



Srednja šola Slovenska Bistrica

**Raziskovalna naloga**

# **NANOMEDICINA: DOSTAVNI SISTEMI ZA ZDRAVILA NA OSNOVI TELESU LASTNIH SESTAVIN**

**Interdisciplinarno področje: kemija in medicina**

**Mentorici: mag. Damijana Gregorič,**

**dr. Nina Kostevšek**

**Avtorica: Ana Iršič**

Slovenska Bistrica, januar 2024

## *Zahvala*

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici na Institutu Jožef Štefan dr. Nini Kostevšek, ki mi je med raziskovalnim delom nudila pomoč in omogočila izvedbo raziskovalne naloge. Prav tako se zahvaljujem svoji profesorici mag. Damijani Gregorič, ki me je navdušila nad kemijo in me spodbudila pri doseganju novih ciljev. Za jezikovni pregled raziskovalne naloge se zahvaljujem Andreji Rozman, prof. angleščine in slovenščine.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	6
2	TEORETIČNI DEL.....	8
2.1	MAGNETIZEM.....	8
2.2	SUPERPARAMAGNETIZEM IN MAGNETNI NANODLECI.....	9
2.3	ENKAPSULACIJA SINTETIZIRANIH Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NANODELCEV.....	10
2.3.1	ERITROCITNE MEMBRANE.....	11
3	EKSPERIMENTALNI DEL .....	13
3.1	SINTEZA Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NANODELCEV .....	13
3.1.1	PRIPOMOČKI, KEMIKALIJE IN IZVEDBA.....	13
3.2	PRIPRAVA ERITROCITNIH MEMBRAN.....	19
3.2.1	PRIPRAVA KRVI .....	19
3.2.2	ČIŠČENJE ERITROCITNIH MEMBRAN .....	19
3.2.3	EKSTRUZIJA.....	20
3.3	MAGNETNI NANODLECI S HCA NA POVRŠINI.....	21
3.3.1	KONČNA PRIPRAVA MAGNETNIH NANODELCEV .....	22
3.4	METODA MIKROEMULZACIJE MAGNETNIH NANODELCEV.....	24
3.5	KARAKTERIZACIJA ERITROCITNIH MEMBRAN Z MAGNETNIMI NANODELCI.....	24
3.5.1	MERJENJE DELCEV .....	24
3.6	PRESEVNA (TRANSMISIJSKA) ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM).....	25
3.7	PRETOČNI EKSPERIMENT.....	25
4	REZULTATI IN ANALIZA.....	28
4.1	VELIKOST EMVs IO-NP DELCEV.....	28
4.2	TEM Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NANODELCEV IO.....	28
4.3	TEM EMVs IO-NP VZORCEV .....	31
4.4	ABSORPCIJSKI SPEKTER.....	32
4.5	PRETOČNI EKSPERIMENT.....	33
5	ZAKLJUČEK.....	35
6	VIRI IN LITERATURA .....	37

## KAZALO SLIK

Slika 1: Magnetizem nanodelcev (Iršič, 2023) .....	9
Slika 4: Sestava eritrocitov (Iršič, 2023).....	11
Slika 5: Kemikalije za sintezo (Iršič, 2023).....	14
Slika 6: Fe (acac) <sub>3</sub> (Iršič, 2023) .....	14
Slika 7: 1,2-heksadekandiola (Iršič, 2023) .....	14
Slika 8: Oleinska kislina (Iršič, 2023) .....	15
Slika 9: Dibenzil eter (Iršič, 2023) .....	15
Slika 10: Apertura za sintezo IO-NP (Iršič, 2023).....	16
Slika 11: Pred centrifugiranjem (pravilna sinteza) (Iršič, 2023) .....	17
Slika 12: Po prvem centrifugiranju (nekontrolirana temperatura) (Iršič, 2023).....	17
Slika 13: Sintetizirani železov oksidni nanodelci (pravilna sinteza) (Iršič, 2023).....	18
Slika 14: Sintetizirani železov oksidni nanodelci (nekontrolirana temperatura) (Iršič, 2023) ..	18
Slika 15: Sintetizirani železo oksidni nanodelci v heksanu (vzorec kapnili na bakreno mrežico) (Iršič, 2023) .....	18
Slika 16: Skica postopka priprave krvi (Iršič, 2023).....	19
Slika 17: Čiščenje krvi (Iršič, 2023).....	20
Slika 18: Ultrazvočni prst (Iršič, 2023) .....	20
Slika 19: Avanti Polar Mini Extruder (Zupanc, 2023).....	21
Slika 20: Vodna kopel (Iršič, 2023) .....	22
Slika 21: NaOH in THF (Iršič, 2023) .....	23
Slika 22: Suhi magnetni nanodelci (Iršič, 2023) .....	23
Slika 23: ZetaPALS (Iršič, 2023).....	24
Slika 24: Vzorec na bakreni mrežici (Iršič, 2023) .....	25
Slika 25: IO+HCA brez prisotnosti magneta (Iršič, 2023).....	26
Slika 26: Po 1 min (Iršič, 2023).....	26
Slika 27: Po 2 min (Iršič, 2023).....	26
Slika 28: Po 3 min (Iršič, 2023).....	26
Slika 29: Pretočni eksperiment (Iršič, 2023).....	27
Slika 30: Povečava 40.000x (Kostevšek, 2023).....	29
Slika 31: Povečava 60.000x (Kostevšek, 2023).....	29
Slika 32: Povečava 120.000x (Kostevšek, 2023).....	29
Slika 33: Povečava 40.000x (Kostevšek, 2023).....	30
Slika 34: Povečava 120.000x (Kostevšek, 2023).....	30
Slika 35: Povečava 60.000x (Kostevšek, 2023).....	31
Slika 36: Povečava 50.000x (Kostevšek, 2023).....	32
Slika 37: Dokaz superparamagnetizacije (Iršič, 2023) .....	33

Slika 38: Pretočni eksperiment z zunanjim magnetom (Iršič, 2023) .....	33
--	----

## **KAZALO TABEL**

Tabela 1: Velikost EMVs IO-NP delcev .....	28
--	----

## **KAZALO GRAFOV**

Graf 1: Absorpcija celotnega spektra .....	32
--	----

Graf 2: Absorpcija v odvisnosti od časa .....	34
---	----

## POVZETEK

V zadnjih desetletjih je velik napredek v medicini povzročila uporaba nanotehnologije. V svoji raziskovalni nalogi sem se ukvarjala z magnetnimi nanodelci, ki se v medicini lahko uporabljajo na različnih področjih (kontrastna sredstva za slikanje z magnetno resonanco, za magnetno hipertermijo ...). Pripravili smo jih na način, da bi se lahko uporabljali kot dostavni sistem za zdravila. Najprej smo sintetizirali magnetne nanodelce z velikostjo pod 25 nm, da smo dosegli superparamagnetizem. Samih magnetnih nanodelcev v telo ne moremo vstaviti, saj bi jih telo prepoznalo kot tujek. Začela bi se proizvajati protitelesa, telo bi jih zavrnilo. Pomembno je, da so ti biokompatibilni, kar smo dosegli, da smo magnetne nanodelce prevlekli z eritrocitnimi membranami, torej s komponento telesu lastnih celic. Eritrocitne membrane smo dobili, da smo iz eritrocitov izločili hemoglobin, izolirali le celične membrane, iz katerih smo nato s pomočjo ekstruderja pripravili nanodelce, velike do 200 nm. V te eritrocitne membrane smo enkapsulirali magnetne nanodelce. Ali se ti zares obdržijo na mestu, izpostavljenemu zunanemu magnetnemu polju, pa smo preverili s pretočnim eksperimentom. Opazovali smo padanje absorpcije, ki je dokazal potrditev zastavljenih hipotez.

**Ključne besede:** magnetni nanodelci, sinteza, liposomi, eritrocite, superparamagnetizem, absorpcija

## ABSTRACT

In recent decades, great progress in medicine has been caused by the use of nanotechnology. In my research project, I dealt with magnetic nanoparticles, which can be used in medicine in various fields (contrast agents for magnetic resonance imaging, for magnetic hyperthermia...). We prepared them in such a way that they could be used as a drug delivery system. First, we synthesized magnetic nanoparticles with a size below 25 nm to achieve superparamagnetism. Magnetic nanoparticles themselves cannot be inserted into the body, as the body would recognize them as foreign. Antibodies would start to be produced, the body would reject them. It is important that these are biocompatible, which we achieved by coating the magnetic nanoparticles with erythrocyte membranes, i.e. with a component of the body's own cells. Erythrocyte membranes were obtained by extracting hemoglobin from erythrocytes, isolating only the cell membranes, from which we then prepared nanoparticles up to 200 nm in size with the help of an extruder. Magnetic nanoparticles were encapsulated in these erythrocyte membranes. Whether these really remain in a place exposed to an external magnetic field, we checked with a flow experiment. We observed a decrease in absorption, which proved the confirmation of the set hypotheses.

**Key words:** magnetic nanoparticles, synthesis, liposomes, erythrocytes, superparamagnetism, absorption

## 1 UVOD

Predpona 'nano' izvira iz grščine, je izpeljanka besede »Nanos«, kar pomeni 'škrat' in se originalno nanaša na  $10^{-9}$  redukcijo velikosti ali časa, kar je v dolžinskih enotah tisočkrat manjše od mikrona (približna debelina človeškega lasu). Nanodelci so torej tisti, ki vsaj v eni dimenziji ustrezajo velikosti nanodimenzije. Formalno so to skupki  $10-10^5$  atomov s povprečnim radijem med 1–100 nm. Tista ključna lastnost, ki nanotehnologijo tako močno razlikuje od ostalih ved, je dejstvo, da se z zmanjšanjem velikosti materiala pod 100 nm začnejo dogajati bistvene spremembe. [1]

Magnetni nanodelci se uporabljajo na področju biologije, fizike in kemije ter nam na stičišču teh nudijo številne aplikativne možnosti. Magnetni nanodelci na osnovi železovega oksida se že uporabljajo v medicini za več stvari: kot kontrastna sredstva za slikanje z magnetno resonanco, za magnetno hipertermijo; ker se pod vplivom oscilirajočega magnetnega polja segrejejo in posledično lahko tako segrejemo tumor; za foto-termično terapijo; kjer se segrejejo zaradi obsevanja z laserjem, ne zaradi magnetnega polja ipd.

Njihove magnetne lastnosti lahko uporabimo tudi za vodeno dostavo za različne učinkovine. Tako smo v naši raziskovalni nalogi želeli preveriti, ali lahko te manipuliramo z zunanjim magnetnim poljem. Kar bi pomenilo, da po izpostavitvi magnetnemu polju nanodelce kopicimo in zadržimo na tarčnem mestu, kar omogoča ciljno dostavo nanje vezanih učinkovin. Vendar sta njihova uporabnost in učinkovitost odvisni od velikosti delcev, ki definira magnetne lastnosti. Za medicinske aplikacije je pomembna njihova velikost, ki ne sme presegati 25 nm. Večji delci so feromagnetni, kar pomeni, da so trajno namagneteni, kar bi v telesu povzročilo tvorbo velikih skupkov. Delci z velikostjo pod 25 nm namreč izkazujejo superparamagnetne lastnosti, kar pomeni, da se obnašajo kot magnetni material le v prisotnosti magnetnega polja. Ko le tega odstranimo, niso več magnetni. Prav tako jih je potrebno za zagotavljanje biokompatibilnosti in stabilnosti prevleči z netoksičnimi prevlekami.

Namen raziskovalne naloge je bil uporabiti magnetne nanodelce kot nosilce za zdravila, pri čemer ti ne bi izvali imunskega izziva.

Tako smo si postavili dve hipotezi:

**HIPOTEZA 1:** Priprava biokompatibilnih magnetnih nanodelcev, ki ne bi izvali imunskega odziva, zato uporabimo telesu lastne celice – membrane rdečih krvnih celic oz. eritrocitov. Predpostavimo, da lahko majhne magnetne nanodelce (5 nm) enkapsuliramo v te membrane, ki morajo biti ustrezne velikosti (100–200 nm). Eritrociti so 7–8  $\mu\text{m}$ , zato moramo pripraviti manjše z eskruzijo.

HIPOTEZA 2: Magnetne nanodelce lahko zadržimo na želenem mestu med cirkuliranjem z uporabo zunanjega magnetnega polja (magneta).

Hipoteze smo ovrgli oz. potrdili z eksperimentom, ki smo ga izvajali na Institutu Jožefa Štefana v času poletnih počitnic 2023, saj je izvedba samega eksperimentalnega dela dolgotrajna in zahtevna, tako v samem srednješolskem laboratoriju ta ne bi bila izvedljiva.



## 2 TEORETIČNI DEL

### 2.1 MAGNETIZEM

Ko snov postavimo v magnetno polje, se zaradi reorientacije magnetnih momentov pojavi magnetizacija  $M$ . [2]

Magnetizacija predstavlja gostoto magnetnega momenta in je za paramagnetne snovi sorazmerna z jakostjo zunanega magnetnega polja. Za šibka magnetna polja velja

$$M = \chi H,$$

sorazmernostni koeficient imenujemo magnetna susceptibilnost  $\chi$  (je sorazmernostni koeficient med magnetizacijo in gostoto zunanega magnetnega polja). [2,3]

Glede na vrednost magnetne susceptibilnosti delimo magnetne nanodelce na:

- diamagnetne,
- paramagnetne,
- feromagnetne,
- superparamagnetne,
- antiferomagnetne in
- ferimagnetne.

Paramagnetne (vrednost susceptibilnosti je reda  $10^{-6}$ ), superparamagnetne ter diamagnetne (negativna susceptibilnost reda  $10^{-5}$ ) snovi so magnetne le ob prisotnosti zunanega magnetnega polja. Snovi, ki so magnetne tudi ob odsotnosti zunanega polja, so feromagnetni, antiferomagnetni in ferimagnetni. Lastna magnetizacija feromagneta je posledica interakcije med magnetnimi momenti znotraj snovi. Pomembna lastnost feromagnetov (kakor tudi ferimagnetov) je pojav magnetne histereze pri merjenju magnetizacije kot funkcije zunanega magnetnega polja. Širina magnetne histereze se močno zmanjša ali pa povsem izgine, če velikost delcev zmanjšamo v področje nanometrov (takrat delec postane monodomenski). Takrat govorimo o superparamagnetnih nanodelcih. [4]

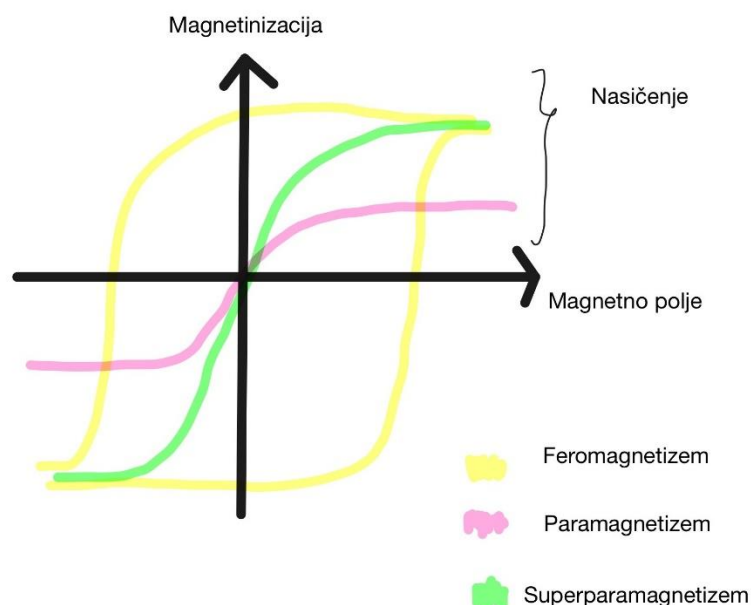
## 2.2 SUPERPARAMAGNETIZEM IN MAGNETNI NANODLECI

Feromagnetne snovi so sestavljene iz magnetnih domen. Z manjšanjem teh domen se energija domenskih sten povečuje in bi bila za premajhne delce prevelika. Takrat postane delec monodomenski. Za magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) se prehod v monodomensko stanje zgodi pri delcih manjših od 40 nm. Če velikost delca še zmanjšujemo (do velikosti nekaj 10 nm), preidemo v območje superparamagnetizma.

Superparamagnetizem je oblika magnetizma, značilna za dovolj majhne feromagnetne (kot tudi ferimagnetne) nanodelce. Ti delci so monodomenski, torej se obnašajo kot en sam velik magnetni dipolni moment, torej kot da ima delec velik efektivni spin  $S$ . Tipične velikosti nanodelcev se gibljejo med 10 nm in 50 nm. [2]

Za železo-oksidge nanodelce (IO-NP), velikosti manjše od 25 nm, je značilno, da so superparamagnetni, ker domene ne morejo obdržati konstantne magnetizacije brez prisotnosti magnetnega polja in fluktuirajo, kar pomeni, da vsak spin kaže v svojo smer in magnetni učinek se izniči, ko ni magnetnega polja. Ko pa izpostavimo superparamagnetne delce magnetnemu polju, se vsi spini obrnejo v smeri magnetnega polja.

Če primerjamo magnetizacijo paramagnetnih, superparamagnetnih in feromagnetnih snovi, dobimo graf, ki ga prikazuje slika 1.



Slika 1: Magnetizem nanodelcev (Iršič, 2023)

Pri odsotnosti magnetnega polja je torej izmerjena magnetizacija superparamagnetnih nanodelcev (NP) enaka nič. Če povečujemo magnetno polje v eno smer, se tudi spini delcev obračajo v isto smer, dokler ne pride do nasičenja, da so vsi spini obrnjeni v isto smer.

Edino pri feromagnetnem in ferimagnetnem materialu opazimo histerezo (slika 1), ki nakazuje, da imajo delci določeno magnetizacijo tudi ob odsotnosti magnetnega polja. Zato je pri razlagi magnetnega učinka zelo pomembna velikost delcev, saj bi potencialni superparamagnetni IO-NP pri večji velikosti od 25 nm prešli v feromagnetne delce.

Paramagnetnih in superparamagnetnih snovi ne moremo opisati s histerezo, lahko pa jih opišemo z Langevinovo funkcijo, kjer je saturacijska magnetizacija za superparamagnetne delce višja kot za paramagnetne delce, saj so superparamagnetni delci feromagnetni NP z zelo velikim magnetnim momentom. [4]

### 2.3 ENKAPSULACIJA SINTETIZIRANIH $Fe_3O_4$ NANODELCEV

Biokompatibilnost je sposobnost pravilnega odziva materiala v odnosu do gostitelja (pacienta) [5]. Za zagotavljanje te in dovolj dolgega časa cirkulacije v krvnem obtoku je potrebno na magnetne NP nanesti ustrezno prevleko, ki povečajo njihovo stabilnost, biokompatibilnost ter preprečujejo aglomeracijo nanodelcev. Primarna vloga enkapsulacijskih sredstev je zaščita terapevtskega ali diagnostičnega sredstva pred prepoznavo imunskega sistema in zaščita netačnih organov ali tkiv, pred citotoksičnimi aktivnostmi zdravilnih sredstev, pri čemer se ustrezno eliminirajo stranski učinki.

Kljub napredku na področju nanomedicine večino sintetičnih nanodelcev in prevlek imunski sistem prepozna kot tujek, kar vodi do njihove hitre odstranitve iz krvnega ter limfnega obtoka in posledično občutnega zmanjšanja učinkovitosti zdravljenja. Potencialno bi neenkapsulirane nanodelce organizem hitro izločil preko RES (makrofagi retikuloendotelijskega sistema) ali mononuklearnega fagocitnega sistema, prav tako pa bi se nanje absorbirali proteini plazme ali seruma, kar bi dramatično spremenilo njihovo namembnost v biološkem sistemu. [6]

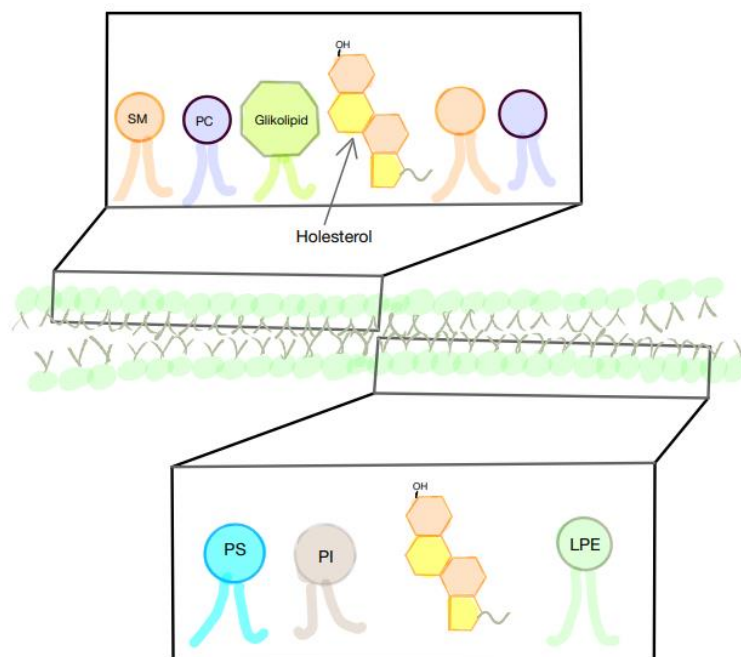
Izbor polimerov in nanomaterialov, ki bi se lahko uporabljali v biomedicinskih aplikacijah kot potencialni nanodostavjalci kontrastnih ter zdravilnih sredstev, morajo zagotoviti stabilnost in biokompatibilnost, z minimalnimi citotoksičnimi efekti. [7]

Najbolj uporabljena enkapsulacijska sredstva so sintetični polimeri (dektran, želatina, albumin, kazein, PEG, polidopamin, itd.), maščobne kisline (oleinska ter stearinska kislina), aminokisline (fenilalanin, tirozin, arginin, cistein in lizin), kovine (srebro, zlato) ter oksidi (silika in  $TiO_2$ ). Največkrat se uporabi PEG-ilirane snovi, ki vsebujejo PEG (polietilen glikol), saj imajo le te najdaljši razpolovni čas, kadar se aplicirajo intravenozno. [8] Izbrana enkapsulacijska sredstva pri moji raziskovalni nalogi so eritrocitne membrane, kot naravno alternativo

sintetičnim materialom, in jih telo ne bi prepoznalo kot tujke in posledično bi povzročali manj stranskih učinkov kot PEG-ilirani liposomi.

### 2.3.1 ERITROCITNE MEMBRANE

Eritrociti oziroma rdeče krvne celice predstavljajo glavno celično komponento krvi. [11] So produkt diferenciacijskega procesa, kjer v kostnem mozgu hematopoetske matične celice pod vplivom citokinov (eritropoetina) preko JAK/Stat signalne poti diferencirajo v nuklearne eritrocite, ki do konca dozoriijo v krvnem obtoku.



Slika 2: Sestava eritrocitov (Iršič, 2023)

Fosfolipidi in lipidi (35,1 %) poleg proteinov (39,5 %) predstavljajo večinski del membrane eritrocitov in so organizirani v dvosloj (slika 2). Fosfolipidi, ki zavzemajo 60 % lipidnih komponent, so esencialni fosfatidilholin (PC), sfingomielin (SM) in fosfatidilserin (PS). [11] PC in SM se nahajata na zunanji, PS pa na notranji strani fosfolipidnega dvosloja. [10] Taka porazdelitev se imenuje trans asimetrija, kjer so fosfolipidi neenakomerno porazdeljeni po membrani, kar ima pomembno strukturno ter funkcionalno vlogo, npr. ekspozicija PS zunanji površini vodi v apoptozo celice. Poleg omenjenih fosfolipidov, fosfolipidni dvosloj sestavljajo tudi fosfatidilinozitol (PI), PI-monofosfat, PI-4,5-bisfosfat, lipofosfatidilholin ter lipofosfatidiletanolamin (LPE). 30 % lipidnih komponent eritrocitne membrane predstavlja še holesterol, 10 % pa glikolipidi. Pri fiziološkem pH je večina fosfolipidov električno nevtralna, kljub temu da so PS, PA ter PI negativno nabiti.

Eritrocite bi lahko potencialno odvzeli vsakemu pacientu posebej, iz njih izolirali membrane ter vanje vstavili zdravila. V tej raziskovalni nalogi smo iz celih eritrocitov izločili le njihove membrane tako, da smo sprostili hemoglobin, in nato v njih enkapsulirali magnetne nanodelce.

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

V teoretičnem delu naloge smo izvedeli, kaj je magnetizem in katere vrste magnetnih nanodelcev poznamo. Če na hitro obnovimo teorijo, je magnetizacija gostota magnetnega momenta in je za paramagnetne snovi sorazmerna z jakostjo zunanjega magnetnega polja. Na podlagi koeficienta magnetna susceptibilnosti ločimo oz. poznamo več vrst magnetnih nanodelcev. Pri opravljanju raziskovalne naloge smo stremeli k temu, da bi bili IO-NP superparamagnetni, kar pomeni, da so magnetni le ob prisotnosti zunanjega magnetnega polja. To bomo dosegli z njihovo nadzorovano sintezo in modifikacijo. Če bi bili večji od 25 nm, bi bili namreč klasični, feromagnetni materiali, ki so po definiciji permanentno magnetizirani materiali.

Po uspešni sintezi smo stremeli k njihovi biokompatibilnosti. Tako smo nanodelce enkapsulacirali z eritrociti za zaščito terapevtskega ali diagnostičnega sredstva pred razgradnjo z imunskim sistemom in zaščita ne-tarčnih organov ali tkiv.

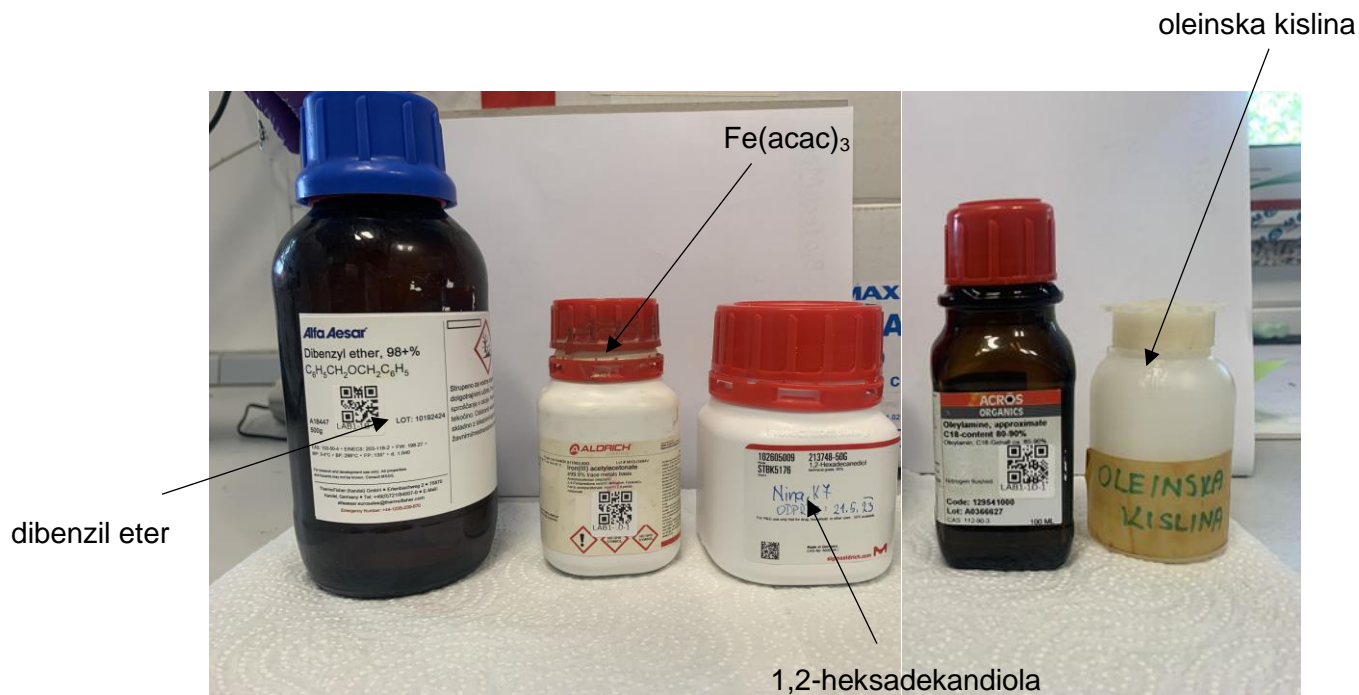
S črpalko, cevkami, magnetom in spektrofotometrom smo vzpostavili obtočni sistem, kjer smo testirali postavljeno hipotezo 2.

#### 3.1 SINTEZA $\text{Fe}_3\text{O}_4$ NANODELCEV

Ker je namen raziskovalne naloge sinteza in karakterizacija superparamagnetnih IO-NP za njihovo rabo v biomedicinske namene, je pomembno, da so sintetizirani IO-NP čimbolj monodisperzni, uniformni in homogeni, zato da se doseže njihov maksimalni superparamagnetni učinek. V tem delu smo uporabili metodo s termično dekompozicijo prekurzorjev železa.

##### 3.1.1 PRIPOMOČKI, KEMIČALIJE IN IZVEDBA

Sinteza IO-NP oziroma nanokristaličnih magnetitov poteka preko termične razgradnje organokovinskih prekurzorjev železa z namenom pridobitve uniformnih superparamagnetnih IO-NP.

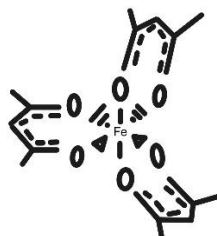


Slika 3: Kemikalije za sintezo (Iršič, 2023)

Uporabili smo (slika 3):

- Kovinska sol:

0,71 g 2 mmol železov acetil acetat ( $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ).



Slika 4:  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (Iršič, 2023)

- Reducent:

2,38 g 10 mmol 1,2-heksadekandiola



Slika 5: 1,2-heksadekandiola (Iršič, 2023)

- Surfakant:

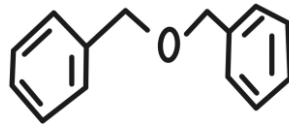
2 ml oleinske kisline



Slika 6: Oleinska kislina (Iršič, 2023)

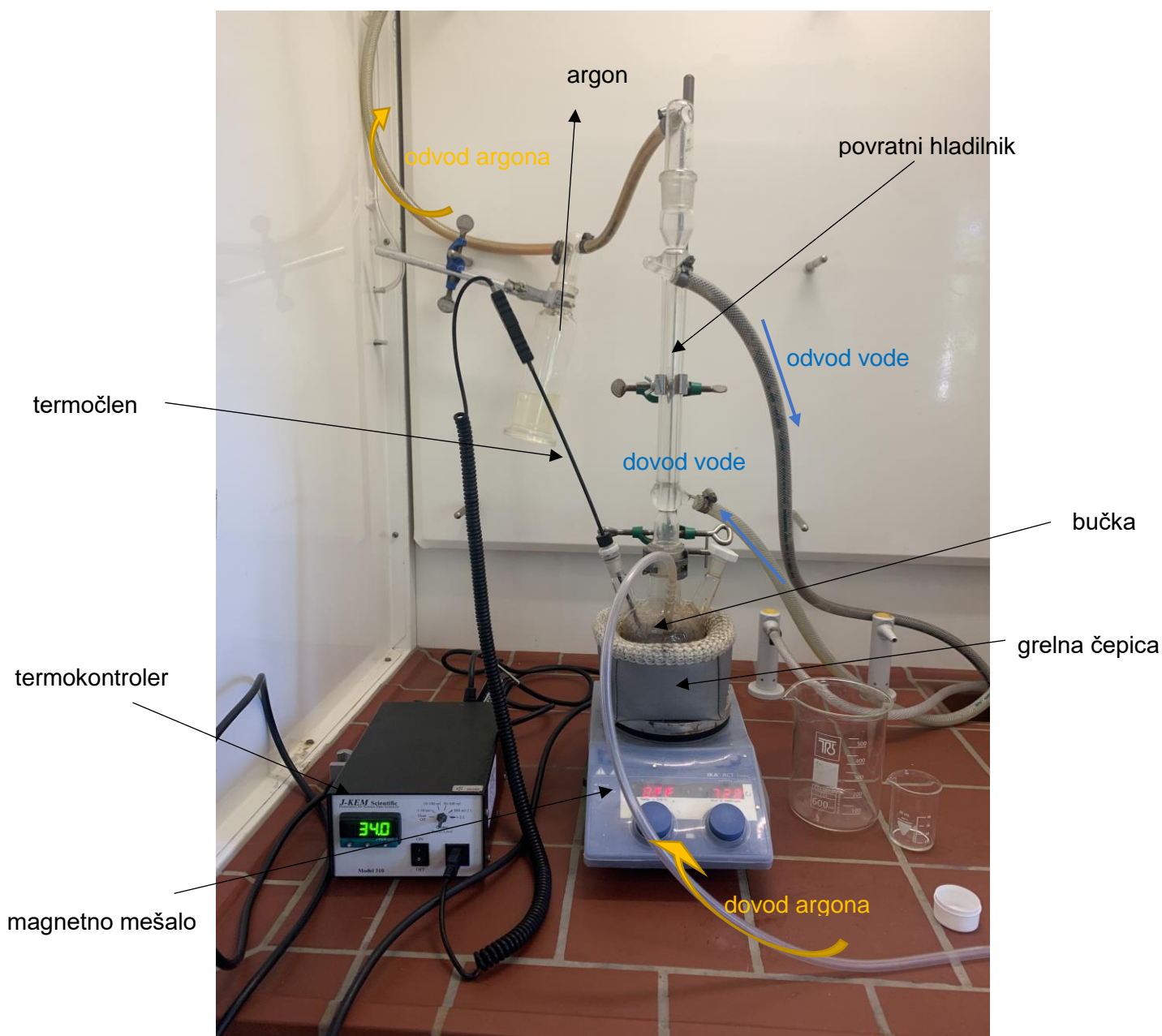
- Topilo:

20 ml topila dibenzil etra



Slika 7: Dibenzil eter (Iršič, 2023)





Slika 8: Apertura za sintezo IO-NP (Iršič, 2023)

Pripravili smo bučko, ki smo jo postavili v grelni plašč in ga postavili na magnetno mešalo. V njo smo odpipetirali ustrezne količine spojin ter sestavili prikazano napravo na sliki 8. Priključili smo termokontroler, dotok in odtok vode in argona, kateri tok je potekal po povratnem hladilniku. Da je magnetno mešalo služilo namenu, smo v samo bučko vstavili magnet.

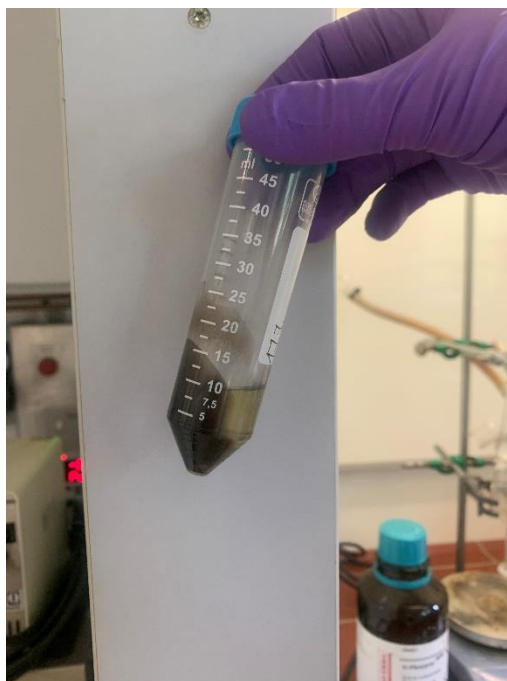
Po končani sestavi celotne aperture smo vklopili pretok argona, s katerim smo onemogočili vsak pretok kisika, ki bi lahko sprožil reakcijo. Tako je bil naš poskus s pomočjo argona kontroliran. Po 10 min na sobni temperaturi smo pričeli s segrevanjem do 200 °C in na tej temperaturi segrevali 1 h. Nato smo temperaturo povišali na 260 °C in segrevali še 30 min. Ob celotnem segrevanju smo imeli vključen sistem vode v povratnem hladilniku, kar preprečuje

izparevanje reagentov med samo reakcijo. Ko je sama zmes prešla na sobno temperaturo, smo dovod argona izključili.

Po ohladitvi smo dodali 20 mL etanola, ki ima vlogo protitopila, saj so bili sintetizirani IO-NP dispergirani v heksanu in protitopilo je pomagalo pri tem, da se IO-NP posedejo. Nato smo zmes razdelili v dve centrifugirki (slika 9) in ju s primerno otežitvijo centrifugirali pri 6500 rpm/10 min. Da smo to primerno otežili, smo vsako centrifugirko posebej stekali.



*Slika 9: Pred centrifugiranjem (pravilna sinteza) (Iršič, 2023)*



*Slika 10: Po prvem centrifugiranju (nekontrolirana temperatura) (Iršič, 2023)*

Ob koncu prvega centrifugiranja (slika 10) smo s pipeto odstranili odvečno tekočino ter dodali 20 mL etanola. Sledilo je centrifugiranje pri enakih obratih in z isto časovno dolžino kot prej.

S kapalko smo odpipetirali še zadnje ostanke supernatanta, da smo dobili posušene nanodelce.

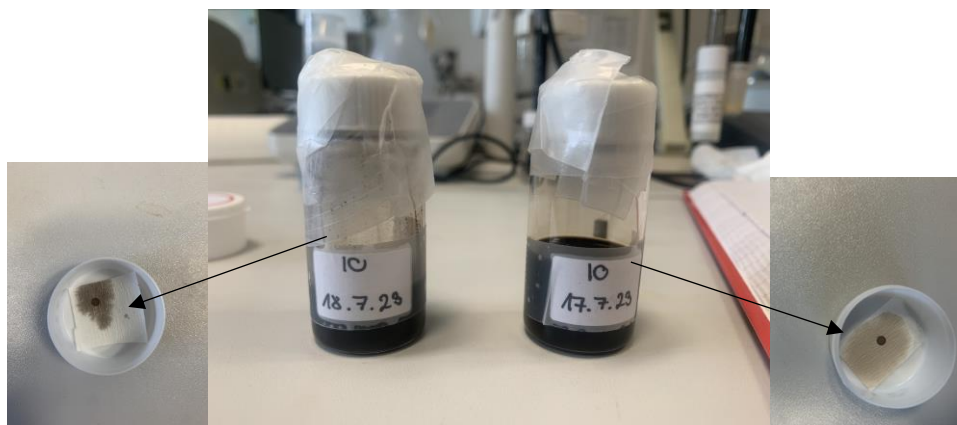


Slika 11: Sintetizirani železov oksidni nanodelci (pravilna sinteza) (Iršič, 2023)



Slika 12: Sintetizirani železov oksidni nanodelci (nekontrolirana temperatura) (Iršič, 2023)

Na sliki 11 imamo prikazane posušene nanodelce, kjer je bila temperatura kontrolirana. Tudi na sliki 12 opazimo posušene nanodelce, kljub neuspelemu prvotnemu poskusu, kjer termočlen ni bil postavljen v sam vzorec. Nato smo dodali 4 mL heksana, da smo vse nanodelce, sprijete na centrifugirko, prelili v stekleničko (slika 13). Vsak vzorec smo kapnili na bakreno mrežico za TEM (presevno elektronsko mikroskopijo).



Slika 13: Sintetizirani železo oksidni nanodelci v heksanu (vzorec kapnili na bakreno mrežico) (Iršič, 2023)

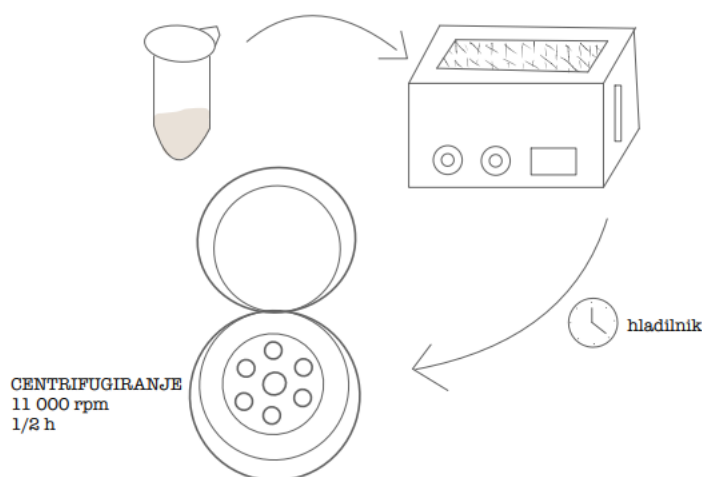
## 3.2 PRIPRAVA ERITROCITNIH MEMBRAN

Potrebno je bilo pripraviti enkapsulacijsko sredstvo, da telo ne bi sprožilo imunskega odziva. Tako smo iz človeške krvi pripravili eritrocitne membrane.

### 3.2.1 PRIPRAVA KRVI

Za pripravo eritrocitnih membran (EMVs) smo uporabili 1 mL človeške krvi, ki je bila shranjena v zmrzovalniku na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tako smo jo s pomočjo ultrazvočne kopeli odtalili. Šlo je za prečiščeno kri eritrocitov (70 %), last moškega krvodajalca, s skupino A+ in antigenom RHd.

V centrifugirko smo odmerili 40 mL 1xPBS (fosfatni pufer s soljo, ki pomaga obdržati stalen pH pufra (5 mL PBS + 40 mL vode), da pride do osmotskega šoka zaradi nižje koncentracije pufra, pri čemer počni membrana eritrocitov in hemoglobin se sprostijo iz celic. Do sprostitve hemoglobina pride le pri poškodovanih ali mrtvih eritrocitih. Dodali smo samo kri ter za zagotovitev omenjenega pojava to postavili za 1 min v ultrazvočno kopel, nato pa za približno pol ure še v hladilnik. Namreč RBC-ji lahko izločijo hemoglobin najhitreje po pol ure pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tako je bolje pustiti stati malo več časa, kot da bi sam poskus morali ponoviti. Po hlajenju smo centrifugirko z dano zmesjo dali centrifugirati za pol ure na največji hitrosti, kar je 11000 rpm. Celoten postopek je povzet na sliki 14.



Slika 14: Skica postopka priprave krvi (Iršič, 2023)

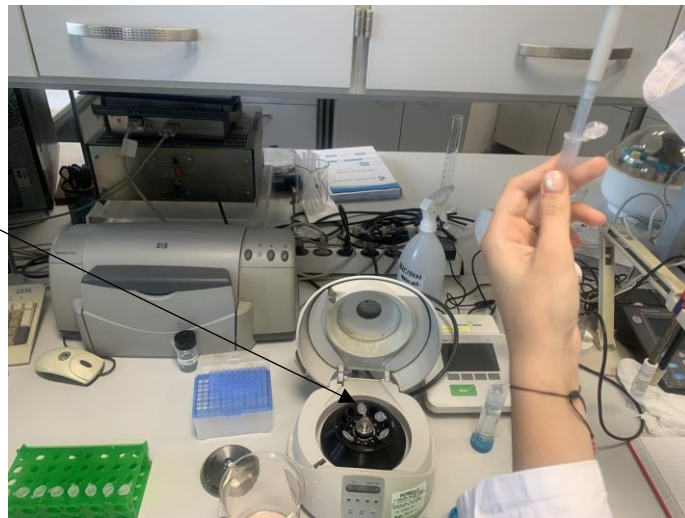
### 3.2.2 ČIŠČENJE ERITROCITNIH MEMBRAN

Po končanem centrifugiranju krvne zmesi smo odstranili supernatant. Nato smo dodali 4 mL 1xPBS in ponovno zmešali. Raztopino smo razdelili v 6 majhnih epruvet, v vsako 1 mL.

Te 4 majhne epruvete smo postavili v majhno centrifugo (slika 15), za 5 min pri hitrosti 13000 rpm. Ločili smo ponovno supernatant in dodali 0,1xPBS. Postopek centrifugiranja smo ponovili tolikokrat, dokler nismo imeli čiste zmesi oz. posejdenih praznih eritrocitnih membran. Samo čiščenje smo končali z dodatkom 1 mL 1xPBS, da se vzorci ne posušijo.

Dobili smo 6 vzorcev.

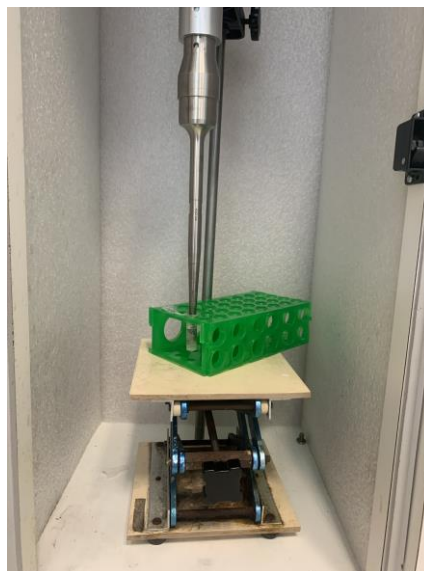
mala centrifuga



Slika 15: Čiščenje krvi (Iršič, 2023)

### 3.2.3 EKSTRUZIJA

Pomembno je bilo, da so vzorci postali homogeni, pri čemer nam je pomagal ultrazvočni prst, ki je te premešal. Postopek in sestava ultrazvočnega prsta, ki smo ga potopili v sam vzorec, je prikazan na sliki 16.

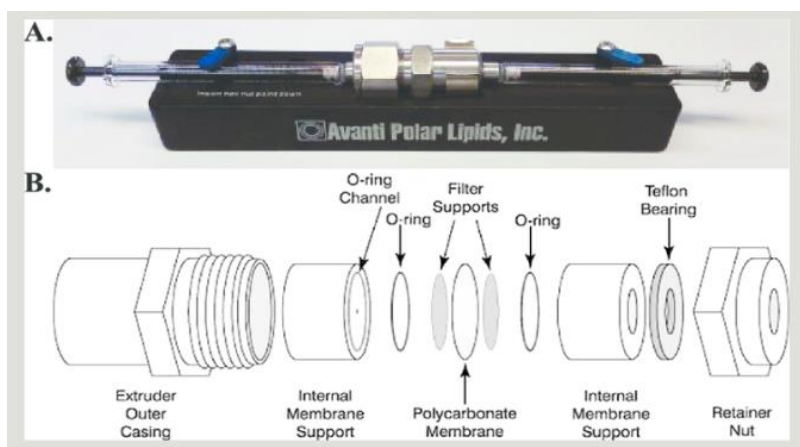


Slika 16: Ultrazvočni prst (Iršič, 2023)

Pripravili smo Avanti Polar Mini Extruder (slika 17), s katerim smo zmanjšali velikost delcev našega vzorca, torej eritrocitnih membran. Namreč same eritrocitne membrane so na začetku 7–8 mikronske, s tem zmanjšamo velikost teh veziklov na 200 nm. To smo dosegli s pomočjo ekstruderja. Celotna naprava je sestavljena iz dveh nasprotnih si brizg in treh membran na



sredini. Vzorci so bili ekstruzirani skozi 200 nm polikarbonatnimi membranami (Whatman filter). Naprava je morala biti pravilno zatesnjena, saj vzorec ni smel nikjer uhajati (prišlo bi do izgube vzorca).



Slika 17: Avanti Polar Mini Extruder (Zupanc, 2023)

Vzorec smo vstavili v levo brizgo in ga potisnili skozi membranski sistem 15-krat. Nato smo vzorec vrnili nazaj v malo epruveto. Vzorci so bili očiščeni in pripravljene za enkapsulacijo magnetnih nanodelcev.

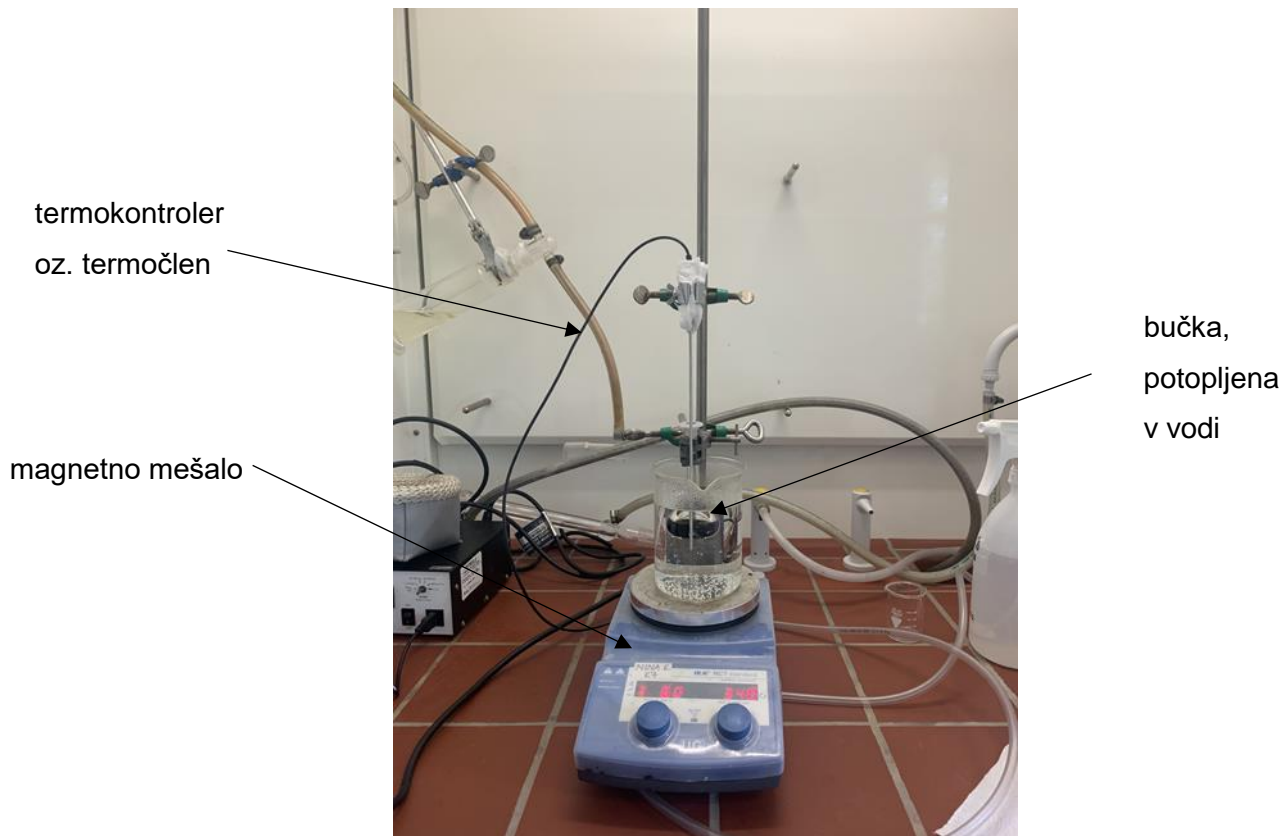
### 3.3 MAGNETNI NANODLECI S HCA NA POVRŠINI

Same membrane smo očistili in ekstruzirali, prvi del je bil pripravljen. Nato je sledila priprava magnetnih nanodelcev s HCA (hidroksikofeionsko kislino), ki je potekal sočasno s pripravo membran, saj gre za dolgo trajajoč postopek.

2 mL vzorca, ki smo ga pridobili s sintezo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanodelcev (uspešnega sintetiziranja), smo zmešali skupaj z 3 mL THF. THF je tetrahidrofuran, brezbarvna organska spojina z nizko viskoznostjo, ki se meša z vodo. Uporablja se kot vsestransko topilo, kot predhodnik polimerov. [12]

Za THF-jem smo dodali 50 mg HCA v 5 mL THF. Vse skupaj smo premešali s pomočjo ultrazvočne kopeli za 20 min pri 50 °C.

Med čakanjem smo sestavili aparaturo za vodno kopel nastale zmesi, sestava le te je prikazana na sliki 18. Tako smo bučko postavili na kovinsko stojalo oz. vstavili v prižemo. Spodnji del bučke smo potopili v vodo ter jo segreli na 60 °C. Vodna kopel zmesi je trajala 3 h.



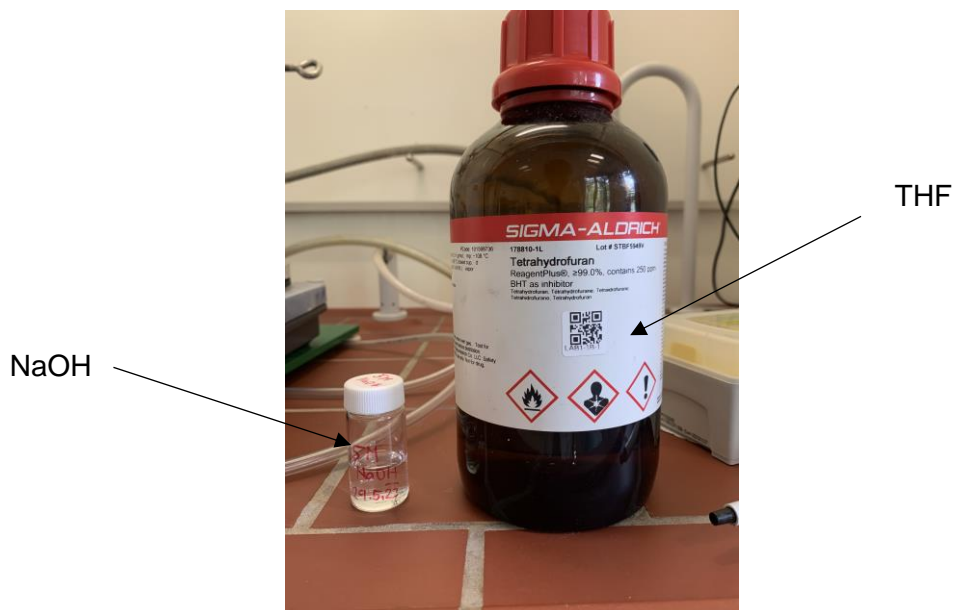
Slika 18: Vodna kopel (Iršič, 2023)

Po treh urah smo vodno kopel izklopili ter počakali, da je zmes padla na sobno temperaturo.

Z vodno kopeljo smo omogočili odcep oleinske kisline in oleilamina (dveh surfaktantov, ki smo ju uporabili za samo sintezo magnetnih nanodelcev) ter omogočili, da se priključi voda, posledica česar je, da delci niso skupaj. Pomembno je, da so delci ločeni, saj to omogoči prehod le teh v eritrocitno membrano.

### 3.3.1 KONČNA PRIPRAVA MAGNETNIH NANODELCEV

Odmerili smo 200  $\mu\text{L}$  5 M NaOH (natrijev hidroksid) (slika 19) ter dodali magnetne nanodelce pripravljene z vodno kopeljo.



Slika 19: NaOH in THF (Iršič, 2023)

Celotno zmes smo prestavili v centrifugirko, vse skupaj stehali ter centrifugo pravilno otežili. Centrifugiralo se je 20 min na 7000 rpm. Nato smo višek previdno odstranili s pomočjo pipete, saj je naš cilj bil, da se suhi magnetni nanodelci posedejo na dno. Dodali smo 10 mL THF ter ponovno centrifugirali pri isti hitrosti za 10 min.

Po centrifugiranju smo še odstranili zadnji višek in prepihali z argonom ter dobili suhe magnetne nanodelce (slika 20).



Slika 20: Suhi magnetni nanodelci (Iršič, 2023)

Magnetnim nanodelcem smo dodali 1 mL destilirane vode.



### 3.4 METODA MIKROEMULZACIJE MAGNETNIH NANODELCEV

Poznanih je več metod za sintezo nanodelcev, a mikroemulzijska metoda ima pred ostalimi prednost, da lahko nadziramo velikost, morfologijo, površinsko napetost in homogenizacijo sintetiziranih nanodelcev.

Čiščenju krvi oz. eritrocitnih membran je sledila dokončna priprava IO-NP. Eritrocitne membrane smo prelili v 25 mL bučko z okroglim dnom in dodali 25  $\mu$ L hidrofobnih IO-NP. Zmes smo takoj postavili pod ultrazvočni prst za 2,5 min, da se je tvorila mikroemulzija. Nato smo odstranili heksan z rotavaporjem (10 min/400 mbar). Vzorce smo shranili nazaj v male epruvete. Dobili smo 6 vzorcev, v vsaki po 1,5 mL EMVs-IONP.

### 3.5 KARAKTERIZACIJA ERITROCITNIH MEMBRAN Z MAGNETNIMI NANODELCI

Analiza velikosti delcev je zelo pomembna, saj lahko z njeno pomočjo primerjamo dimenzije sintetiziranih IO-NP in bioloških sistemov. Premer najmanjših kapilar v človeškem telesu je 4  $\mu$ m, zato je pomembna velikost IO-NP, da ti pridejo do vseh ciljnih točk v telesu.

#### 3.5.1 MERJENJE DELCEV

Hidrodinamsko velikost IO-NP delce smo izmerili s pomočjo instrumenta ZetaPALS (Zeta Potential Analyzer), ki je avtomatični instrument, zasnovan za uporabo raztopine makromolekul, kjer so delci premera 10 nm do 30  $\mu$ m. Velikost, pridobljena na ZetaPALS, predstavlja hidrodinamski premer, ker poleg meritve osnovnega delca zazna tudi organske spojine na njegovi površini, ki prav tako sipajo svetlobo.

Za meritev je potrebno 1,5 mL vzorca, ki smo ga odpipetirali v kiveto, ki smo jo vstavili v ZetaPALS (slika 21). Kjer je vzorca primanjkovalo, smo dodali PBS.



Slika 21: ZetaPALS (Iršič, 2023)

Meritev smo izvedli dvakrat, najprej po takojšnji makroemulzaciji magnetnih nanodelcev. Vzorce smo postavili za približno pol ure v hladno okolje s 4 °C. Kasneje smo meritev ponovili.

### 3.6 PRESEVNA (TRANSMISIJSKA) ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM)

S TEM smo pridobili podatke o porazdelitvi in morfologiji IO-NP, o njihovi sestavi in kitaliničnosti. Presevni elektronski mikroskop je sestavljen iz puške, ki obstreljuje vzorec. V njej so kolone, ki sfokusirajo elektronski snop. S pomočjo detektorja se pridobijo slike na zaslonu. Materiali, ki so elektronsko bolj gosti (npr. zlato), bodo absorbirali več elektronov in bodo na sliki prikazani temnejše, kot npr. organske snovi, ki absorbirajo manj elektronov. Rezultat TEM so 2D slike iz 3D predmeta, ki ga mikroskopiramo.

Vzorci za TEM je potrebno predhodno posušiti in jih opazovati v vakuumu, pri čemer lahko pride do razpada organskih spojin na površini. Sam preparat smo pripravili tako, da smo združili skupaj vseh 6 vzorcev. Odpipetirali smo 15 µL vzorca ter ga nanесли na bakrovo mrežico, pod katero se je nahajal filter papir, kamor se steče odvečna tekočina (slika 22). Mrežica ima na površini tanko, nanometrsko plast iz ogljika, kamor se ujamejo NP. S TEM sem izvedla morfološko preiskavo vzorcev.



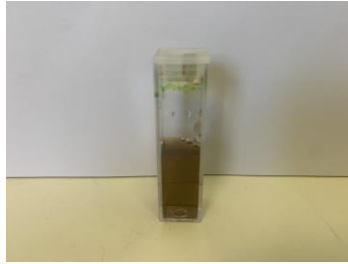
*Slika 22: Vzorec na bakreni mrežici (Iršič, 2023)*

Klasično TEM mikroskopiranje smo izvedli na Centru za elektronsko mikroskopijo in mikroanalizo (CEMM) na Institutu Jožefa Štefana, na modelu Jeol 7600F.

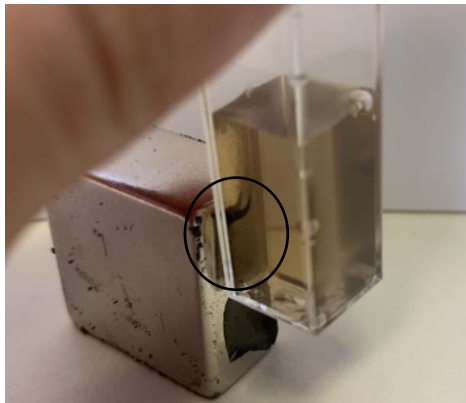
### 3.7 PRETOČNI EKSPERIMENT

S pretočnim eksperimentom smo hoteli dokazati, da lahko magnetne nanodelce zadržimo na želenem mestu med cirkuliranjem z uporabo magnetnega polja (magneta).

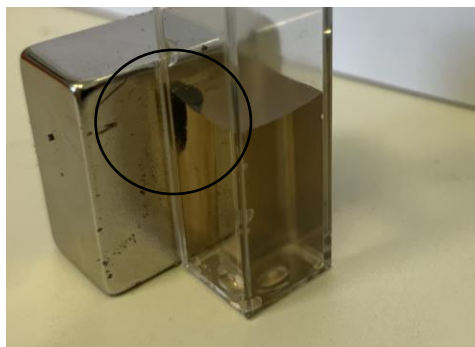
Pred tem smo preverili, če lahko zadržimo magnetne nanodelce brez pretoka. Tako smo ob samo posodico z vzorcem postavili magnet. Samo dogajanje smo opazovali 3 minute in vsako minuto slikali dogajanje.



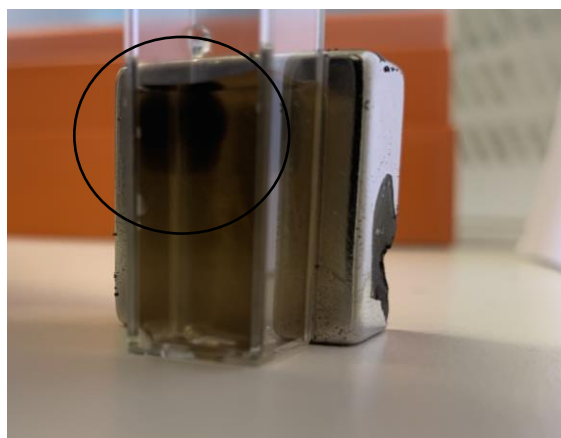
*Slika 23: IO+HCA brez prisotnosti magneta (Iršič, 2023)*



*Slika 24: Po 1 min (Iršič, 2023)*



*Slika 25: Po 2 min (Iršič, 2023)*

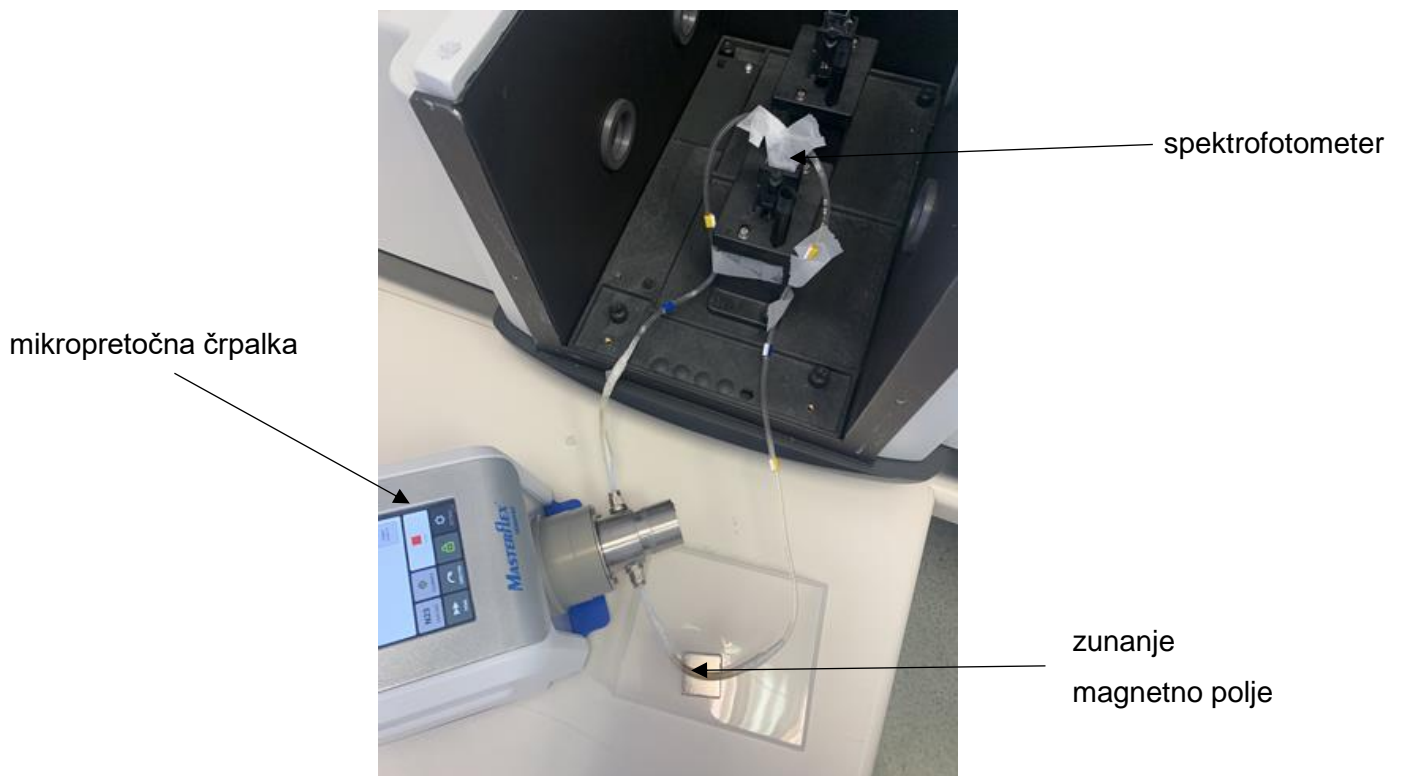


*Slika 26: Po 3 min (Iršič, 2023)*

Pred sestavo cevne sistema smo s pomočjo spektrofotometra izmerili absorpciji tako HCA-IO kot EMVs-IO ter jo s pomočjo grafa primerjali. Merili smo jo natanko 10 min.

Nato smo sestavili žilni sistem (slika 27), kjer smo uporabili cev s premerom 800  $\mu\text{m}$ . Te so predstavljale žile arterije. Nalogo srca pa je prevzela mikropretočna črpalka Masterflex Ismatec. Z nizkim pretokom zagotavlja natančen nadzor, tako je idealen za samoanalizo, pretočne celice ... Sama hitrost pretoka je znašala 53 mL/min, kjer smo simulirali s pretokom žil arterij. Del žilnega sistema (cevk) pa smo postavili tudi v sam spektrofotometer ter merili absorpcijo med samim pretokom.

Ob samo cevko smo postavili magnet, katerega naloga je bila ustavitev magnetnih nanodelcev.



Slika 27: Pretočni eksperiment (Iršič, 2023)

## 4 REZULTATI IN ANALIZA

### 4.1 VELIKOST EMVs IO-NP DELCEV

EMVs IO-NP (eritrocitne membrane s hidrofobnimi nanodelci) delce smo izmerili s pomočjo instrumenta ZetaPALS (Zeta Potential Analyzer), ki je avtomatični instrument, zasnovan za uporabo raztopine makromolekul, kjer so delci premera 10 nm do 30  $\mu\text{m}$ .

Tabela 1: Velikost EMVs IO-NP delcev

	1. MERITEV (nm)	ODSTOPANJE (+/-)	2. MERITEV (nm)	ODSTOPANJE (+/-)
EMVS IO-NP1	262,90	2,80	/	/
EMVS IO-NP2	133,80	5,50	203,10	24,60
EMVS IO-NP3	205,20	1,80	216,90	2,00
EMVS IO-NP4	*	*	235,00	2,10
EMVS IO-NP5	250,30	2,70	238,60	2,30
EMVS IO-NP6	*	*	216,90	2,00

\*premalo vzorca, dodali PBS

Ustrezna velikost eritrocitnih membran se giblje med 100–200 nm, da lahko v te enkapsuliramo majhne magnetne nanodelce.

Velikost naših EMVs IO-NP se giblje med 200–250 nm, kar je v našem eksperimentu še sprejemljivo. Namreč ob dodatku samih magnetnih nanodelcev se minimalno razširijo za 5 nm, kar je ciljna velikost teh. Ob sami analizi TEM slik pa bomo opazili, da sé njihova velikost giblje med 7–11 nm.

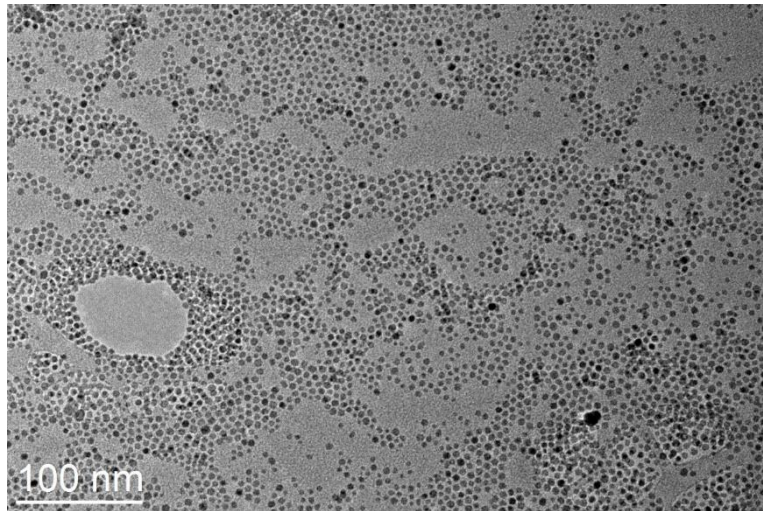
Napaka pri pripravi eritrocitnih membran bi bila, če bi ti presegali 300 nm. Ti ne bi delovali kot zanesljiva sredstva za dostavo zdravil, lahko bi prišlo do zamašitve žil.

### 4.2 TEM Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NANODELCEV IO

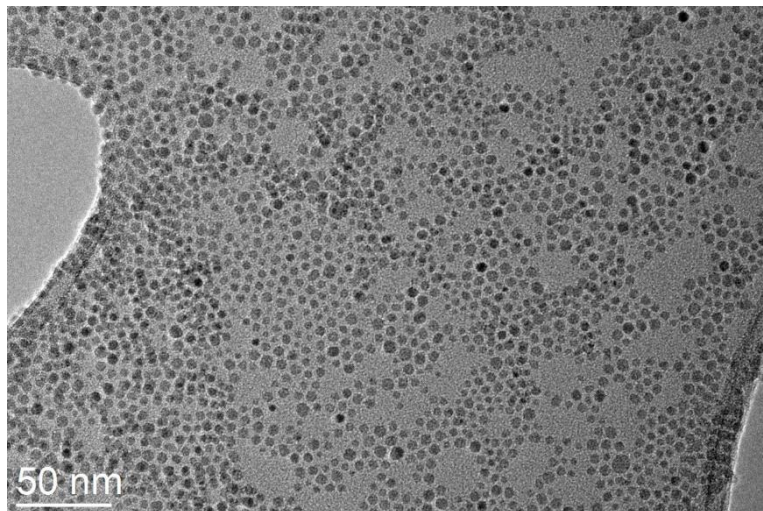
S pomočjo TEM smo pri različnih povečavah pridobili naslednje rezultate oz. slike:

Temperatura pri tej sintezi ni bila kontrolirana:

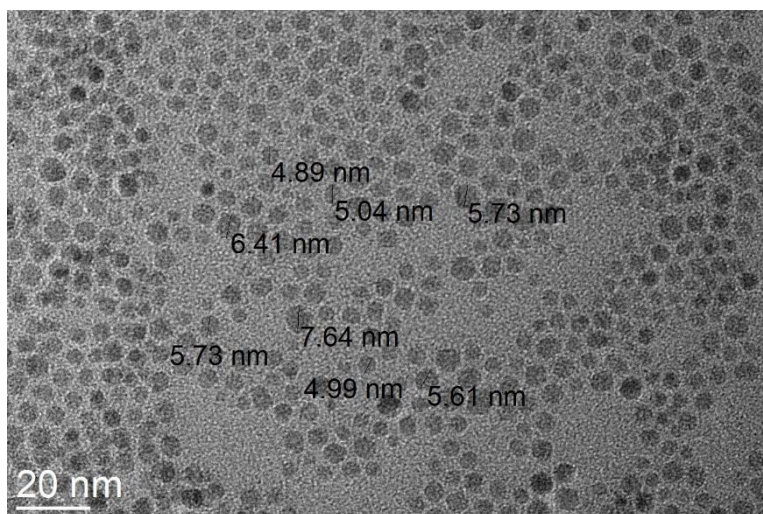




Slika 28: Povečava 40.000x (Kostevšek, 2023)

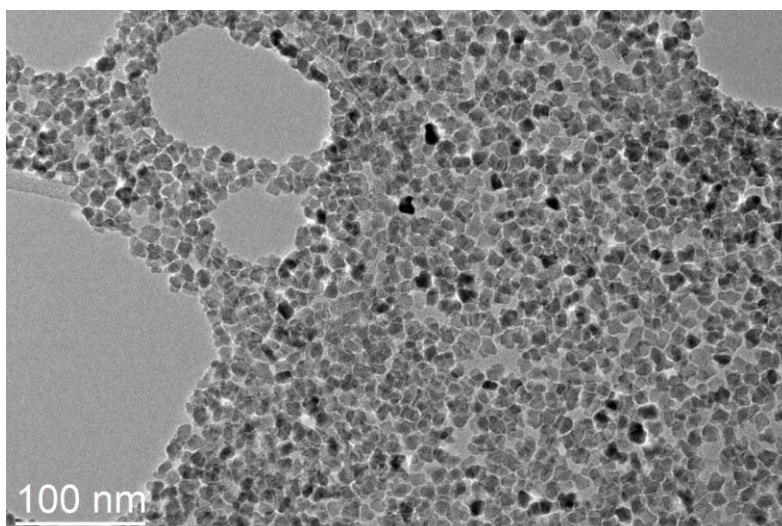


Slika 29: Povečava 60.000x (Kostevšek, 2023)

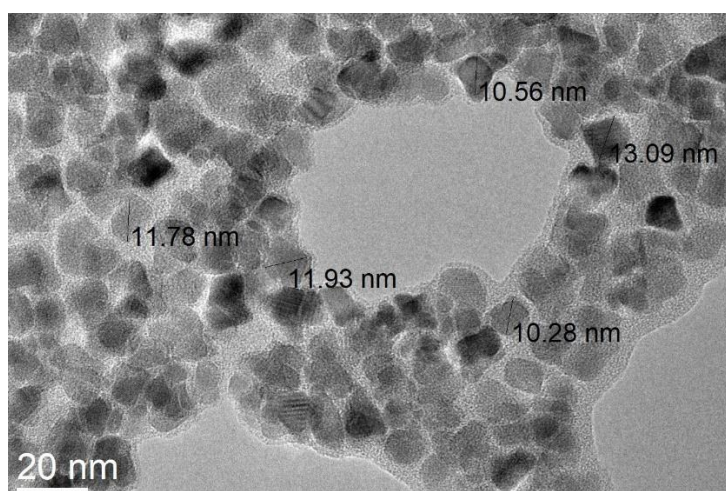


Slika 30: Povečava 120.000x (Kostevšek, 2023)

Temperatura pri tej sintezi je bila kontrolirana (vzorec uporabili za nadaljnji eksperiment):



Slika 31: Povečava 40.000x (Kostevšek, 2023)



Slika 32: Povečava 120.000x (Kostevšek, 2023)

Naš cilj je bil, da so sintetizirani IO-NP čim bolj unidisperzni, uniformni in homogeni, da se doseže njihov maksimalni superparamagnetni učinek. Sam dosežek učinka je bil prav tako pomemben kot velikost IO-NP delcev.

Velikost  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  delcev se giblje do 40 nm ali manj, da preidejo v monodomensko stanje. Ob še večjem zmanjšanju njihove velikosti, 10 nm ali manj, dosežemo superparamagnetizem. Tako je naš želeni učinek odvisen od velikosti magnetnih nanodelcev. Njihovo velikost smo zmanjšali s pomočjo zgoraj opisane metode, imenovane termična dekompozicija prekurzorjev železa, sintetizirali smo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  delce.

Vzorec smo kapnili na bakreno mrežico ter s presevnim elektronskim mikroskopom pridobili pogled v njihovo velikost, prikazano na slikah 30 in 32.



Prvi zastavljeni cilj je bil, da se ti gibljejo med 5 do 10 nm, kjer je zagotovljen superparamagnetni učinek. IO-NP delci, pri katerih temperatura ni bila kontrolirana, so bili manjši in idealnejši.

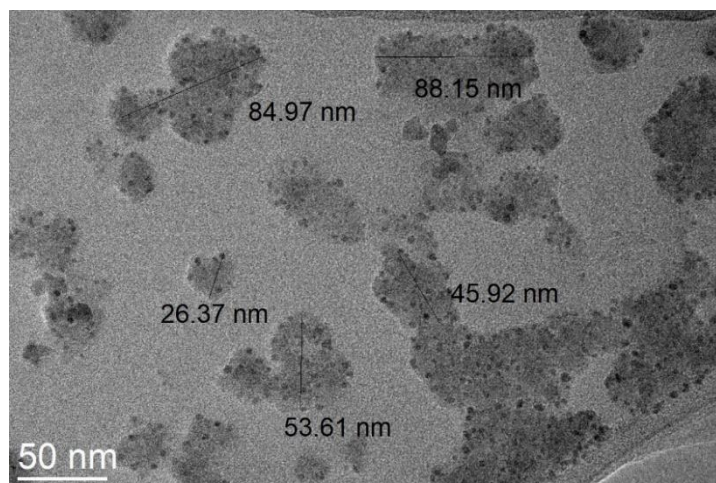
Kontrast delcev na zgornjih slikah (slike 28–32) se razlikuje glede na to, kako so delci obrnjeni ter kako so atomi v tisti ravnini razporejeni oz. zloženi, saj imamo kristalno strukturo, kjer so atomi v eni ravnini gostejše zloženi kot v drugi.

Nanodelci pri kontrolirani temperaturi so bili malo večji. Njihova velikost se je gibala okrog 11 nm z izjemami, ki so zanemarljive.

Naš prvi cilj, sintetizirati magnetne nanodelce, je bil dosežen. Sama sinteza je bila ustrezna. Tako smo lahko nadaljevali eksperiment.

### 4.3 TEM EMVs IO-NP VZORCEV

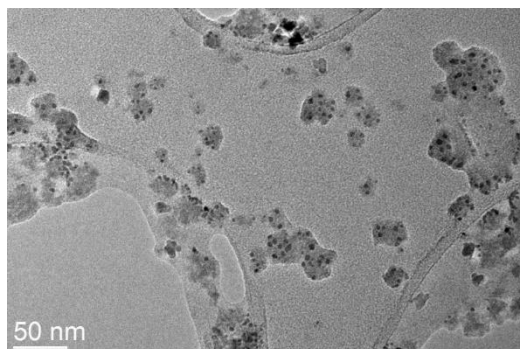
Združili smo vseh 6 EMVs IO-NP vzorcev in vzeli en del vzorca za analizo. Membrane pod elektronskim snopom razpadajo, posledično slika (33 in 34) ni čisto reprezentativna. Črne pike so magnetni nanodelci, ki so lepo razporejeni po membranah.



Slika 33: Povečava 60.000x (Kostevšek, 2023)

S metodo makroemulzacije magnetnih nanodelcev smo pridobili EMVs IO-NP delce, katerih meritev imamo že prikazane v tabeli 1. Velikost pri ZetaPALS predstavlja hidrodinamski premer, ker poleg meritve osnovnega delca zazna tudi organske spojine na njegovi površini, s TEM jih ne zaznamo. Razlika je tudi v tem, da se pri uporabi ZetaPALS izvajajo meritve vzorcev, ki so v naravnem stanju (t. j. v tekočini). Vzorec za TEM smo kapnili na bakrovo mrežico, tako se je ta predhodno posušil in bil v okolju vakuuma. Zato je premer delcev nekoliko manjši pri TEM-u, kakor lahko opazimo na sliki 33, kjer so podane vrednosti različne velikosti EMVs IO-NP.



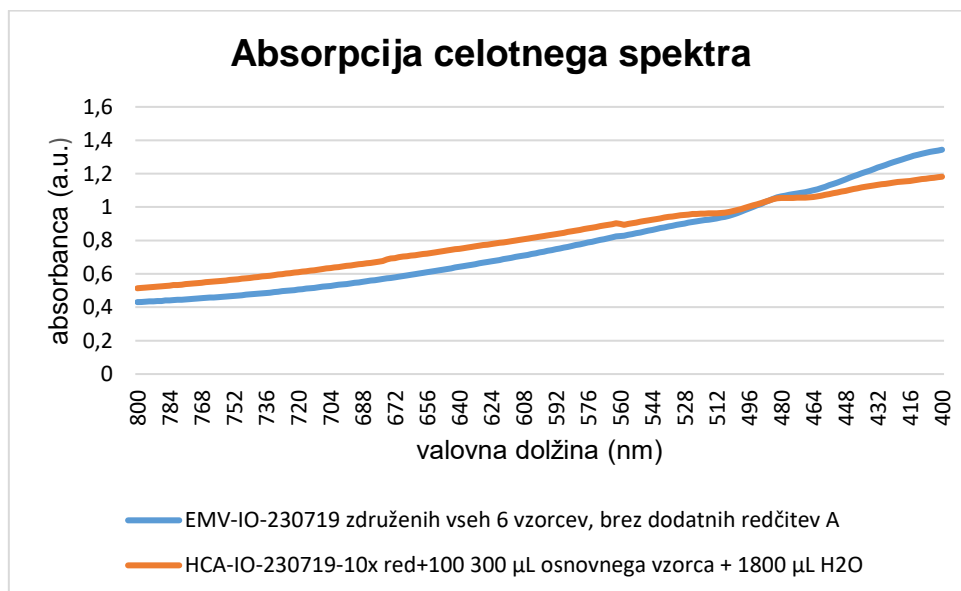


Slika 34: Povečava 50.000x (Kostevšek, 2023)

#### 4.4 ABSORPCIJSKI SPEKTER

Vzorec smo postavili v spektrofotometer, s pomočjo katerega smo izmerili absorpcijska spektra HCA-IO kot EMVs-IO. Sam instrument se uporablja za kvalitativno in kvantitativno analizo organskih in anorganskih spojin z merjenjem njihove absorbance v raztopini pri različnih valovnih dolžinah. [13]

Na grafu 1 imamo prikazano absorpcijo celotnega spektra od 800 nm vse do 400 nm. Opazimo, da pri krajši valovni dolžini narašča absorpcija obeh vzorcev. Za naslednji eksperiment izberemo valovno dolžino, kjer imata oba vzorca enako absorpcijo, to je pri 480 nm, da imamo enako izhodiščno točko.

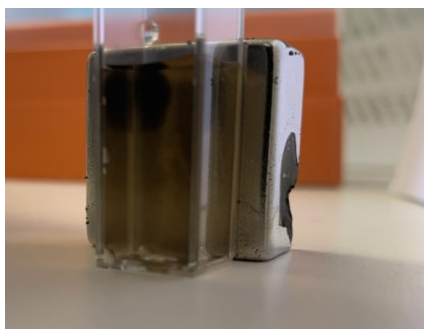


Graf 1: Absorpcija celotnega spektra

## 4.5 PRETOČNI EKSPERIMENT

Pred pričetkom pretočnega eksperimenta smo preverili, ali lahko magnetne nanodelce zadržimo ob zunanjem magnetu brez pretoka. Izvedli smo triminutno opazovanje in zapisali rezultate.

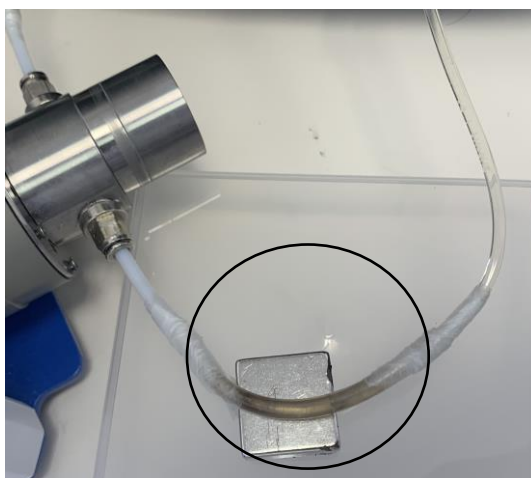
Ob takojšnji postavitvi magneta ni bilo trenutne reakcije. Torej sami magnetni nanodelci so se postopoma začeli zbirati na samem magnetu. Po 1 min je bil rezultat že očitno viden. Ob steni, kjer je bil magnet, je bil viden skupek magnetnih nanodelcev (slika 24). Največji, kakor je bilo pričakovano, je bil po 3 minutah (slika 35), kar dokazuje, da je delce lahko manipulirati z zunanjim magnetnim poljem in jih zadržati na mestu.



*Slika 35: Dokaz superparamagnetizacije (Iršič, 2023)*

Po dokaznem eksperimentu smo v pogon spravili pretočni eksperiment. Bil je simulacija žilnega (arterijskega) sistema.

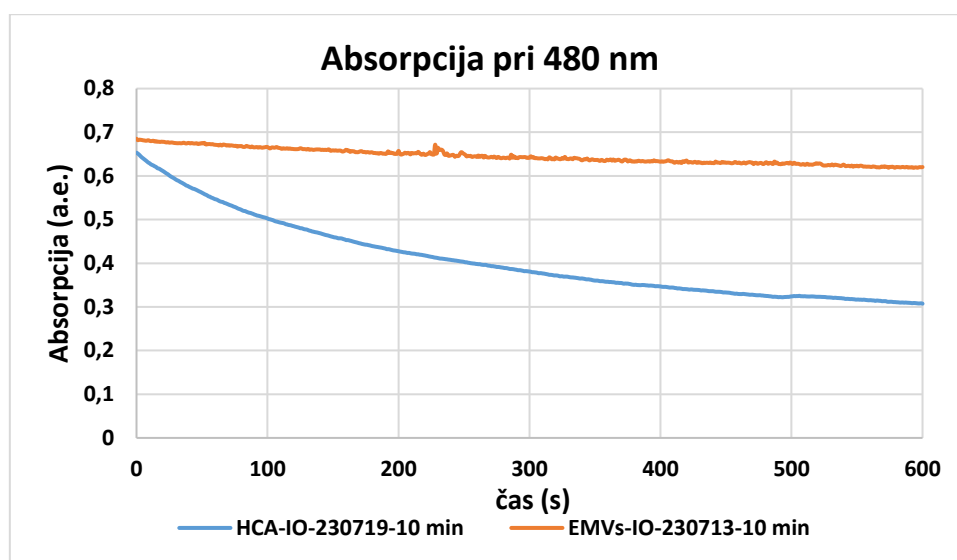
Pri tem delu je bilo opazovanje težje ter dolgotrajnejše, saj je hitrost pretoka moteč dejavnik pri ustavitvi magnetnih nanodelcev pri zunanjem magnetu. Tako smo si pomagali z meritvami absorpcije (graf 2).



*Slika 36: Pretočni eksperiment z zunanjim magnetom (Iršič, 2023)*

S črpalko črpamo vzorec po cevki in na eni strani cevke merimo absorpcijo vzorca. Brez magnetnega polja mora biti konstantna, ker ni izgube nanodelcev, ki prispevajo k absorpciji. Nato na drug konec cevke damo magnet, ki delce zadrži na enem delu, s čimer se koncentracija delcev na drugem delu cevke, ker merimo absorpcijo, zmanjšuje. S tem dokažemo, da lahko delce lokalno zadržimo z magnetom in tudi iz padca absorpcije kvantitativno izračunamo koliko delcev smo zadržali (%).

Meritve absorpcije pri 480 nm za vzorca HCA-IO in EMVs-IO na grafu 2. Modra črta predstavlja močno padanje absorpcije pri 480 nm HCA-IO s časom (10 min). Medtem ko pri oranžni opazimo le rahlo padanje absorpcije EMVs-IO s časom.



Graf 2: Absorpcija v odvisnosti od časa

Opazovanje pri tem eksperimentu ni bilo nemogoče. Namreč ob postavljen zunanem magnetu smo lahko opazili temno obarvanje, kar dokazuje, da so se na tem mestu začeli nabirati magnetni nanodelci (slika 36). Vse dokazuje, da je pretočni eksperiment uspel.

## 5 ZAKLJUČEK

Pred začetkom izvajanja raziskovalne naloge smo si postavili 2 hipotezi: a) da lahko magnetne nanodelce enkapsuliramo v eritrocitne membrane, katerih skupna velikost ne bo presegla 200-300 nm in b) da jih lahko manipuliramo z uporabo zunanega magnetnega polja, to je, zadržimo na želenem mestu.

Najprej smo sintetizirali magnetne nanodelce z velikostjo pod 25 nm, da izkazujejo superparamagnetne lastnosti. S sintezo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  smo dosegli, da so ti čimbolj monodisperzni, uniformni in homogeni. Nato smo jih enkapsulirali v eritrocitne membrane, velikosti 100–200 nm.

Za primerjavo smo morali magnetne nanodelce dispergirati v vodi, zato smo jih prevlekli s hidrokofeinsko kislino. Osnovni delci so bili namreč zaradi oleinske kisline in oleilamina na površini stabilni le v organskih topilih. Hkrati smo lahko uspeh sinteze preverili s TEM slikami, ki so nam podale velikosti magnetnih nanodelcev. Idealna in ciljna velikost je bila okrog 5 nm, naši so bili malenkost večji med 7 do 11 nm, samo odstopanje je zanemarljivo.

Sledila je priprava eritrocitnih membran, ki smo jim zmanjšali velikost s pomočjo Avanti Polar Mini Extruder-ja, s pomočjo katerega je velikost iz 7  $\mu\text{m}$  padla na 100–200 nm. Ob dodatku IO-NP je velikost teh narastla, kar je seveda razumljivo. Namreč v eritrocitno membrano je vstopilo več magnetnih nanodelcev. Velikosti, prikazane v tabeli 1, so v mejah normalnih vrednosti, namreč napaka v eksperimentu bi se pojavila, če bi ti presegali velikost 300 nm. V samem telesu, natančneje v žilah, premer teh znaša 800  $\mu\text{m}$ . Tako se lahko na določenem mestu zbere več EMVs IO-NP, katerih prevelika velikost bi onemogočila prehajanje krvi.

Prvo hipotezo lahko le delno potrdimo, saj nismo 100 % prepričani, da sami magnetni nanodelci, ki smo jih zakamuflirali, ne bi bili prepoznani kot tujek telesu.

Drugo hipotezo lahko popolnoma potrdimo. S postavitvijo magnetna ob epruveto dokažemo, da so  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  delci magnetni, saj so se zbrali ob magnetu. Nato smo pokazali tudi, da smo lahko magnetne nanodelce in delce v membranah zadržali med cirkuliranjem z uporabo zunanega magnetnega polja (magneta). Tega nismo potrdili le z opazovanjem, ampak tudi z meritvami absorpcije. Ta je s časom padala, saj je bilo v vzorcu vedno manj magnetnih nanodelcev, ki bi preprečevali prehod svetlobe, namreč začeli so se zadrževati ob zunanjem magnetnemu polju. Več delcev v enakem časovnem obdobju smo lahko zadržali z magnetom v primeru nanodelcev samih, v primeru, ko smo jih enkapsulirali v eritrocitne membrane, pa je bilo zadržanih delcev manj. To lahko pripišemo dejstvu, da so v eritrocitnih membranah delci ločeni med seboj in je njihov neto magnetni moment manjši, kot če bi bili v skupkih, kar pomeni, da ima zunanje magnetno polje šibkejši vpliv na njih. Ko imamo samo magnetne nanodelce, pride do tvorbe skupkov, kar povzroči, da je njihov neto magnetni moment višji, zato jih lahko več

zadržimo na mestu. Iz tega smo se naučili, da bi bilo idealno v eritrocitne membrane enkapsulirati manjše skupke delcev, kar bi potem lahko bolj učinkovito vodili z zunanjim magnetnim poljem.

Namen raziskovalne naloge je bil uporabiti magnetne nanodelce kot nosilce za zdravila, pri čemer ti ne bi izzvali imunskega odziva. Sami magnetni nanodelci so že dejavni pri magnetni resonanci zaradi njihove idealnega obnašanja ob prisotnosti zunanjega magnetnega polja, tako bi jih bilo smiselno uporabiti na več področjih medicine, kar pa lahko dosežemo le z raziskovanjem.

Pomembno je, da v medicini oz. zdravstvu iščemo nove alternative, ki bi pripomogle pri zdravljenju določenih bolezni. Sama naloga mi je odprla obzorje, kako so lahko pomembni vsakdanji materiali višek medicine v prihodnosti. Vidim še seveda veliko možnosti, kako bi lahko raziskovalno nalogo nadaljevala, recimo s testiranjem na celicah, kasneje živalih, pri čemer je potrebno imeti že obilo znanja iz kemije in biologije.

## 6 VIRI IN LITERATURA

- [1] Gole, Rene. SINTEZA  $Mg_{1+x}Fe_{2-2x}Ti_xO_4$  NANODELCEV Z MIKROEMULZIJSKO TEHNIKO. 2019 [online]. Pridobljeno 10. 1. 2024 na spletnem mestu: <https://dk.um.si/Dokument.php?id=136080&lang=slv>.
- [2] Bužan Bobnar, Andreja. Spinelni superparamagnetni nanodelci in njihova uporaba v magnetni hipertermiji. 2020 [online]. Pridobljeno 10. 1. 2024 na spletnem naslovu: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=139474&lang=slv>.
- [3] Katja Kozjek, Mateja Vesel, Benja Režonja, Veronika Hladnik, Jure Aplinc in Urška Tomšič. Magnet v vodi. 2009 [online]. Pridobljeno 10. 1. 2024 na spletnem naslovu: [http://projlab.fmf.uni-lj.si/arhiv/2009\\_10/naloge/izdelki/magnet\\_v\\_vodi/teorija.html](http://projlab.fmf.uni-lj.si/arhiv/2009_10/naloge/izdelki/magnet_v_vodi/teorija.html).
- [4] A. B. Bobnar: SUPERPARAMAGNETNI NANODELCI IN NJIHOVA UPORABA V. 2018, 5, 1–19.
- [5] Vitalium s.p. Biokompatibilnost. 2010-2012 [online]. Pridobljeno 10. 1. 2024 na spletnem naslovu: <http://www.vitalium.si/kakovost-pred-kolicino/bikompatibilnost>.
- [6] L. Rao, L. L. Bu, J. H. Xu, B. Cai, G. T. Yu, X. Yu, Z. He, Q. Huang, A. Li, S. S. Guo, et al.: Red Blood Cell Membrane as a Biomimetic Nanocoating for Prolonged Circulation Time and Reduced Accelerated Blood Clearance. *Small* 2015, 11, 6225– 6236.
- [7] S. M. Dadfar, K. Roemhild, N. I. Drude, S. von Stillfried, R. Knüchel, F. Kiessling, T. Lammers: Iron Oxide Nanoparticles: Diagnostic, Therapeutic and Theranostic Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2019, 138, 302–325.
- [8] Torchilin V.P. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 2, 145–160.
- [9] Novak, Peter. Sinteza in funkcionalizacija superparamagnetnih nanodelcev za biološke aplikacije. 2008 [online]. Pridobljeno 10. 1. 2024 na spletnem naslovu: [http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/biologija/dn\\_novak\\_peter.pdf](http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/biologija/dn_novak_peter.pdf).
- [10] Kostevšek Nina, Guanglong Ma, Ilaria Monaco, Amalia Ruiz, Boštjan Markelc, Calvin CL Cheung, Samo Hudoklin, Mateja E. Kreft, Hatem AFM Hassan, Matthew Barker <sup>a</sup>, Jamie Conyard <sup>f</sup>, Christopher Hall <sup>f</sup>, Stephen Meech <sup>f</sup>, Andrew G. Mayes, Igor Serša, Maja Čemažar, Katarina Marković, Janez Ščančar, Mauro Comes Franchini, Wafa T. Al-Jamal. Blokada PD1 potencira terapevtsko učinkovitost fototermalno aktiviranih in z MRI vodenih nizkotemperaturno občutljivih magnetoliposomov. 2021 [online]. Pridobljeno 18.1.2024 na spletni strani: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365921001139?via%3Dihub> (str. 419-433).
- [11] S. De Oliveira, C. Saldanha: An Overview about Erythrocyte Membrane. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010, 44, 63–74.

- [12] Tetrahidrofuran. 2023 [online]. Wikipedia. Pridobljeno na spletni strani 10. 1. 2024: <https://en.wikipedia.org/wiki/Tetrahydrofuran>.
- [13] Egart, Mateja. UV-VIS SPEKTROFOTOMETER. 2014 [online]. Pridobljeno 10. 1.2 024 na spletnem naslovu: [https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FT/Oprema/UV-VIS\\_spektrofotometer.pdf](https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FT/Oprema/UV-VIS_spektrofotometer.pdf).
- [14] N. Y. Ryabova, M. A. Kiselev, A. M. Balagurov: Influence of Cholesterol and Ceramide VI on the Structure of Multilamellar Lipid Membranes at Water Exchange. *Crystallogr. Reports* 2010, 55, 479–487.
- [15] N. Kostevšek: A Review on the Optimal Design of Magnetic Nanoparticle-Based T2 MRI Contrast Agents. *Magnetochemistry* 2020, 6, 11.