajo k na videz višji površinski koncentraciji.

Pri številnih uporabah nanodelcev v biomedicini je željeno, da lahko na površino nanodelca vežemo vsaj dva ali več različnih tipov organskih molekul oziroma makromolekul. Na primer, na 10 % funkcionalnih skupin vežemo biološke makromolekule in na preostalih 90 % skupin zdravilno učinkovino. Ena od najenostavnejših možnosti za pripravo takšnih večnamenskih nanodelcev je, da na površino nanodelcev vežem molekule amino silana v prvi stopnji in nato v drugi stopnji znan delež površinskih amino skupin s primerno kemijo spremenim v karboksilne kisline.

Za uvedbo karboksilnih skupin na površinske amino skupine na nanodelcih sem uporabil sukcin anhidrid (SA), ki pri sobni temperaturi v topilu DMF tvori kovalentno vez z amino skupino. V raziskavi pokažem, da lahko s spreminjanjem količine dodane SA kontroliram razmerje med prostimi amino skupinami in uvedenimi karboksilnimi skupinami na površinah nanodelcev.

S konduktometričnimi titracijami sem določal koncentracije amino skupin na površinah nanodelcev, kjer sem iz porabe kisline HCl preračunal koncentracijo preostalih nezreagiranih amino skupin in posledično odstotek uvedenih karboksilni skupin. Pokazal sem, da se s povečevanjem molarne razmerja SA/APMS sorazmerno povečuje odstotek uvedenih karboksilnih kislin. Zanimivo je bilo, da je pri prebitku SA, kjer bi pričakoval, da ne bo več prostih amino skupin na nanodelcih, le polovica površinskih skupin karboksilnih. Sklepal sem, da ciklična molekula SA ne more reagirati s sekundarno amino skupino na vezani molekuli APMS zaradi steričnih ovir. Koncentracija amino skupin (primarnih in sekundarnih) na površini nanodelcev je 4,6 skupine na 1 nm^2 površine nanodelca, kar nakazuje, da so molekule APMS na površini nanodelcev tako goste, da so notranje sekundarne amino skupine praktično nedostopne za reakcijo z molekulami SA.

Z reakcijo med molekulo APMS in SA, brez prisotnosti nanodelcev, sem želel potrditi svojo hipotezo o nezmožnosti reakcije med sekundarno amino skupino APMS-ja, vezanega na nanodelec in molekulo SA. Pri enakih pogojih, kot sem jih izbral pri reakciji uvedbe karboksilnih skupin na nanodelce, sem izvedel reakcijo med SA in APMS. Pri tem sem se odločil za molarne razmerja SA/APMS 1 ali 2 in tako sintetiziral nova reagenta (APMS-SA)1 in (APMS-SA)2. Takšna razmerja SA/APMS sem izbral zato, ker pri molarne razmerju 1, molekula SA preferenčno reagira s primarno amino skupino molekule APMS. V primeru 2-kratnega prebitka molekul SA, pa molekule SA reagirajo

tudi s sekundarno amino skupino na prosti molekuli APMS v raztopini. Sintetizirana silana sem vezal na površino nanodelcev po enakem postopku, kot sem ga uporabil pri vezavi silana APMS. Strukture sintetiziranih karboksi silanov sem potrdil z analizami HRMS in ATR-FTIR. S konduktometričnimi titracijami sem potrdil, da v primeru vezave karboksi silana (APMS-SA)₂ na površine nanodelcev ni bilo zaznati amino skupin.

Biomedicinske raziskave nanodelcev pogosto temeljijo na zaznavanju nanodelcev na osnovi njihove fluorescence. V ta namen sem na del amino skupin na površinah nanodelcev kovalentno vezal molekule fluoresceina. Pri tem sem uporabil s sukcinimidil estrom aktivirane molekule fluoresceina, ki tvorijo močne kovalentne vezi s prostimi terminalnimi amino skupinami na površinah. Dobro sprano suspenzijo fluorescentnih nanodelcev f-PND sem naknadno ultrafiltriral in raztopino filtrata preveril na fluorescenco. Pomembno je, da so molekule fluoresceina na površine nanodelcev dobro vezane in se ne spirajo, saj bi bili s tem rezultati merjenja fluorescence napačni. S konduktometrično titracijo sem določil površinsko koncentracijo prostih amino skupin na fluorescentnih nanodelcih, kjer so protoni kisline reagirali le s prostimi amino skupinami. Rezultat je pokazal praktično enako koncentracijo amino skupin, kot sem jo določil pri nanodelcih z najgostejšim plaščem molekul APMS. To pomeni, da se je fluorescein vezal le na manjši delež površinskih amino skupin. Razlika v fluorescenci med dobro spranim vzorcem nanodelcev f-PND in kontrolo je bila očitna.

Za pripravo fluorescentnih nanodelcev s prostimi karboksilnimi skupinami (f-NND) sem uporabil kot izhodiščne fluorescentne nanodelce s prostimi amino skupinami (f-PND). Za uvedbo karboksilnih skupin na površinske amino skupine sem uporabil molekule SA. Med nanodelci f-PND in f-NND ni bilo bistvenih razlik v fluorescenci, kar pomeni, da so si nanodelci f-PND in f-NND različni le po vrednostih zeta potencialov. Nanodelci f-PND so pri fiziološki vrednosti pH pozitivno nabiti (amino skupine), medtem ko so nanodelci f-NND pri fiziološki vrednosti pH negativno nabiti (karboksi skupine).

V objavljeni literaturi sem zasledil veliko raziskav, kjer so preučevali vpliv površinskega naboja različnih nanostruktur na njihov privzem v različne celice. Pri tem so pogosto raziskovali mehanizme privzema različnih nanostruktur v celice. V literaturi nisem zasledil raziskave, kjer bi raziskovali mehanizem in obseg privzema enako velikih magnetnih nanodelcev z različnim nabojem na površinah (zeta potencialih). Pri raziskavah določanja obsega privzema nanodelcev v celice sem sodeloval pri razvoju metode z magnetometrom SQUID, ki omogoča kvantitativno merjenje vsebnosti nanodelcev v suspenziji živih celic. Magnetomer SQUID je bil v literaturi za namen določanja obsega privzema magnetnih nanodelcev v celice zelo redko uporabljen.

Mehanizem privzema nanodelcev v celice ni odvisen le od velikosti, oblike in funkcionalizacijskega sloja molekul, temveč tudi od čistosti nanodelcev, kemijske sestave, stanja koloidne stabilnosti suspenzije, interakcij nanodelec – beljakovina, pogojev inkubacije, tipa celic in še številnih drugih dejavnikov [145]. Pri naši raziskavi sem želel ohraniti zgoraj omenjene dejavnike čimbolj nespremenjene, z izjemo vrednosti zeta potencialov suspenzij nanodelcev. Pri vrednotenju obsega privzema nanodelcev z različnim površinskim nabojem v celice MCF10A neoT in PC-3 smo uporabljali različne metode. Poleg že omenjene razvite metode z magnetometrom SQUID smo uporabljali še pretočni citometer in fluorescenčni mikroskop. Rezultati vseh analiz so pokazali, da je obseg privzema pozitivno nabitih nanodelcev f-PND bistveno večji od obsega privzema negativno nabitih nanodelcev f-NND v oba tipa celic. Zunanje površine celičnih membran so negativno nabite in elektrostatsko privlačijo pozitivno nabite nanodelce [142]. Kljub temu ima zunanja površina membran manjša kationska področja, ki so lahko povezana z mehanizmom privzema negativno nabitih nanodelcev [146]. Močnejša in dolgotrajnejša interakcija med nanodelci f-PND in površinami celičnih membran je najverjetnejši vzrok za povečan obseg privzema v celice.

Pri raziskovanju mehanizma privzema nanodelcev v celice in njihove subcelularne lokalizacije je bil uporabljen presewni elektronski mikroskop in konfokalni mikroskop. Pri slednjem so bili uporabljeni specifični označevalci celičnih organelov, kjer smo s pomočjo fluorescence lokalizirali privzete fluorescentne nanodelce. Tako nanodelci f-PND kot tudi f-NND kolokalizirajo v celicah MCF10A neoT le z označevalcem lizosomov LAMP-1, kar nakazuje, da se oba tipa fluorescentnih nanodelcev v svojem obsegu celičnega privzema po 4 urah inkubacije nahajata le v lizosomih in ne v endosomih. Lee je s sodelavci raziskoval mehanizem privzema kationskih nanodelcev [147], ki so po velikosti in naboju primerljivi s pozitivno nabitimi f-PND. Pokazal je, da kationski nanodelci kolokalizirajo z lizosomskim označevalcem LAMP-1, kar bi lahko bilo povezano s podobnim mehanizmom privzema.

Na podlagi posnetkov TEM lahko opazimo, da so celice MCF10A neoT tvorile številne protruzije, ki so karakteristične za fagocitozo. Pri tem tipu celic so bili nanodelci f-PND skoncentrirani v številnih fagocitotskih veziklih. Pri celicah PC-3 so bili nanodelci f-PND manj opazni v endocitotskih membranskih veziklih, kar nakazuje na manj aktiven privzem nanodelcev v ta tip celic v primerjavi s celicami MCF10A neoT. Nanodelcev f-NND ni bilo opaziti v bližini plazemskih membran pri nobenem tipu preučevanih celic. Opazni pa so bili v velikih endocitotskih veziklih celic MCF10A neoT. Nanodelce f-NND je bilo mogoče zaznati tudi v lizosomih celic PC-3, kar nakazuje, da je mehanizem privzema nanodelcev f-NND lahko tudi endocitoza v tekoči fazi. Na podlagi opaženih razlik iz posnetkov TEM lahko potrdimo, da se nanodelci f-PND močneje vežejo na plazemske membrane celic, saj jih ni bilo mogoče odstraniti med spiranjem celic po inkubiranju. Privzem nanodelcev v celice MCF10A neoT je intenzivnejši od obsega privzema nanodelcev v celice PC-3. Skleпам lahko, da je mehanizem privzema nanodelcev v celice pogojen predvsem z vrednostjo zeta potencialov nanodelcev in tipom celic (fagocitoza pri celicah MCF10A neoT in endocitoza v tekoči fazi pri celicah PC-3).

Pri publikacijah pogosto manjka popolno vrednotenje nanodelcev, ki nam da celovito sliko o koloidni stabilnosti nanodelcev v kompleksnem celičnem gojišču. Pogosto navajajo vrednosti zeta potencialov, izmerjenih v vodnih suspenzijah nanodelcev, medtem ko inkubirajo nanodelce s celicami v celičnih gojiščih s serumskimi proteini. Pogoste so tudi objave, kjer določajo vrednosti zeta potencialov v gojiščih brez serumskih proteinov in nato te vrednosti upoštevajo pri raziskavah *in vivo*. Pokazali smo, da imajo serumski proteini pri inkubiranju nanodelcev s celicami pomembno vlogo pri nespecifični adsorpciji proteinov iz celičnega gojišča, kar pomembno vpliva na površinske lastnosti nanodelcev. V raziskavi smo pokazali, da ima pufer PBS (pH 7,4) ali gojišče PBS + FBS (goveji serum) signifikanten vpliv na vrednost zeta potenciala nanodelcev v teh suspenzijah. Predvidevamo, da ima nespecifična adsorpcija serumskih proteinov iz FBS, ki tvori proteinski plašč (angl. protein corona), pomemben vpliv na mehanizem privzema nanodelcev. Vpliv serumskih proteinov in nastanka proteinskega plašča na površinah nanodelcev na njihov privzem v celice je podrobno preučeval Safi s sodelavci [148].

Pri večini aplikacij magnetnih nanodelcev v biomedicini želimo, da nanodelci prepoznajo ciljne oziroma tarčne celice in se vanje hitro privzamejo. Pri nanodelcih f-PND in f-NND sem pokazal, da se pozitivno nabiti nanodelci intenzivno privzamejo v oba tipa celic, medtem ko je obseg privzema negativno nabitih nanodelcev bistveno manjši. Tako pripravljene nanodelci f-PND so lahko uporabni za učinkovito dostavljanje različnih molekul oziroma bioloških makromolekul neselektivno v celice *in vitro*, medtem ko niso sposobni prepoznavanja specifičnih celic in selektivnega privzema v izbran tip celic. S primerno vezavo afinitetnih ligandov na površine nanodelcev lahko zagotovimo, da nanodelci prepoznajo svojo tarčo v kompleksnih bioloških sistemih. Pri tem je pomembno, da imajo ciljne celice močno povečano število tarč (receptorjev) v primerjavi z ne ciljanimi celicami. Afinitetni ligandi so lahko majhne organske molekule

(folna kislina) ali biološke makromolekule kot so aptameri in beljakovine. Vezavo bioloških makromolekul na površine nanodelcev imenujemo biokonjugacija. Majhne organske molekule imajo navadno manjšo sposobnost prepoznavanja tarče v primerjavi z velikimi biološkimi makromolekulami, kot so monoklonska protitelesa (~ 150 kDa) [40, 55, 63]. Problem pri vezavi protiteles na površine nanodelcev so zelo omejeni pogoji, pri katerih izvajamo reakcijo vezave občutljivih protiteles, da le-ti ohranijo aktivno konformacijo. Poleg problemov pri sami vezavi je problematična lahko tudi velikost protitelesa, saj so po velikosti primerljivi superparamagnetnim nanodelcem. Dober kompromis med velikostjo molekule in sposobnostjo prepoznavanja specifičnih celic predstavlja relativno majhen protein epidermalni rastni dejavnik EGF (~ 6 kDa). Gre za protein, ki ima izoelektrično točko pri vrednosti pH 4,6 in je pri višjih vrednostih pH negativno nabit [135].

V svojem doktorskem delu sem raziskoval vpliv različnih tipov interakcij oziroma vezi med fluorescentnimi nanodelci in afinitetnim ligandom EGF na njihovo učinkovitost prepoznavanja celic A431. Celice A431 imajo močno povečano število receptorjev za EGF na zunanjih celičnih membranah v primerjavi s celicami HeLa, ki sem jih uporabljal za primerjavo obsega privzema biokonjugatov. Raziskoval sem 5 različnih tipov interakcij med nanodelci in afinitetnim ligandom EGF.

Pri 1. in 5. tipu biokonjugacij sem uporabil nanodelce f-NND, medtem ko sem pri ostalih treh tipih biokonjugacij uporabil nanodelce f-PND. Pri prvem tipu sem kovalentno vezal EGF na površine nanodelcev s pomočjo kemije EDC. Pri 2. in 3. tipu biokonjugacije sem uporabil povezovalni molekuli (angl. homocrosslinker), ki preko kovalentnih vezi povezujejo primarne amino skupine na površinah nanodelcev f-PND. Pri 4. in 5. tipu biokonjugacij sem raziskoval vpliv elektrostatske interakcije med EGF in fluorescentnimi nanodelci s pozitivnim (4. tip) in negativnim (5. tip) nabojem. Pri biokonjugatih tipa 2 in 3 se je pojavila močna aglomeracija. Vzrok zanjo sta najverjetneje povezovalni molekuli BS3 in BS(PEG)5. Povezovalni molekuli imata na obeh koncih reaktivni sukcinimidni skupini, ki s prostimi primarnimi amino skupinami zlahka tvorita amidne vezi. Željeno je, da povezovalna molekula z enim delom reagira s površinsko amino skupino na nanodelcu in z drugim delom tvori amidno vez z amino skupino EGF. V literaturi je opisano [143], da lahko velik prebitok povezovalnih molekul v suspenziji nanodelcev favorizira vezavo povezovalnih molekul na površine nanodelcev le preko ene amidne vezi, kjer ostane druga reaktivna sukcinimidna skupina intaktna in na voljo za vezavo z amino skupino afinitetnega liganda. Rezultati meritev DLS obeh tipov biokonjugatov so pokazali intenzivno aglomeriran produkt, kar nakazuje na to, da se s prebitkom povezovalnih molekul ni mogoče izogniti aglomeraciji, ki je posledica medsebojnega povezovanja nanodelcev s povezovalnimi molekulami. Biokonjugate tipa 2 in 3 sem zaradi aglomeracije izločil iz nadaljnjih raziskav. S testom vezave sekundarnih protiteles sem pri tipu 1 in 4 potrdil prisotnost optimalno vezanega EGF na površinah nanodelcev. Sekundarna protitelesa, ki so bila označena z AlexaFluor555, specifično prepoznajo le optimalno vezan EGF na površinah nanodelcev. Pri biokonjugatu tipa 5 na podlagi analize vezave sekundarnih protiteles ni bilo zaznati vezanega EGF. Sklepal sem, da je prišlo do elektrostatskega odboja med negativno nabitim proteinom EGF in negativno nabito površino nanodelcev f-NND. Z analizo obsega privzema biokonjugatov v EGFR pozitivne celice A431 in EGFR negativne celice HeLa sem pokazal specifičnost ciljanja celic A431. Rezultati so pokazali relativno dobro prepoznavanje in privzem biokonjugatov tipa 1 v celice A431.

6 Zaključki

V okviru doktorskega dela sem se ukvarjal predvsem s funkcionalizacijo in (bio)konjugacijo magnetnih nanodelcev. Magnetne nanodelce sem sintetiziral s soobarjanjem iz vodnih raztopin ionov $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. V naslednjem koraku sem pripravil stabilno koloidno suspenzijo magnetnih nanodelcev, kjer sem na površine nanodelcev adsorbiral citronsko kislino. Stabilno koloidno suspenzijo sem uporabil za nadaljno sintezo različno debelih prevlek silike na površine nanodelcev. Na nanodelce, prevlečene s tanko prevleko silike, sem vezal različne amino silane, ki na površine nanodelcev uvedejo za (bio)konjugacijo zanimive amino skupine. Na površinske amino skupine sem nadalje vezal molekule fluoresceina in s tem zagotovil zmožnost spremljanja nanodelcev z optičnimi metodami. Sinteza nanodelcev z vezanimi različnimi tipi molekul na njihovih površinah (večnamenski nanodelci) zahteva dobro poznavanje površin nanodelcev. Za pripravo večnamenskih nanodelcev je potrebno na površinah nanodelcev zagotoviti različne funkcionalne skupine. S tem namenom sem razvil postopek, ki omogoča pripravo funkcionaliziranih nanodelcev z amino in karboksi skupinami na površinah nanodelcev. Postopek omogoča zvezno spreminjanje razmerja med površinskimi amino in karboksi skupinami. Tako funkcionalizirane nanodelce sem uporabil pri nadaljnjih raziskavah privzema nanodelcev v celice in pri pripravi biokonjugatov. Za pripravo slednjih sem na površine fluorescentnih nanodelcev vezal makromolekule epidermalnega rastnega dejavnika (EGF), pri čemer sem raziskoval pet različnih tipov interakcij med nanodelci in makromolekulami EGF. V sklepnem delu sem s pripravljenimi biokonjugati preučeval učinkovitost prepoznavanja tarčnih celic A431, ki imajo močno izražene receptorje za EGF na svojih površinah. V nadaljevanju podrobneje razložim zaključke posameznih raziskovalnih problemov.

Pripravil sem stabilno koloidno suspenzijo nanodelcev z adsorbirano citronsko kislino na površini nanodelcev. Pri tem je bila največja dosežena koncentracija stabilne koloidne suspenzije nanodelcev okoli 2 ut. %. Če sem takšno koloidno suspenzijo nanodelcev spral z acetonom, sem lahko pripravil precej bolj koncentrirano koloidno stabilno vodno suspenzijo nanodelcev, z vsebnostjo nanodelcev do 15 ut. %. S spiranjem z acetonom sem odstranil nevezano citronsko kislino in s tem zmanjšal ionsko jakost suspenzije. Manjša ionska jakost se je izkazala kot potreben pogoj za pripravo debelejših prevlek silike na površinah nanodelcev.

Pri pripravi tankih enakomernih prevlek silike (debeline do 2 nm) na površinah nanodelcev sem preučeval vpliv dodatka baze, koncentracije tetraetoksi silana (TEOS-a) v etanolu, koncentracije suspenzije nanodelcev in tipa katalizatorja na kakovost tankih prevlek silike. Ugotovil sem, da je najprimernejši izbor parametrov za pripravo enakomernih prevlek silike na površinah nanodelcev suspenzija z 0,5 ut. % nanodelcev, koncentracija raztopine TEOS/EtOH 10 ut. %, vrednost pH 12 in uporaba katalizatorja KOH. Pri tem izboru parametrov sem za pripravo željene debeline prevleke silike spreminjal le količino TEOS-a tako, da je količina TEOS-a pripadala nominalni vrednosti debeline prevleke.

Nanodelce, prevlečene s tanko prevleko silike, sem nadalje funkcionaliziral z uporabo štirih različnih amino silanov. Pri tem sem ugotovil, da ima število alkoksi skupin na molekuli silana ključno vlogo pri vezavi molekul silana na površine nanodelcev v enosloju. Pri treh amino silanih, ki so imeli tri alkoksi skupine, se je tekom reakcije vezave silanov na površine nanodelcev pojavila aglomeracija. To vodi v nastanek neželenih produktov, ki niso uporabni za biomedicinske namene. Pri amino silanu 3-(2-aminoetilamino)propilmetildimetoksi silan (APMS) se aglomeracija tekom funkcionalizacije ni pojavila. Molekula silana APMS ima le dve alkoksi skupini, ki onemogočata oziroma močno zmanjšata verjetnost tvorbe homogenih skupkov (nanodelcev silike) v suspenziji tekom funkcionalizacije. To je najverjetnejša razlika v reakciji vezave med izbranimi amino silani, ki v primeru APMS vodi v nastanek kontroliranih produktov. S konduktometričnimi titracijami sem določil, da lahko vežemo do 2,3 molekule APMS na 1 nm² površine nanodelcev.

Na terminalne amino skupine funkcionaliziranih nanodelcev sem vezal molekule fluoresceina. S konduktometričnimi titracijami sem določil, da so molekule fluoresceina zasedle do 6 % površinskih amino skupin. S fluorescenčno spektroskopijo sem pokazal, da je intenziteta fluorescence v arbitrarnih enotah za nekaj 100–krat večja pri suspenziji nanodelcev z vezanim fluoresceinom v primerjavi z intenziteto suspenzije nanodelcev brez vezanega fluoresceina. Takšna razlika v intenzitetah je bila primerna za spremljanje nanodelcev z optičnimi metodami.

Priprava večnamenskih nanodelcev, kjer so na površinah nanodelcev vezane različne molekule v željenih razmerjih, zahteva dobro poznavanje površin nanodelcev kot tudi sposobnost spreminjanja razmerja med različnimi površinskimi funkcionalnimi skupinami. V ta namen sem razvil postopek, ki omogoča zvezno spreminjanje razmerja med površinskimi amino in karboksi skupinami. Na amino funkcionalizirane (fluorescentne) nanodelce sem vezal molekule sukcin anhidrida (SA), ki reagirajo z amino skupinami na površinah nanodelcev in tako uvedejo karboksilne skupine na površine nanodelcev. Pokazal sem, da je s konduktometričnimi titracijami mogoče spremljati razmerje med amino in karboksi skupinami na površinah nanodelcev.

Preučeval sem vpliv razlik v površinskem naboju (zeta potencialu) nanodelcev na njihov privzem v različne celične linije. Pri tem sem raziskoval amino (f-PND) in karboksi (f-NND) funkcionalizirane fluorescentne nanodelce, ki se med seboj razlikujejo po vrednosti zeta potencialov. Ugotovil sem, da se pozitivno nabiti nanodelci f-PND privzamejo v celice v precej večjem obsegu, kot negativno nabiti nanodelci f-NND. Z izsledki analize TEM smo ugotovili, da se nanodelci f-PND najverjetneje privzamejo s fagocitozo, medtem ko nanodelci f-NND z endocitozo v tekoči fazi. Z uporabo specifičnih fluorescentnih označevalcev lizosomov smo ugotovili, da se oba tipa nanodelcev po štirih urah inkubiranja nahajata v lizosomih.

V sklepnem delu sem pripravil biokonjugate, ki so namenjeni aktivnemu ciljanju tarčnih celic. Pri tem je bila izbrana makromolekula afinitetnega liganda EGF, ki izkazuje afiniteto do receptorja EGFR. Slednji je v večji meri izražen na površini celic A431 v primerjavi s kontrolnimi celicami HeLa. Pripravil sem pet različnih tipov vezi/interakcij med nanodelci in EGF. S testom vezave fluorescentno označenih sekundarnih protiteles smo ugotovili, da na nanodelce vezan EGF izkazuje ugodno konformacijo pri dveh tipih biokonjugatov. Priprava biokonjugata s kemijo EDC se je izkazala za najbolj specifično, saj so se ti biokonjugati v največjem obsegu privzeli v ciljane celice A431.

7 Zahvale

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Darku Makovcu in somentorju prof. dr. Janku Kosu za konstruktivno usmerjanje mojega dela tekom celotnega obdobja podiplomskega študija in za vso izkazano pomoč.

Zahvaljujem se Matiju Rojniku s Fakultete za farmacijo UL za pomoč pri izvedbi testiranj nanodelcev na celičnih kulturah in prof. dr. Roku Romihu z Instituta za biologijo celice Medicinske fakultete UL za pomoč pri vrednotenju privzema nanodelcev v celice s TEM. Zahvalil bi se tudi dr. Marku Jagodiču z Instituta za matematiko, fiziko in mehaniko Fakultete za fiziko UL za pomoč pri vrednotenju privzema nanodelcev v celice s SQUID in doc. dr. Alenki Mertelj z Odseka za kompleksne snovi IJS za pomoč pri vrednotenju nanodelcev z DLS.

Nenazadnje se zahvaljujem vsem sodelavcem Odseka za sintezo materialov, ki so mi kakorkoli pomagali tekom študija in dela, predvsem pa za prijetno delovno vzdušje.

Družini in puncu Martini Jordan se zahvaljujem za moralno podporo, vzpodbudo in pomoč v obdobju podiplomskega študija.

Zahvalil bi se tudi Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo Republike Slovenije za financiranje.

8 Literatura in viri

- [1] Cullity, B. D.; Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009).
- [2] Jiles, D. *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials* (Chapman & Hall, London, 1998).
- [3] Weiss, P. The hypothesis of the molecular field and the property of ferromagnetism. *Journal de physique et le radium* **6**, 661 (1907).
- [4] Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of applied physics* **36**, 167 (2003).
- [5] Smit, J.; Wijn, H. P. J. *Ferrites* (Philips' Technical Library, Eindhoven, 1959).
- [6] Huber, D. L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* **1**, 482 (2005).
- [7] Leslie-Pelecky, D. L.; Rieke, R. D. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of materials* **8**, 1770 (1996).
- [8] Jun, Y. -W.; Seo, J. -W.; Cheon, J. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. *Accounts of Chemical Research* **41**, 179 (2008).
- [9] Odenbach, S. *Magnetoviscous effects in ferrofluids* (Springer, Berlin, 2002).
- [10] Brown, W. F. Thermal fluctuations of a single-domain particle. *Journal of Applied Physics* **34**, 1319 (1963).
- [11] Sicaful, K. E.; Wills, J. M.; Grimes, N. W. Structure of Spinel. *Journal of American Ceramic Society* **82**, 3279 (1999).
- [12] Cornell, R. M.; Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2003).
- [13] Jiles, D. *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials* (Chapman & Hall, London, 1998).
- [14] Miszczyk, A.; Darowicki, K. Study of anticorrosion and microwave absorption properties of NiZn ferrite pigments. *Anti-Corrosion Methods and Materials* **58**, 13 (2011).
- [15] Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 273 (2004).
- [16] Farrell, D.; Majetich, S. A.; Wilcoxon, J. P. Preparation and characterization of monodisperse Fe nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **107**, 11022 (2003).
- [17] Jana, N. R.; Chen, Y.; Peng, X. Size- and shape-controlled magnetic (Cr, Mn, Fe, Co, Ni) oxide nanocrystal via a simple and general approach. *Chemistry of Materials* **16**, 3931 (2004).
- [18] Li, Z.; Chen, H.; Bao, H.; Gao, M. One-pot reaction to synthesize water-soluble magnetite nanocrystals. *Chemistry of Materials* **16**, 1391 (2004).

- [19] Li, Y.; Afzaal, M.; O'Brien, P. The synthesis of amine-capped magnetic (Fe, Mn, Co, Ni) oxide nanocrystal and their surface modification for aqueous dispersibility. *Journal of Materials Chemistry* **16**, 2175 (2006).
- [20] Hyeon, T.; Lee, S. S.; Park, J.; Chung, Y.; Na, H. B. Synthesis of highly crystalline and monodispersed maghemite nanocrystallites without a size selection process. *Journal of American Chemical Society* **124**, 12798 (2001).
- [21] Bee, A.; Massart, R.; Neveu, S. Synthesis of very fine maghemite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **149**, 6 (1995).
- [22] Lee, J.; Isobe, T.; Senna, M. Preparation of ultrafine Fe₃O₄ particles by precipitation in the presence of PVA at high pH. *Journal of Colloid and Interface Science* **177**, 490 (1996).
- [23] Ishikawa, T.; Takeda, T.; Kandori, K. Effects of amines on the formation of β-ferric oxide hydroxide. *Journal of Materials Science* **27**, 4531 (1992).
- [24] Paul, B. K.; Moulik, S. P. Uses and applications of microemulsions. *Current Science* **80**, 990 (2001).
- [25] Jolivet, J.-P. *Metal Oxide Chemistry and Synthesis: From Solution to Solid State* (John Wiley & Sons, Chichester, 1994).
- [26] Deng, H.; Li, X.; Peng, Q.; Wang, X.; Chen, J.; Li, Y. Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microsphere. *Angewandte Chemie* **117**, 2842 (2005).
- [27] Wang, X.; Zhuang, J.; Peng, Q.; Li, Y. A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature* **437**, 121 (2005).
- [28] Lu, A. -H.; Salabas, E. L.; Schuth, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 1222 (2007).
- [29] Hiemenz, P. C.; Rajagopalan, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry* (Taylor & Francis Group, Boca Raton, 1997).
- [30] Shaw, D. J. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry* (Butterworth-Heinemann, Oxford, 1992).
- [31] Myers, D. *Surfaces, Interfaces, and Colloids* (Wiley-VCH, New York, 1991).
- [32] Derjaguin, B. V.; Landau, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim URSS* **14**, 633 (1941).
- [33] Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. T. G. *Theory of Stability of Lyophobic Colloids* (Elsevier, Amsterdam, 1948).
- [34] Parsegian, V. A.; Weiss, G. H. Spectroscopic parameters for computation of van der Waals forces. *Journal of Colloid and Interface Science* **81**, 285 (1981).
- [35] Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surfaces forces: With applications to colloidal and biological systems* (Academic Press Inc., London, 1985).
- [36] van de Ven, T. G. M. *Colloidal Hydrodynamics* (Academic Press Inc., London, 1989).
- [37] Adamson, A. W.; Gast, A. P. *Physical chemistry of surfaces* (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997).
- [38] Nalwa, H. S. *Handbook of Surface and Interface of Materials* (Stanford Scientific Corp., Los Angeles, 2001).
- [39] Klabunde, K. J. *Nanoscale Materials in Chemistry* (John Wiley & Sons, Inc.,

- Hoboken, 2001).
- [40] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques* (Elsevier, Amsterdam, 2008).
- [41] Tadros, T. F. *Solid/Liquid Dispersions* (Academic Press Inc., London, 1987).
- [42] Daoud, M.; Williams, C. E. *Soft Matter Physics* (Springer Verlag, Berlin, 1999).
- [43] Charles, S. W. *Ferrofluids – Magnetically controllable fluids and their applications* (Springer, Heidelberg, 2002).
- [44] Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics* **17**, 1247 (1981).
- [45] Lee, J.; Isobe, T.; Senna, M. Preparation of ultrafine Fe₃O₄ particles by precipitation in the presence of PVA at high pH. *Journal of Colloid and Interface Science* **177**, 490 (1996).
- [46] Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995 (2005).
- [47] Lee, S.-J.; Jeong, J.-R.; Shin, S.-C.; Kim, J.-C.; Chang, Y.-H.; Lee, K.-H.; Kim, J.-D. Magnetic enhancement of iron oxide nanoparticles encapsulated with poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **255**, 19 (2005).
- [49] Chen, G.; Hoffman, A. S. Preparation and properties of thermoreversible, phase-separating enzyme-oligo (N-isopropylacrylamide) conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **4**, 509 (1993).
- [50] Ren, J.; Hong, H.-Y.; Ren, T.-B.; Teng, X.-R. Preparation and characterization of magnetic PLA-PEG composite particles. *Materials Letters* **59**, 2655 (2005).
- [51] Kocbek, P.; Obermajer, N.; Cegnar, M.; Kos, J.; Kristl, J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *Journal of Controlled Release* **120**, 18 (2007).
- [52] Fuentes, M.; Mateo, C.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. Preparation of inert nano-particles for the direct immobilization of antibodies. *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 1380 (2005).
- [53] Goetze, T.; Gansau, C.; Buske, N.; Roeder, M.; Görnert, P.; Bahr, M. Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **252**, 399 (2002).
- [54] Chen, L. X.; Liu, T.; Thurnauer, C.; Csencsits, R.; Rajh, T. Fe₂O₃ nanoparticle structures investigated by X-ray absorption near-edge structure, surface modifications, and model calculations. *The Journal of Physical Chemistry B* **106**, 8539 (2002).
- [55] Chen, X. *Nanoplatfrom-Based Molecular Imaging* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2011).
- [56] Maurice, V.; Georgelin, T.; Siague, J.-M.; Cabuil, V. Synthesis and characterization of functionalized core-shell gamma-Fe₂O₃-SiO₂ nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **321**, 1408 (2009).
- [57] Pope, E. J. A.; Mackenzie, J. D. Sol-gel processing of silica. *Journal of Non-Crystalline Solids* **87**, 185 (1986).
- [58] Majetich, S. A.; Artman, J. O.; McHenry, M. E.; Nuhfer, N. T.; Staley, S. W. Preparation and properties of carbon-coated magnetic nanocrystallites. *Physical Review B* **48**, 16845 (1993).
- [59] Jiao, J.; Seraphin, S.; Wang, X.; Withers, J. –C. Preparation and properties of ferromagnetic carbon-coated Fe, Co, and Ni nanoparticles. *Journal of Applied Physics*

- 80**, 103 (1996).
- [60] Kouassi, G.-K.; Irudayaraj, J. Magnetic and gold-coated magnetic nanoparticles as a DNA sensor. *Analytical Chemistry* **78**, 3234 (2006).
- [61] Wang, L.; Park, H.-Y.; Lim, S.-I.-I.; Schadt, M.-J.; Mott, D.; Luo, J.; Wang, X.; Zhong, C.-J. Core@shell nanomaterials: gold-coated magnetic oxide nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **18**, 2629 (2008).
- [62] Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* **103**, 317 (2011).
- [63] Veiseh, O.; Gunn, J.-W.; Zhang, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 284 (2010).
- [64] Zhang, M.; Cushing, B. L.; O'Connor, C. J. Synthesis and characterization of monodisperse ultra-thin silica-coated magnetic nanoparticles. *Nanotechnology* **19**, 085601 (2008).
- [65] Lu, Y.; Yin, Y.; Mayers, B.-T.; Xia, Y. Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach. *Nano Letters* **2**, 183 (2002).
- [66] Bruce, I. J.; Sen, T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparation. *Langmuir* **21**, 1029 (2005).
- [67] Maurice, V.; Georgelin, T.; Siague, J.-M.; Cabuil, V. Synthesis and characterization of functionalized core-shell $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **321**, 1408 (2009).
- [68] Liu, Q.; Xu, Z.; Finch, J. A.; Egerton, R. A novel two-step silica-coating process for engineering magnetic nanocomposites. *Chemistry of Materials* **10**, 3936 (1998).
- [69] Sun, Y.; Duan, L.; Guo, Z.; DuanMu, Y.; Ma, M.; Xu, L.; Zhang, Y.; Gu, N. An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **285**, 65 (2005).
- [70] Philipse, A. P.; van Bruggen, M. P. B.; Pathmamanoharan, C. Magnetic silica dispersions: Preparation of surface-modified silica particles with a magnetic core. *Langmuir* **10**, 92 (1994).
- [71] Deng, Y.-H.; Wang, C.-C.; Hu, J.-H.; Yang, W.-L.; Fu, S.-K. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol-gel approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **262**, 87 (2005).
- [72] Liu, X.; Xing, J.; Guan, Y.; Shan, G.; Liu, H. Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic silica supports and their use for protein immobilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **238**, 127 (2004).
- [73] Tartaj, P.; del Puerto Morales, M.; Veintemillas-Verdaguer, S.; González-Carreno, T.; Serna, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* **36**, 182 (2003).
- [74] Caruso, F. Nanoengineering of particles surfaces. *Advanced Materials* **13**, 11 (2001).
- [75] Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* **26**, 62 (1968).

- [76] Iler, R. K. *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry* (John Wiley & Sons, New York, 1979).
- [77] Brook, M. A. *Silicon in Organic, Organometallic, and Polymer Chemistry* (John Wiley & Sons, New York, 2000).
- [78] Kralj, S.; Makovec, D.; Čampelj, S.; Drifenik, M. Producing ultra-thin silica coatings on iron-oxide nanoparticles to improve their surface reactivity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **322**, 1847 (2010).
- [79] Yamaura, M.; Camilo, R. L.; Sampaio, L. C.; Macedo, M. A.; Nakamura, M.; Toma, H. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **279**, 210 (2004).
- [80] Bruce, I. J.; Sen, T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations. *Langmuir* **21**, 7029 (2005).
- [81] Moon, J. H.; Shin, J. W.; Kim, S. Y.; Park, J. W. Formation of uniform aminosilane thin layers: An imine formation to measure relative surface density of the amine group. *Langmuir* **12**, 4621 (1996).
- [82] Čampelj, S.; Makovec, D.; Drofenik, M. Functionalization of magnetic nanoparticles with 3-aminopropyl silane. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **321**, 1346 (2009).
- [83] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharples, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective »Ligation« of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie* **114**, 2708 (2002).
- [84] Lewin, M.; Carlesso, N.; Tung, C. -H.; Tang, X. -W.; Cory, D.; Scadden, D. T.; Weissleder, R. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nature Biotechnology* **18**, 410 (2000).
- [85] Reiss, G.; Hutten, A. Magnetic nanoparticles: applications beyond data storage. *Nature Materials* **4**, 725 (2005).
- [86] Sun, C.; Lee, J. S. H.; Zhang, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1252 (2008).
- [87] Weissleder, R.; Kelly, K.; Sun, E. Y.; Shtatland, T.; Josephson, L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature Biotechnology* **23**, 1418 (2005).
- [88] Lee, J. -H.; Huh, Y. -M.; Jun, Y. W.; Seo, J. W.; Jang, J. T.; Song, H. T.; Kim, S.; Cho, E. J.; Yoon, H. G.; Suh, J. S.; Cheon, J. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nature Medicine* **13**, 95 (2006).
- [89] Hao, R.; Xing, R.; Xu, Z.; Hou, Y.; Gao, S.; Sun, S. Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. *Advanced Materials* **22**, 2729 (2010).
- [90] Yallapu, M. M.; Othman, S. F.; Curtis, E. T.; Gupta, B. K.; Jaggi, M.; Chauhan, S. C. Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Biomaterials* **32**, 1890 (2011).
- [91] Shubayev, V. I.; Pisanic, T. R.; Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 467 (2009).
- [92] Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622 (2006).

- [93] Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* **4**, 26 (2008).
- [94] Gao, L.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T.; Feng, J.; Yang, D.; Perrett, S.; Yan, X. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology* **2**, 577 (2007).
- [95] Belting, M.; Sandgren, S.; Wittrup, A. Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 505 (2005).
- [96] Longmire, M.; Choyke, P. I.; Kobayashi, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: consideration and caveats. *Nanomedicine* **3**, 703 (2008).
- [97] Arruebo, M.; Fernandez-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaria, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* **2**, 22 (2007).
- [98] Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37 (2003).
- [99] Wong, W. S.; Tsukada, J. S.; Kortman, K. E.; Bradley, W. G. *Practical Magnetic Resonance Imaging: A Case Study Approach* (Aspen Publishers, Inc.; New York, 1987).
- [100] Wehril, F. W.; McFall, J.; Newton, T. H.; Potts, D. G. *Advanced Imaging Techniques* (Clavadel Press, San Francisco, 1983).
- [101] Bulte, J. W. M.; de Cuyper, M.; Despres, D.; Frank, J. A. Short- vs. Long-circulating magnetoliposomes as bone marrow-seeking MR contrast agents. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **9**, 329 (1999).
- [102] Runge, V. M.; Clanton, J. A.; Lukehart, C. M.; Partain, C. L.; James, A. E. Paramagnetic agents for contrast-enhanced NMR imaging: a review. *American Journal of Roentgenology* **141**, 1209 (1983).
- [103] Krasnow, N. Effects of lanthanum and gadolinium ions on cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **282**, 187 (1972).
- [104] Bulte, J. W. M.; Douglas, T.; Witwer, B.; Zhang, S. C.; Strable, E.; Lewis, B. K.; Zywicke, H.; Miller, B.; van Gelderen, P.; Moskowitz, B. M.; Duncan, I. D.; Frank, J. A. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nature Biotechnology* **19**, 1141 (2001).
- [105] Harisinghani, M. G.; Barentsz, J.; Hahn, P. F.; Deserno, W. M.; Tabatabaei, S.; van de Kaa, C. H.; de la Rosette, J.; Weissleder, R. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* **348**, 2491 (2003).
- [106] Zhao, M.; Beauregard, D. A.; Loizou, L.; Davletov, B.; Brindle, K. M. Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. *Nature Medicine* **7**, 1241 (2001).
- [107] Arbab, A. S.; Yocum, G. T.; Kalish, H.; Jordan, E. K.; Anderson, S. A.; Khakoo, A. Y.; Read, E. J.; Frank, J. A. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* **104**, 1217 (2004).
- [108] Jordan, A.; Wust, P.; Scholz, R.; Tesche, B.; Fahling, H.; Mitrovics, T.; Vogl, T.; Cervos-Navarro, J.; Felix, R. Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. *International Journal of Hyperthermia* **12**, 705 (1996).
- [109] Gilchrist, R. K.; Medal, R.; Shorey, W. D.; Hanselman, R. C.; Parrot, J. C.; Taylor, C. B. Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of Surgery* **146**, 596 (1957).

- [110] Sonvico, F.; Mornet, S.; Vasseur, S.; Dubernet, C.; Jaillard, D.; Degrouard, J.; Hoebeke, J.; Duguët, E.; Colombo, P.; Couvreur, P. Polate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjugate Chemistry* **16**, 1181 (2005).
- [111] Kawashita, M.; Tanaka, M.; Kokubo, T.; Inoue, Y.; Yao, T.; Hamada, S.; Shinjo, T. Preparation of ferrimagnetic magnetite microspheres for in situ hyperthermic treatment of cancer. *Biomaterials* **26**, 2231 (2005).
- [112] Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fahling, H.; Felix, R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **201**, 413 (1999).
- [113] Rosensweig, R. E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **252**, 370 (2002).
- [114] Park, J. H.; Saravanakumar, G.; Kim, K.; Kwon, I. C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 28 (2010).
- [115] Lubbe, A. S.; Bergemann, C.; Brock, J.; McClure, D. Physiological aspects in magnetic drug-targeting. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **194**, 149 (1999).
- [116] Lubbe, A. S.; Alexiou, C.; Bergemann, C. Clinical applications of magnetic drug targeting. *Journal of Surgical Research* **95**, 200 (2001).
- [117] Neuberger, T.; Schopf, B.; Hofmann, H.; Hofmann, M.; von Rechenberg, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **293**, 483 (2005).
- [118] Chertok, B.; Moffat, B. A.; David, A. E.; Yu, F.; Bergemann, C.; Ross, B. D.; Yang, V. C. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* **29**, 487 (2008).
- [119] Alexiou, C.; Arnold, W.; Klein, R. J.; Parak, F. G.; Hulin, P.; Erhardt, W.; Wagenpfeil, S.; Lubbe, A. S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Research* **60**, 6641 (2000).
- [120] Nishikawa, M.; Takakura, Y.; Hashida, M. Theoretical considerations involving the pharmacokinetics of plasmid DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 675 (2005).
- [121] Greish, K.; Fang, J.; Inutsuka, T.; Nagamitsu, A.; Maeda, H. Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumor targeting. *Clinical Pharmacokinetics* **42**, 1089 (2003).
- [122] Barratt, G.; Courraze, G.; Couvreur, P. *Polymeric Biomaterials* (Marcel Dekker, Inc., New York, 2002)
- [123] Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological Reviews* **53**, 283 (2001).
- [124] Hobbs, S. K.; Monsky, W. L.; Yuan, F.; Roberts, W. G.; Griffith, L.; Torchilin, V.; Jain, R. K. Regulation of transport pathways on tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4607 (1998).
- [125] Torchilin, V. P. Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **11**, 81 (2000).

- [126] Zou, S. M.; Erbacher, P.; Remy, J. S.; Behr, J. P. Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *The Journal of Gene Medicine* **2**, 128 (2000).
- [127] Takakura, Y.; Nishikawa, M.; Yamashita, F.; Hashida, M. Influence of physicochemical properties on pharmacokinetics of non-viral vectors for gene delivery. *Journal of drug Targeting* **10**, 99 (2002).
- [128] Kawabata, K.; takakura, Y.; Hashida, M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharmaceutical Research* **12**, 825 (1995).
- [129] Xie, J.; Xu, C.; Kohler, N.; Hou, Y.; Sun, S. Controlled PEGylation of monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells. *Advanced Materials* **19**, 3163 (2007).
- [130] Barron, L. G.; Gagne, L.; Szoka, F. C. Lipoplex-mediated gene delivery to the lung occurs within 60 minutes of intravenous administration. *Human Gene Therapy* **10**, 1683 (1999).
- [131] Verma, A.; Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* **6**, 12 (2010).
- [132] 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* **63**, 24 (2011).
- [133] Bacri, J. C.; da Silva, R.; Perzynski, J. N.; Pons, A. A.; Rogers, D.; Sabolovi, D.; Halbreich, A. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: An Overview* (Plenum Publishing Corp., New York, 1997).
- [134] Sabolovic, D.; Roudier, M.; Boynard, M.; Pautou, C.; Sestier, C.; Fertil, B.; Geldwerth, D.; Roger, J.; Pons, J. N.; Amri, A.; Halbreich, A. Membrane modifications of red blood cells in Alzheimer's disease. *The Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **52**, 217 (1997).
- [135] Taylor, J. M.; Mitchell, W. M.; Cohen, S. Epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* **247**, 5928 (1972).
- [136] Cullity, B. D. *Elements of X-ray Diffraction* (Addison-Wesley, Reading, 1987).
- [137] Drofenik, M.; Žnidaršič, A.; Makovec, D. Influence of the addition of Bi₂O₃ on the grain growth and magnetic permeability of MnZn ferrites. *Journal of Ceramic Society* **81**, 2841 (1998).
- [138] Hunter, R. J. *Zeta potential in colloid science: Principles and applications* (Academic Press, London, 1981).
- [139] Sahoo, Y.; Goodarzi, A.; Swihart, M. T.; Ohulchanskyy, T. Y.; Kaur, N.; Furlani, E. P.; Prasad, P. N. Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: fluorescence labeling and magnetophoretic control. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 3879 (2005).
- [140] Čampelj, S.; Makovec, D.; Drofenik, M. Preparation and properties of water-based magnetic fluids. *Journal of Physics: Condensed Matter* **20**, 204101 (2008).
- [141] Osaka, T.; Nakanishi, T.; Shanmugam, S.; Takahama, S.; Zhang, H. Effect of surface charge of magnetite nanoparticles on their internalization into breast cancer and umbilical vein endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **71**, 325 (2009).
- [142] Jo, J. -I.; Aoki, I.; Tabata, Y. Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells.

- Journal of Controlled Release* **142**, 465 (2010).
- [143] Skaat, H.; Shafir, G.; Margel, S. Acceleration and inhibition of amyloid- β fibril formation by peptide-conjugated fluorescent-maghemite nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* **13**, 3521 (2011).
- [144] Lu, H.; Yi, G.; Zhao, S.; Chen, D.; Guo, L. -H.; Cheng, J. Synthesis and characterization of multi-functional nanoparticles possessing magnetic, up-conversion fluorescence and bio-affinity properties. *Journal of Materials Chemistry* **14**, 1336 (2004).
- [145] Zhao, F.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Chang, X.; Chen, C.; Zhao, Y. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small* **7**, 1322 (2011).
- [146] Wilhelm, C.; Gazeau, F. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **29**, 3161 (2008).
- [147] Lee, P. -W.; Hsu, S. -W.; Wang, J. -J.; Tsai, J. -S.; Lin, K. -J.; Wey, S. -P.; Chen, F. -R.; Lai, C. -H.; Yen, T. -C.; Sung, H. -W. The characteristics, biodistribution, magnetic resonance imaging and biodegradability of superparamagnetic core-shell nanoparticles. *Biomaterials* **31**, 1316 (2010).
- [148] Safi, M.; Courtois, J.; Seigneuret, M.; Conjeaud, H.; Berret, J. -F. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 9353 (2011).

Kazalo slik

<i>Slika 1: Ilustrativen prikaz hipotetične situacije, kjer v krvno žilo injiciramo različne tipe magnetnih materialov, pri čemer velikosti feromagnetnih delcev variirajo med 1nm in vse do 1μm. Krivulje M–H so prikazane za diamagnetne (A) in paramagnetne (B) biomateriale, ki sestavljajo krvno plazmo. Pod točko (C) je prikazan odziv M–H feromagnetnih delcev, ki so bodisi večdomenski (večji krožec), bodisi enodomenski (manjši krožec). Točka (D) predstavlja odziv M-H superparamagnetnih delcev. Magnetni signal injiciranih delcev ne glede na njihovo velikost močno presega paramagnetni prispevek (hemoglobin, feritin, transferin, hemosiderin, citokromi) in diamagnetni prispevek (organske spojine) biomaterialov v krvni žili [4].</i>	3
<i>Slika 2: Koercitivnost v odvisnosti od velikosti delcev [6]. SPM pomeni superparamagnetizem.</i>	4
<i>Slika 3: Prikaz prehoda magnetnih delcev iz feromagnetizma v superparamagnetizem [8].</i>	5
<i>Slika 4: Struktura kubičnega ferita [14].</i>	7
<i>Slika 5: Koncentracija topnega prekursorja v odvisnosti od časa. Prerisano iz [25].</i>	9
<i>Slika 6: Shematski prikaz difuznega dvojnega sloja. Prirejeno iz [37].</i>	11
<i>Slika 7: Celokupna energija v odvisnosti od razdalje med delcema. Prerisano iz [35].</i>	12
<i>Slika 8: Stabilna koloidna suspenzija majhnih delcev (A) in prikaz aglomeriranih nanodelcev (B) [40].</i>	13
<i>Slika 9: Shematski prikaz delcev z adsorbiranimi polimeri. Prerisano iz [42].</i>	13
<i>Slika 10: Inverzna hitrost reakcije hidrolize TEOS-a in kondenzacije Si(OH)₄ v odvisnosti od vrednosti pH. Prerisano iz [57].</i>	16
<i>Slika 11: Splošna strukturna formula silana [40].</i>	17
<i>Slika 12: Shematski prikaz vezave silanov na površino anorganskih nanodelcev s površinskimi –OH skupinami. Prirejeno iz [40].</i>	18
<i>Slika 13: Primerjava velikosti med nanodelcem (10 nm) in človeškim albuminom (7 nm) [40].</i>	19
<i>Slika 14: Shematski prikaz biokonjugacij, ki temeljijo na fizikalnih interakcijah med nanodelcem in ligandom [63].</i>	20
<i>Slika 15: Shematski prikaz najuporabnejših funkcionalnih skupin na površinah nanodelcev, ki so ugodne pri konjugacijah [40].</i>	20
<i>Slika 16: Shematski prikaz reakcij neposredne konjugacije aktiviranih ligandov na funkcionalizirane nanodelce [63].</i>	21
<i>Slika 17: Shematski prikaz reakcije »click« [63].</i>	21
<i>Slika 18: Shematski prikaz reakcij posredne konjugacije ligandov na funkcionalizirane nanodelce [63].</i>	22
<i>Slika 19: Shematski prikaz posrednih reakcij med različnimi tipi distančnih povezovalnih molekul, ligandi in funkcionaliziranimi nanodelci.</i>	23

<i>Slika 20: Prikaz odvisnosti zadrževalnega časa delcev v krvi od njihove velikosti. Prerisano iz [97].....</i>	<i>25</i>
<i>Slika 21: Glavne endocitotske poti [98].....</i>	<i>25</i>
<i>Slika 22: Shematski prikaz ciljanega dostavljanja magnetih nanodelcev z zunanjim magnetom [114].....</i>	<i>27</i>
<i>Slika 23: Shematski prikaz učinka povečane permeabilnosti in kopičenja – EPR učinek [125].....</i>	<i>28</i>
<i>Slika 24: Shematski prikaz aktivnega in pasivnega ciljanja v tumorskem žilju [132].....</i>	<i>29</i>
<i>Slika 25: Shematski prikaz struktur amino silanov.....</i>	<i>35</i>
<i>Slika 26: Shematski prikaz vezave APS na nanodelce NP-Si.....</i>	<i>35</i>
<i>Slika 27: Shematski prikaz vezave AHMS na nanodelce NP-Si.....</i>	<i>35</i>
<i>Slika 28: Shematski prikaz vezave EPAS na nanodelce NP-Si.....</i>	<i>36</i>
<i>Slika 29: Shematski prikaz vezave APMS na nanodelce NP-Si.....</i>	<i>36</i>
<i>Slika 30: Shematski prikaz vezave NHS-Fluoresceina na nanodelce NP-Si-APMS.....</i>	<i>37</i>
<i>Slika 31: Shematski prikaz reakcije med sukcin anhidridom (SA) in ND-Si-APMS.....</i>	<i>37</i>
<i>Slika 32: Shematski prikaz reakcije med APMS in sukcin anhidridom (SA), kjer je množinsko razmerje SA/APMS enako 1 (A) ali 2 (B).....</i>	<i>38</i>
<i>Slika 33: Shematski prikaz reakcije med sintetiziranim silanom in ND-Si.....</i>	<i>38</i>
<i>Slika 34: Shematski prikaz reakcije med SA in f-ND-Si-APMS.....</i>	<i>39</i>
<i>Slika 35: Shematski prikaz aktivacije –COOH skupin z EDC in Sulfo-NHS.....</i>	<i>40</i>
<i>Slika 36: Shematski prikaz vezave EGF na aktivirane f-NND.....</i>	<i>40</i>
<i>Slika 37: Shematski prikaz reakcije aktivacije f-PND z BS3 (A) in vezava EGF na aktivirane f-PND (B).....</i>	<i>41</i>
<i>Slika 38: Shematski prikaz reakcije aktivacije f-PND z BS(PEG)5 (A) in vezava EGF na aktivirane f-PND (B).....</i>	<i>42</i>
<i>Slika 39: Shematski prikaz elektrostatske adsorpcije EGF na f-PND.....</i>	<i>42</i>
<i>Slika 40: Shematski prikaz elektrostatske interakcije med EGF in f-NND.....</i>	<i>43</i>
<i>Slika 41: Shematski prikaz meritve odvisnosti magnetnega momenta od magnetnega polja, na podlagi katerega sem določil nasičeno magnetizacijo nanodelcev. Modra krivulja predstavlja izmerjene vrednosti, rdeča premica ekstrapolacijo in zelena krivulja izračunan prispevek magnetizma superparamagnetnih nanodelcev.....</i>	<i>44</i>
<i>Slika 42: Določitev ekvivalentne točke s konduktometrično titracijo.....</i>	<i>47</i>
<i>Slika 43: Rentgenski difraktogram in TEM posnetek sintetiziranih nanodelcev ND.....</i>	<i>49</i>
<i>Slika 44: HREM posnetek sintetiziranih nanodelcev ND.....</i>	<i>50</i>
<i>Slika 45: Specifična magnetizacija sintetiziranih nanodelcev izmerjena z magnetometrom VSM.....</i>	<i>51</i>
<i>Slika 46: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH suspenzij osnovnih nanodelcev ND-CA in nanodelcev ND.....</i>	<i>52</i>
<i>Slika 47: HREM posnetek nanodelcev ND-CA.....</i>	<i>53</i>
<i>Slika 48: Številsko utežena porazdelitev hidrodinamskih velikosti nanodelcev ND-CA v vodni suspenziji pri vrednosti pH 10, izmerjena s pomočjo DLS. Krivulja predstavlja regresijo Gaussove porazdelitvene funkcije na empirično porazdelitev.....</i>	<i>54</i>

<i>Slika 49: HREM posnetka nanodelcev prevlečenih z 2 nm debelo prevleko SiO₂ z uporabo katalizatorja NH₄OH (vzorec ND-Si2-N12) (a) ali KOH (vzorec ND-Si2-K12_1) (b).</i>	56
<i>Slika 50: TEM posnetek prevlečenih nanodelcev ND-Si2-K12_3 sintetiziranih v suspenziji s povišano koncentracijo etanola (1 ut.% raztopina TEOS v EtOH).</i>	57
<i>Slika 51: HREM posnetka nanodelcev ND-Si0.5-K12 (a) in ND-Si0.25-K12 (b).</i>	59
<i>Slika 52: Meritve magnetizacije (M) v odvisnosti od magnetnega polja (H) za sintetizirane nanodelce ND in nanodelce prevlečene z različno debelimi prevlekami silike.</i>	60
<i>Slika 53: TEM posnetka nanodelcev prevlečenih z ~8 nm (a) in ~5 nm (b) debelo prevleko silike.</i>	61
<i>Slika 54: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH suspenzij nanodelcev ND-Si in serije suspenzij nanodelcev ND-Si-APMSx.</i>	63
<i>Slika 55: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti nanodelcev ND-Si-APMS v vodni suspenziji pri vrednosti pH 9 izmerjene s pomočjo DLS.</i>	64
<i>Slika 56: Shematski prikaz vezave NHS-Fluoresceina na nanodelce s površinskimi amini.</i>	64
<i>Slika 57: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH vodnih suspenzij nanodelcev ND-Si-APMS in nanodelcev f-ND-Si-APMS.</i>	65
<i>Slika 58: ATR-FTIR spekter silana APMS in dveh sintetiziranih reagentov (APMS-SA)1 in (APMS-SA)2.</i>	67
<i>Slika 59: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH suspenzij nanodelcev ND-Si-APMS-xSA, ND-Si-(APMS-SA)1 in ND-Si-(APMS-SA)2.</i>	68
<i>Slika 60: Odvisnost zeta potencialov od vrednosti pH suspenzij nanodelcev f-ND-Si-APMS-SA in f-ND-Si-APMS.</i>	69
<i>Slika 61: Preživetje celic MCF10A neoT (A) in PC-3 (B), ki so bile inkubirane pri različnih koncentracijah fluorescentnih nanodelcev v 24 urah. Meritev je bila izvedena na pretočnem citometru in je normalizirana na rast celic brez prisotnosti nanodelcev.</i>	70
<i>Slika 62: Obseg privzema nanodelcev v celice določen s pretočnim citometrom (intenziteta SSC). Spremembe v profilu intenzitete SSC po privzemu nanodelcev (debelejša krivulja)(A) in srednje vrednosti intenzitete SSC (B). Srednja vrednost ± SD, kjer je *P<0,05 in **P<0,001.</i>	71
<i>Slika 63: Obseg privzema nanodelcev v celice, določen na podlagi sprememb v intenziteti fluorescence celic (FL-1) s pretočnim citometrom.</i>	71
<i>Slika 64: Posnetki iz fluorescenčnega mikroskopa, kjer sem vzorce slikal pod enakimi pogoji. Posnetki so rezultat združevanja slik iz fluorescence in optične mikroskopije. Merilo predstavlja 20 μm.</i>	72
<i>Slika 65: Kolokalizacija nanodelcev f-PND in f-NND (zelena fluorescenca) s specifičnimi označevalci lizosomov (LAMP-1) in endosomov (EEA-1) v celicah MCF10A neoT. Povečava področij kolokalizacije nanodelcev z označevalcem LAMP-1 je v stolpcu 4 in pripada belem kvadratu v stolpcu 3. Merilo predstavlja 20 μm.</i>	73
<i>Slika 66: Ultrastrukturalna lokalizacija superparamagnetnih nanodelcev f-PND. Merilo znaša 500 nm.</i>	74
<i>Slika 67: Ultrastrukturalna lokalizacija superparamagnetnih nanodelcev f-NND. Merilo znaša 500 nm.</i>	75

<i>Slika 68: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov f-NND-B1 v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.</i>	<i>77</i>
<i>Slika 69: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov f-PND-B2 v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.</i>	<i>78</i>
<i>Slika 70: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov f-PND-B3 v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.</i>	<i>79</i>
<i>Slika 71: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov f-PND-B4 v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.</i>	<i>80</i>
<i>Slika 72: Številsko utežene porazdelitve hidrodinamskih velikosti biokonjugatov f-PND-B5 v suspenziji PBS (pH 7,4) izmerjene z DLS.</i>	<i>81</i>
<i>Slika 73: Določanje uspešnosti vezave EGF na površine nanodelcev na osnovi merjenja fluorescence.</i>	<i>82</i>
<i>Slika 74: Določanje privzema nanodelcev na osnovi merjenja fluorescence za tri raziskovane tipe biokonjugatov.</i>	<i>83</i>

Kazalo tabel

<i>Tabela 1: Hitrost posedanja in Brown-ovo gibanje nenabitih delcev z gostoto 2 g/cm³ različnih velikosti pri 20 °C [30].</i>	10
<i>Tabela 2: Specifične ionske prevodnosti ionov v vodi.</i>	46
<i>Tabela 3: Seznam sintetiziranih vzorcev, pri katerih sem spreminjal reakcijske pogoje. Podani so tudi rezultati meritev nasičene magnetizacije M_s, analize sestave nanodelcev EDXS in koncentracije ionov Fe v raztopini pri testu raztapljanja. (/) pomeni, da vzorec ni bil izmerjen.</i>	55
<i>Tabela 4: Seznam vzorcev vodnih suspenzij nanodelcev serije ND-Si-APMSx in njihove pripadajoče vrednosti izoelektričnih točk ter koncentracij amino skupin na 1 nm² površine.</i>	62
<i>Tabela 5: Seznam vzorcev suspenzij nanodelcev ND-Si-APMS-xSA, njihove pripadajoče izoelektrične točke in odstotek uvedenih karboksilnih skupin.</i>	66
<i>Tabela 6: Magnetni moment v nasičenju (p_s) masa nanodelcev (m) in odstotek (P) privzetih nanodelcev na podlagi meritev SQUID. (/) pomeni, da je vrednost pod mejo detekcije.</i>	76

Priloge

Seznam objav iz doktorske disertacije:

A. Izvirni znanstveni članki

- A1. Kralj, S.; Makovec, D.; Čampelj, S.; Drofenik, M. Producing ultra-thin silica coatings on iron-oxide nanoparticles to improve their surface reactivity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **322**, 1847 (2010).
- A2. Kralj, S.; Drofenik, M.; Makovec, D. Controlled surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles with terminal amino and carboxyl groups. *Journal of Nanoparticle Research* **13**, 2829 (2011).
- A3. Kralj, S.; Rojnik, M.; Romih, R.; Jagodič, M.; Kos, J.; Makovec, D. Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles. *Langmuir* (poslano) 2012.
- A4. Kralj, S.; Rojnik, M.; Kos, J.; Makovec, D. Bioconjugation-type dependent EGFR-targeting using fluorescent EGF-labelled magnetic nanoparticles. (v pripravi) 2012.

B. Objavljeni znanstveni prispevki na konferencah

- B1. Kralj, S.; Čampelj, S.; Makovec, D.; Drofenik, M. Priprava superparamagnetnih nanodelcev γ -Fe₂O₃ prevlečenih s tanko plastjo amorfne silicijevega oksida. Slovenski kemijski dnevi 2008, Maribor. V: [zbornik referatov] Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 9 str. (2008).

C. Objavljeni povzetki znanstvenih prispevkov na konferencah

- C1. Kralj, S.; Čampelj, S.; Obermajer, N.; Rojnik, M.; Kos, J.; Makovec, D. Silica-coated fluorescent magnetic nanoparticles marked with monoclonal antibodies for breast-cancer targeting. : MIHAILOVIĆ, Dragan (ur.), DOMINKO, Robert (ur.), VILFAN, Mojca (ur.). *Book of abstracts : SLONANO 2009, 19–21 October 2009, Ljubljana*. Ljubljana: National Institute of Chemistry, 2009, str. 92.
- C2. Kralj, S.; Čampelj, S.; Makovec, D.; Drofenik, M. Priprava superparamagnetnih nanodelcev $[\gamma\text{-Fe}(\text{spodaj})_2\text{O}(\text{spodaj})_3]$ prevlečenih s tanko plastjo amorfne silicijevega oksida. V: ISKRA, Jernej (ur.), MILOŠEV, Ingrid (ur.). *Dan mladih raziskovalcev 2009*. Ljubljana: Institut "Jožef Stefan", 2009, 1 str.
- C3. Kralj, S.; Čampelj, S.; Obermajer, N.; Rojnik, M.; Kos, J.; Makovec, D. Preparation of fluorescent, functionalized, silica-coated magnetic nanoparticles marked with monoclonal antibodies. V: *NANOSPAIN 2009 : Zaragoza, (Spain), March 9–12, 2009*. [S. l.: s. n.], 2009, str. 133.
- C4. Kralj, S.; Čampelj, S.; Rojnik, M.; Obermajer, N.; Kos, J.; Makovec, D. Priprava $[\gamma\text{-Fe}(\text{spodaj})_2\text{O}(\text{spodaj})_3]$ nanodelcev s kovalentno vezanimi monoklonskimi

- protitelesi ter prikaz ciljanega vstopa nanodelcev v tumorske celice raka dojke = Preparation of $[\gamma\text{-Fe[2O]}_3]$ nanoparticles with covalently attached monoclonal antibodies and their targeted internalization into breast tumour cells. V: GLAVIČ, Peter (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.). *Zbornik povzetkov referatov s posvetovanja*. Maribor: FKKT, 2009, str. 39.
- C5. Kralj, S.; Čampelj, S.; Obermajer, N.; Rojnik, M.; Kos, J.; Makovec, D. Binding of monoclonal antibodies onto silica-coated fluorescent magnetic nanoparticles. V: SERŠA, Gregor (ur.), KOS, Janko (ur.), LAH TURNŠEK, Tamara (ur.), KRANJC, Simona (ur.). 6th Conference on Experimental and Translational Oncology, Kranjska Gora, Slovenia, March, 24–28, 2010. *Book of abstracts*. Ljubljana: Association of Radiology and Oncology, 2010, str. 110-111.
- C6. Kralj, S.; Rojnik, M.; Obermajer, N.; Kos, J.; Makovec, D. Silica-coated fluorescent magnetic nanoparticles market with monoclonal antibodies for breast-cancer targeting. V: *8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers : conference program & abstract booklet, May 25–29, 2010, Rostock, Germany*. [S. l.: s. n., 2010], str. 122.
- C7. Makovec, D.; Selišnik, A.; Sajko, M.; Kralj, S.; Drofenik, M. Superparamagnetic cluster as carriers for an anatase photocatalyst. V: *8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers : conference program & abstract booklet, May 25–29, 2010, Rostock, Germany*. [S. l.: s. n., 2010], str. 132.
- C8. Kralj, S.; Čampelj, S.; Obermajer, N.; Rojnik, M.; Kos, J.; Makovec, D. Raziskave različnih tipov vezav monoklonskih protiteles na fluorescentne s SiO_2 prevlečene maghemitne nanodelce. V: KUŠČER, Danjela (ur.), PERC, Branka (ur.). 4. Dan Mladih Raziskovalcev KMBO, Ljubljana, Slovenija, 11. 2. 2010. [*Program in povzetki*]. Ljubljana: Institut "Jožef Stefan", 2010, str. 50.
- C9. Kralj, S.; Makovec, D.; Drofenik, M. Kontroliranje razmerja med terminalnimi amskimi in karboksilnimi skupinami na površini s SiO_2 prevlečenih magnetnih nanodelcev. V: GLAVIČ, Peter (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.). Slovenski kemijski dnevi 2010, Maribor, 23. in 24. september 2010. *Zbornik povzetkov referatov s posvetovanja*. Maribor: FKKT, 2010, str. 41.
- C10. Kralj, S.; Rojnik, M.; Kos, J.; Makovec, D. Bioconjugation-type dependent EGFR-targeting using fluorescent EGF-labelled magnetic nanoparticles. V: NanoBioTech, The 14th Annual European Conference on Micro and Nanoscale Technologies for the Life Sciences, November 14-16, Montreux, Switzerland. *Final program*. Montreux: Scitec, 2011.
- C11. Kocbek, P.; Plemenitaš, M.; Kralj, S.; Makovec, D.; Kristl, J. SPIONs-loaded PLGA nanoparticles: formulation, characterization and in vitro evaluation on Caco-2 and T47-D cells. V: 3rd PharmSciFair, June 13–17, 2011, Prague, Czech Republic. *Pharmaceutical sciences for the future of medicines : plenary sessions & 4 parallel programme days & young scientists meeting : final programme and abstract book*. [S. l.: s. n.], 2011, str. 88.
- C12. Kralj, S.; Rojnik, M.; Obermajer, N.; Kos, J.; Makovec, D. Fluorescentni magnetni nanodelci označeni z monoklonskimi protitelesi za ciljani privzem nanodelcev v tumorske celice raka dojke. V: PRIBOŠIČ, Irena (ur.), KRNEL, Kristoffer (ur.). 5. Dan Mladih Raziskovalcev, Ljubljana, Februar 2011. [*Program in povzetki*]. Ljubljana: Institut "Jožef Stefan", 2011, str. 65.
- C13. Kralj, S.; Rojnik, M.; Romih, R.; Jagodič, M.; Kos, J.; Makovec, D. Vpliv površinskega naboja fluorescentnih magnetnih nanodelcev na njihov privzem v različne rakaste celice = Structural properties of ultrafine barium-hexaferrite

nanoparticles. V: KRAVANJA, Zdravko (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.). Slovenski kemijski dnevi 2011, Portorož, 14.-16. september 2011. *Zbornik povzetkov referatov s posvetovanja*. Maribor: FKKT, 2011, str. 182.

D. Elaborat, predštudija, študija

- D1. Makovec, D.; Kralj, S.; Gyergyek, S.; Čampelj, S. *Vezava učinkovine celekoksib na površino magnetnih nanodelcev*, (IJS delovno poročilo, 10300, zaupno). 2009.
- D2. Kralj, S.; Makovec, D. *Študij vezave plazmidne DNA na superparamagnetne nanodelce maghemita*, (IJS delovno poročilo, 10528, zaupno). 2010.
- D3. Makovec, D.; Kralj, S.; Primc, D.; Anželak, B. *Analize suspenzij nanodelcev*, (IJS delovno poročilo, 10863). 2011.
- D4. Makovec, D.; Kralj, S.; Gyergyek, S. *Kontrolirana priprava aglomeratov superparamagnetnih nanodelcev*, (IJS delovno poročilo, 10674, zaupno). 2011.
- D5. Makovec, D.; Kralj, S.; Gyergyek, S. *Lastnosti suspenzije nanodelcev*, (IJS delovno poročilo, 10821). 2011.
- D6. Makovec, D.; Kralj, S.; Gyergyek, S. *Podrobna analiza suspenzij nanodelcev*, (IJS delovno poročilo, 10819). 2011.
- D7. Makovec, D.; Kralj, S.; Gyergyek, S. *Razlike v lastnostih med posameznimi šaržami suspenzije nanodelcev*, (IJS delovno poročilo, 10820). 2011.
- D8. Makovec, D.; Gyergyek, S.; Kralj, S.; Plantan, I.; Majcen, N.; Hočever, M. *Spremljanje nastanka nanodelcev med sintezo*, (IJS delovno poročilo, 10864). 2011.