

**Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza z ultracienkimi warstwami polimerowymi,  
sposób ich wytwarzania i zastosowanie**

5 Dziedzina techniki

Wynalazek dotyczy superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (ang. *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*, SPION) z ultracienkimi warstwami polimerowymi zbudowanych z superparamagnetycznych rdzeni z tlenków żelaza współstrąconych z polikationem oraz hydrofilowej powłoki złożonej z ultracienkich warstw polielektrolitów, zwiększającej biokompatybilność oraz relaksacyjność całej struktury w środowisku wodnym. Przedmiotem wynalazku są również opisane wyżej nanocząstki tlenku żelaza, których hydrofilowa powłoka została sfunkcjonalizowana sondą fluorescencyjną, związkami gadolinu, przeciwciałami, aptamerami przeciwciał lub warstwą polielektrolitu posiadającego fluorowane grupy. Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza w wyniku współstrącenia nanocząstek z polikationem. Wynalazek dotyczy także zastosowania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza do diagnostyki technikami magnetycznego rezonansu jądrowego oraz mikroskopii fluorescencyjnej.

Stan techniki

20 Stosowane powszechnie w obrazowaniu prowadzonym przy użyciu techniki rezonansu magnetycznego (dalej: MRI) środki kontrastowe zawierają kompleksy jonów gadolinowych (Gerald 2009), co sprawia, że podawany kontrast jest toksyczny i wymaga szybkiego usunięcia z organizmu po przeprowadzonym badaniu. Stosowanie tych preparatów może także prowadzić do rozwoju chorób n. nefrogennego włóknienia układowego, szczególnie

25 u pacjentów cierpiących na ostrą niewydolność nerek. Poszukiwane są zatem inne substancje, które działając jako środki kontrastowe, będą jednocześnie bezpieczne do stosowania u ludzi i zwierząt. Superparamagnetyczne nanocząstki według wynalazku stanowią alternatywę dla obecnie stosowanych środków kontrastowych. Właściwości magnetyczne tych cząstek pozwalają na ograniczenie minimalnej dawki preparatu, którą należy wprowadzić do

30 organizmu pacjenta celem uzyskania podobnego efektu obrazowania jak ten otrzymywany w przypadku stosowanych obecnie substancji paramagnetycznych.

Istnieje wiele metod syntezy superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (Tartaj 2003, Teja 2009, Laurent 2008, Tartaj 2005), jednakże do zastosowań biologicznych najczęściej wykorzystywana jest metoda współstrącania z roztworów wodnych soli żelaza. Zaletami tej metody są: prostota jej wykonania, wysoka wydajność oraz łatwe procedury izolowania materiału, a następnie jego dalszej modyfikacji lub przenoszenia do fazy wodnej. Ograniczeniem metod dostępnych w stanie techniki jest często występująca agregacja otrzymanych nanocząstek. W celu stabilizacji uzyskanych struktur, powierzchnię cząstek pokrywa się m.in. polimerowymi lub małowcząsteczkowymi stabilizatorami (Laurent 2008, Gupta 2005). Dodatkowo, asymilacja superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza przez organizm bądź wywołane przez nie reakcje immunologiczne zależą przede wszystkim od rozmiaru nanocząstek. Cząstki o rozmiarze większym od 200 nm są wychwytywane w śledzionie, a następnie usuwane przez komórki układu fagocytarnego. Natomiast superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza o średnicach mniejszych od 10 nm są szybko usuwane z organizmu przez nerki. Zjawiska te skutkują skróceniem czasu cyrkulacji nanocząstek we krwi.

Dla przezwyciężenia wyżej opisanych barier, w rozwiązaniu według wynalazku stosuje się superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza podawane dożylnie o rozmiarze od 10 nm do 200 nm. Nanocząstki tych rozmiarów charakteryzują się najdłuższym czasem cyrkulacji w krwiobiegu. Są one na tyle małe, że zostają pominięte przez komórki układu fagocytarnego, dzięki czemu mogą penetrować głębiej, nawet do małych naczyń włosowatych, co pozwala na osiągnięcie efektywnego rozmieszczenia superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza w docelowych tkankach. Zatem dla zastosowań biomedycznych istotne jest uzyskanie cząstek o małych rozmiarach oraz niskim stopniu ich polidispersji. Dodatkowo, środki kontrastowe powinny być biokompatybilne, najlepiej biodegradowalne oraz selektywne tzn. charakteryzować się zdolnością do selektywnego wiązania się z określonymi tkankami/komórkami organizmu. Pokrycie nanocząstek odpowiednimi materiałami (opłaszczanie) zwiększa ich biokompatybilność, ale również umożliwia przeprowadzenie odpowiednich modyfikacji chemicznych, przyłączanie wybranych przeciwciał itp. celem zapewnienia wspomnianej selektywności lokowania się w określonych tkankach organizmu (Laurent 2008).

Znane są w stanie techniki kontrasty zawierające bardzo małe superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza oraz superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (np. ferumoxides, FeREX, czy też ferumoxtran-10) opłaszczane głównie dekstranem lub jego pochodnymi (Gerald 2009, Laurent 2008). Dekstran tonaturalny, biokompatybilny polisacharyd o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej zawierający najczęściej pewien udział łańcuchów rozgałęzionych. Zastosowanie dekstranów przypadku kontrastów dostępnych w stanie techniki ma jednak pewne wady. W procesie opłaszczania w jednej strukturze polimerowej zamykanych jest razem wiele nanocząstek, co prowadzi do uzyskania układów o rozmiarach nawet mikrometrycznych i dużym rozkładzie ich rozmiarów. Takie cząstki są

łatwiej wychwytywane przez makrofagi w organizmie, a to skraca czas cyrkulacji kontrastu we krwi. Ponadto duży stosunek masy polimeru do masy nanocząstek skutkuje obniżeniem właściwości magnetycznych kontrastu, co powoduje konieczność zwiększenia efektywnej dawki podawanej pacjentowi przed wykonaniem badań diagnostycznych techniką MRI.

- 5 Wiązanie nanocząstek z warstwą polimeru jest często słabe. W przypadku dekstranu rozcieńczanie prowadzi do desorpcji polimeru z powierzchni nanocząstek, co skutkuje ich agregacją i łatwiejszym wychwytywaniem przez układ immunologiczny (Laurent 2008). Ponadto, pokrycia dekstranowe są niekorzystne także ze względu na występujące w organizmie przeciwciała antydekstranowe. Podanie zatem kontrastu zawierającego dekstran  
10 może indukować cytotoksyczność (Yuan 2008).

- W celu wyeliminowania ww. barier, w związku z wynalazkiem proponuje się zastąpienie dekstranu innym polisacharydem, a mianowicie chitozaniem i jego pochodnymi. Chitozan jest polimerem nietoksycznym, biokompatybilnym i biodegradowalnym. Pozyskuje się go w procesie deacetylacji chityny, której źródłem są skorupy krabów, krewetek lub  
15 kalmarów. Makrocząsteczki chitozanu zawierają, podobnie jak dekstran, grupy -OH, ale także grupy-NH<sub>2</sub>, co znacząco poszerza możliwości modyfikacji chitozanu. Niestety, jest on dobrze rozpuszczalny tylko w kwaśnym środowisku, w którym zachodzi protonacja grup aminowych. Może to stanowić istotne ograniczenie w zastosowaniu niemodyfikowanego chitozanu, np. w warunkach obojętnego pH (dla krwi ludzkiej pH=7,4). Chitozan znalazł już zastosowanie  
20 w dostarczaniu insuliny (Agnihotri 2004). Jest on również wykorzystywany jako składnik bandaży i innych środków opatrunkowych. Kolejną zaletą chitozanu w porównaniu z innymi naturalnymi polisacharydami jest jego zdolność do chelatowania jonów metali, w wyniku czego powstają trwałe połączenia metal-polimer (Yuan 2008). Z powodzeniem może być on zatem stosowany do stabilizowania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza,  
25 a także może stanowić punkt wyjścia do dalszej selektywnej modyfikacji pokrytych nim nanocząstek.

- Polimery, takie jak dekstran i chitozan, zaliczane są do grupy polimerów hydrofilowych. Stanowią one zatem materiał przepuszczalny dla wody, co w kontekście wynalazku stanowi znaczącą zaletę. Pokrycie bowiem superparamagnetycznych rdzeni powłoką z ultracienkich  
30 warstw pochodnych chitozanu lub heparyny przyczynia się do przenikania cząsteczek wody przez powłokę, bliżej rdzeni. Dodatkowo dyfuzja tych cząsteczek jest spowalniana przez tą powłokę (Kwak 2003), a zatem kontakt cząsteczki wody z superparamagnetycznym rdzeniem jest dłuższy, a to przekłada się na poprawę właściwości magnetycznych na skutek wzrostu relaksacyjności poprzecznej  $r_2$ .

### 35 Szczegółowy opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza z ultracienkimi warstwami polimerowymi charakteryzujące się tym, że składają się

z superparamagnetycznych rdzeni z tlenków żelaza współstrąconych z polikationem oraz hydrofilowej powłoki złożonej z przynajmniej jednej ultracienkiej warstwy polielektrolitu.

Korzystnie, gdy pierwsza ultracienka warstwa polielektrolitu, otrzymana w wyniku współstrącenia nanocząstek w obecności polimeru, i kolejne nieparzyste warstwy, nałożone na powierzchnię otrzymanych nanocząstek, składają się z polikationu. Szczególnie korzystnie, 5  
gdy polikation wybrany jest z grupy obejmującej naturalne lub modyfikowane polisacharydy zawierające dodatnio naładowane grupy, takie jak: amoniowe, pirydyniowe czy fosfoniowe, a najkorzystniej, gdy polikation to chitozan modyfikowany grupami amoniowymi.

Równie korzystnie, gdy druga ultracienka warstwa polielektrolitu i kolejne parzyste 10  
warstwy składają się z polianionu. Szczególnie korzystnie, gdy polianion to polimer z grupy obejmującej naturalne lub modyfikowane polisacharydy zawierające ujemnie naładowane grupy funkcyjne, takie jak: sulfonowe, siarczanowe, karboksylowe czy fosforanowe, w tym najkorzystniej, gdy polianion to polimer stanowiący pochodną anionowa chitozanu lub heparyna, a w szczególności karboksymetylochitozan modyfikowany kompleksem 15  
trójtlenkusiarki lub heparyna.

Korzystnie, gdy nanocząstki tworzą zawiesinę w fazie wodnej. Równie korzystnie gdy nanocząstki są opłaszczane taką liczbą powłok, że ich średnia wielkość wynosi 5-200nm i/lub 18  
średnica rdzenia z tlenku żelaza wnosi 5-20 nm i/lub grubość polimerowej powłoki wynosi 0,1-100 nm.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest zwiększenie biokompatybilności oraz 20  
relaksacyjności całej struktury nanocząstki w środowisku wodnym związane z występowaniem powłoki złożonej z ultracienkich warstw polielektrolitów. Warstwa polikationu składająca się z chitozanu modyfikowanego grupami amoniowymi nadaje nanocząstce trwały ładunek dodatni, a kolejna nałożona warstwa polielektrolitu nadaje nanocząstce trwały ładunek ujemny. 25  
Wpływa to m.in. korzystnie na stabilność zawiesin nanocząstek w wodzie.

W korzystnym przykładzie realizacji superparamagnetyczne nanocząstki charakteryzują się tym, że powłoka hydrofilowa jest funkcjonalizowana poprzez dotychczas 30  
do niej sondy fluorescencyjnej i/lub związku gadolinu i/lub przeciwciała/lub aptamerów przeciwciała i/lub warstw polielektrolitu posiadającego grupy fluorowane.

Szczególnie korzystnie, gdy sonda fluorescencyjna jest wybrana z grupy obejmującej: 30  
fluoreskaminy, fluoresceiny, cyjaniny, rodaminy lub funkcjonalizowane kropki kwantowe.

Równie korzystnie, gdy związek gadolinu jest wybrany z grupy obejmującej: chelat jonów gadolinowych z kwasem dietylenotriaminopentaoctowym (DTPA) lub kwasem 35  
etylenodiaminotetraoctowym (EDTA).

Równie korzystnie, gdy przeciwciało jest wybrane z grupy obejmującej: przeciwciała 35  
monoklonalne przeciw cząsteczkom adhezji komórkowej, w tym w szczególności VCAM-1,

przeciw selektynie P lub przeciw selektynie E.

Równie korzystnie, gdy aptamery przeciwciał są wybrane z grupy obejmującej: aptamery przeciwciał monoklonalnych przeciw cząsteczkom adhezji komórkowej czy przeciw selektynie P bądź przeciw selektynie E.

- 5 Równie korzystnie, gdy warstwypolielektrolitu posiadające grupy fluorowane stanowi poli(chlorek N,N-dimetylo-N-4'-winylobenzylo-N-2-(perfluorooktanoilo-N'-metyloimino)etyloamoniowy)-co-(chlorek N,N,N-trimetylo-N-4'-winylobenzyloamoniowy) (AK-St-F).

10 Zaletą superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza będących przedmiotem wynalazku, które są pokryte chitozanem modyfikowanym kationowo oraz w kolejnym etapie karboksymetylochitozanem modyfikowanym anionowo trójtlenkiem siarki, jest niewielki rozmiar, niski stopień polidispersji rozmiarów, trwałe ładunek powierzchniowy, stabilność w wodzie oraz znacznie lepsze właściwościami magnetyczne (relaksacyjności) niż dostępne w stanie techniki środki kontrastowe.

- 15 Otrzymana zawiesina nanocząstek może znaleźć szereg zastosowań biomedycznych. Wymienione wyżej zalety nanocząstek pozwalają na stosowanie ich jako środka kontrastowego w mniejszych dawkach (niższe stężenie żelaza) dla zapewnienia identycznego efektu w obrazie MRI, jak ten uzyskiwany przy użyciu innych dostępnych środków kontrastowych. Wprowadzenie gadolinu na powierzchnię SPION pozwala uzyskiwać obrazy nie  
20 tylko T2-zależne, ze względu na obecność tlenku żelaza w strukturze, ale również T1-zależne, co znacznie poprawia kontrast pomiędzy zbieranymi skanami. Gadolin w postaci kompleksów kationów  $Gd^{3+}$  z DTPA lub EDTA wprowadza się na powierzchnię nanocząstek poprzez przyłączanie tych grup chelatujących zarówno do powierzchni polimerowej naładowanej dodatnio jak i ujemnie. Pokrycie natomiast warstwą polielektrolitu posiadającego fluorowane  
25 grupy pozwala wykorzystać tak zmodyfikowane nanocząstki jako równoczesne środki kontrastowe w obrazowaniu  $^1H$  NMR oraz  $^{19}F$  NMR, co ze względu na wysoką odpowiedź jąder fluoru w tego typu badaniach również ułatwia śledzenie zmian w uzyskiwanych obrazach. Wprowadzenie atomów fluoru na powierzchnię nanocząstek może się odbyć z wykorzystaniem zarówno polimeru kationowego jak i anionowego, tj. bez względu na znak ładunku  
30 powierzchniowego modyfikowanych nanocząstek. Pokrycie warstwą heparyny pozwala m.in. na lepsze różnicowanie zdolności obrazowania zmian miażdżycowych śródbłonna. Przyłączenie do powierzchni SPION konkretnego przeciwciała lub aptameru przeciwciała skutkuje natomiast specyficznym wiązaniem nanocząstek z wybraną tkanką/komórką ciała ludzkiego, w tym np. zmienioną zapalnie ścianą naczynia krwionośnego, co również poprawia jakość  
35 uzyskiwanych zdjęć MRI. Wprowadzenie sondy fluorescencyjnej na powierzchnię SPION daje natomiast możliwość szerszego wykorzystania nanocząstek w diagnostyce medycznej, gdyż takie sfunkcjonalizowane nanocząstki posłużą jako środek diagnostyczny wykorzystywany równocześnie w obrazowaniu rezonansem magnetycznym jak i mikroskopii

fluorescencyjnej. Zawiesiny superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza po odpowiednim zmodyfikowaniu powierzchni mogą zostać wykorzystane również do oznaczania lub separacji komórek, naprawy tkanek, dostarczania leków, hipertermii czy magnetofekcji.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób wytwarzania superparamagnetycznych nanocząstek według wynalazku charakteryzujący się tym, że wodny roztwórkationowego polisacharydu w stężeniu 0,1-10 g/dm<sup>3</sup> łączy się z solami żelaza(II) i żelaza(III) do osiągnięcia stężenia jonów żelaza 0,001-0,500 mol/dm<sup>3</sup>, a następnie przedmucha się gazem obojętnym i miesza w temperaturze 10-60 °C, a następnie łączy się z zasadą do osiągnięcia przez mieszaninę pH większego niż 8, w którym następuje strącenie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza o trwałym ładunku dodatnim przy jednoczesnym przedmuchiwaniumieszaniny gazem obojętnym i mieszaniu, a po oczyszczeniu superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza o ładunku powierzchniowym dodatnim można pokryć przynajmniej jedną warstwą przeciwnie naładowanego polielektrolitu i/lub sfunkcjonalizować.

W wyniku realizacji sposobu wytwarzania superparamagnetycznych nanocząstek według wynalazku uzyskuje się nanocząstki tlenku żelaza o trwałym ładunku dodatnim.

Korzystnie, gdy wodny roztwórkationowego polisacharydu stanowi amoniowa pochodna chitozanu (np. z chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym). Także korzystnie, gdy stężenie polisacharydu wynosi 0,5-5 g/dm<sup>3</sup>. Równie korzystnie, gdy jako sole żelaza(II) i żelaza(III) stosuje się chlorki żelaza(II) i żelaza(III), a sole żelaza(II) i żelaza(III) są w stosunku molowym równym 1:2 i stężenie jonów żelaza wynosi 0,002-0,200 mol/dm<sup>3</sup>.

Korzystnie także, gdy jako zasadę stosuje się amoniak, a także gdy roztwór kationowego polisacharydu zawierający jony żelaza łączy się z zasadą do osiągnięcia przez mieszaninę pH większego niż 9.

Przy wytwarzaniu superparamagnetycznych nanocząsteczek jako metodę osadzenia polianionu na powierzchni o ładunku dodatnim, jak i odkładania kolejnych warstw przeciwnie naładowanych polielektrolitów, stosuje się metodę elektrostatycznej samoorganizacji typu „warstwa-po-warstwie”.

Zastosowanie silnego polikationu, a nie polianionu, we współstrącaniu z nanocząstkami tlenku żelaza jest nowatorskim podejściem w tej metodzie syntezy. W tym przypadku, proces tworzenia nanocząstek może być kontrolowany dzięki tworzeniu się chelatów polimeru z jonami żelaza, podczas gdy stosowanie polianionów zawierających grupy karboksylowe prowadzi zwykle do tworzenia nierozpuszczalnych soli karboksylowych.

Korzystnie zastosowanie chitozanu modyfikowanego kationowo do opłaszczenia superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza nadaje trwały ładunek dodatni powierzchni nanocząstek, którego wartość jest praktycznie niezależna od pH środowiska, do którego te nanocząstki zostaną wprowadzone, co zapewnia stabilność zawiesiny w wodzie.

Zastosowanie chitozanu modyfikowanego kationowo do opłaszczenia superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pozwala na prowadzenie procesów modyfikacji powierzchni oraz późniejszego stosowania pokrytych polimerem nanocząstek w środowisku wodnym o szerokim zakresie pH, także obojętnym i zasadowym.

- 5           Sposób wytwarzania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych chitozanem modyfikowanym kationowo według wynalazku ma tę zaletę, że odbywa się w środowisku wodnym i przebiega bez użycia rozpuszczalników organicznych i toksycznych prekursorów oraz trudnych do usunięcia surfaktantów.

10           Dodatni ładunek na powierzchni nanocząstek może jednakże powodować agregację składników krwi ludzkiej np. erytrocytów, po wprowadzeniu ich jako środka kontrastowego do krwioobiegu. Celem wyeliminowania tego zjawiska i zapewnienia pełnej biokompatybilności kontrastu, superparamagnetyczne nanocząsteczki tlenku żelaza opłaszczone chitozanem modyfikowanym kationowo według wynalazku, korzystnie pokrywa się karboksymetylo-  
15           chitozanem modyfikowanym anionowo trójtlenkiem siarki (przykład 6) lub heparyną (przykład 8), wykorzystując metodę osadzania polielektrolitów „warstwa-po-warstwie”. Uzyskuje się w ten sposób stabilną zawiesinę superparamagnetycznych nanocząsteczek tlenku żelaza o trwałym ładunku powierzchniowym ujemnym. Możliwa jest łatwa modyfikacja powierzchni nanocząstek będących podstawą wynalazku oraz kontrolowana zmiana ich ładunku  
20           powierzchniowego, a także rozmiaru. Co najważniejsze, proces ten nie prowadzi do zmniejszenia relaksacyjności nanocząstek (przykład 15), która jest istotnym parametrem użytkowym tego wynalazku, a wręcz przeciwnie, zastosowanie polimerów hydrofilowych, którymi są wspomniane wyżej pochodne chitozanu, w postaci powłoki okrywającej superparamagnetyczne rdzenie przyczynia się do znaczącej poprawy tego parametru dla uzyskiwanych zgodnie z wynalazkiem nanocząstek.

- 25           Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie superparamagnetycznych nanocząstek według wynalazku jako środka kontrastowego w obrazowaniu rezonansem magnetycznym i/lub fluorescencyjnym i/lub mikroskopii fluorescencyjnej.

#### Skrótowny opis figur rysunku

30           Przedmiot wynalazku został uwidoczniony w przykładach wykonania na załączonym rysunku, na którym:

- Fig. 1           przedstawia wzór strukturalny makrocząsteczki amoniowej pochodnej chitozanu;  
Fig. 2 i 3       przedstawiają zdjęcia TEM nanocząstekz przykładu 2;  
Fig. 4           przedstawia zdjęcie TEM nanocząstekz przykładu 6;  
35           Fig. 5 i 6       przedstawiają zdjęcia TEM nanocząstek z przykładu 5;  
Fig. 7 i 8       przedstawiają wykresy obrazujące rozkład średnicy rdzeni superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza;

- Fig. 9 przedstawia wykres średnic hydrodynamicznych nanocząstek dla koloidów z przykładów 2, 6 i 7;
- Fig. 10 przedstawia przykładowe zdjęcie przedstawiające płaszczyzny krystalograficzne uzyskane przy użyciu HREM dla nanocząstek z przykładu 2;
- 5 Fig. 11 przedstawia widma IR amoniowej pochodnej chitozanu oraz nanocząsteczek z przykładów 2 i 5;
- Fig. 12 przedstawia zdjęcia z mikroskopu sił magnetycznych dla koloidu z przykładu 2
- Fig. 13 przedstawia wykres podatności magnetycznej nanocząstek z przykładu 2 w funkcji temperatury;
- 10 Fig. 14 przedstawia wykres zależności magnetyzacji ( $M$ ) od indukcji pola magnetycznego ( $\mu_0 H$ ) koloidu z przykładu 2;
- Fig. 15, 16 i 17 przedstawiają preparaty pokazujące oddziaływanie koloidów z przykładów 2 i 6 z krwią ludzką;
- Fig. 18, 19 i 20 przedstawiają termogramy zarejestrowane dla chitozanu modyfikowanego kationowo oraz nanocząstek z przykładów 2 i 5;
- 15 Fig. 21 przedstawia widma wzbudzenia i emisji nanocząstek tlenku żelaza z przyłączoną do powierzchni fluoreskamina;
- Fig. 22 przedstawia mapy MRI z obserwacji *in vivo* wpływu nanocząstek tlenku żelaza z przykładu 5 i 6 na wątrobowe mapy czasu relaksacji  $T_2$ .

## 20 Przykłady realizacji wynalazku

Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza według wynalazku otrzymano w wyniku jednoetapowej metody syntezy, polegającej na współstrąceniu jonów żelaza(II) i żelaza(III) z biokompatybilnym polimerem kationowym, chitozaniem modyfikowanym kationowo. Syntezę chitozanu modyfikowanego kationowo przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną

25 w literaturze (Cho 2006), otrzymując polimer o strukturze przedstawionej na Fig. 1. W przykładach 1-5 zastosowano chitozan modyfikowany kationowo o stopniu podstawienia 95%, wyznaczonym na podstawie widm magnetycznego rezonansu jądrowego (Bulwan 2009).

### *Przykład 1. Synteza superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych chitozaniem modyfikowanym kationowo (ChK)*

30 Do 50 ml roztworu ChK o stężeniu 1g/l w 0,1M NaCl wprowadzono 0,1622 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  i 0,0596 g  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  (stosunek stężeń  $Fe(III):Fe(II) = 2:1$ ) przy pH wynoszącym 1,5. Układ zamknięto, przedmuchując argonem 10 min, sonikowano (sonikator typu SONIC-6 firmy PolSonic), stosując sonikację ciągłą bez chłodzenia układu. Do układu dodano 5 ml 5M  $NH_3$  aq i całość sonikowanododatkowo 30 min przy tych samych warunkach, cały czas przedmuchując

35 argonem. pH mieszaniny po syntezie wyniosło ok. 10. Ciągła sonikacja układu prowadziła do wzrostu temperatury łaźni do ok. 40°C pod koniec procesu. Otrzymaną zawiesinę przefiltrowano przez filtry strzykawkowe o porach 0,2  $\mu m$ . W celu oczyszczenia zawiesiny

5 pokrytych nanocząstek tlenku żelaza z pozostałości reagentów zastosowano chromatografię magnetyczną. Na kolumnę wypełnioną wełną stalową (ferromagnetyczna), do której przyłożono magnesy neodymowe, wprowadzono 5 ml zawiesiny. Na wypełnieniu kolumny osadziły się nanocząstki, które przemyto 3 ml wody dejonizowanej. Po usunięciu magnesów, wypłukano kolumnę wodą dejonizowaną, zbierając oczyszczone nanocząstki.

*Przykład 2. Synteza superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych chitozanem modyfikowanym kationowo z wykorzystaniem sonikacji impulsowej z chłodzeniem.*

10 Postępowano analogicznie jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że zastosowano sonikację impulsową (impuls o długości 1 s co 5 s) oraz chłodzenie układu lodem (temperatura stała w trakcie procesu ok. 20°C) w łaźni ultradźwiękowej.

*Przykład 3. Synteza superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych chitozanem modyfikowanym kationowo z wykorzystaniem sonikacji ciągłej z chłodzeniem.*

15 Postępowano jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że zastosowano sonikację ciągłą z chłodzeniem układu jak w przykładzie 2.

*Przykład 4. Synteza superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych chitozanem modyfikowanym kationowo z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego.*

20 Postępowano jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że zastosowano mieszanie układu przy użyciu mieszadła mechanicznego (mieszadło mechaniczne EUROSTAR powercontrol-visc P1 firmy IKA-WERKE) zamiast sonikacji. Mieszanie wykonywano przy prędkości 300 obr./min.

*Przykład 5. Synteza superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych chitozanem modyfikowanym kationowo z wykorzystaniem sonikacji impulsowej z chłodzeniem i zastosowaniem większego stężenia polimeru.*

25 Postępowano jak w przykładzie 2 z tą różnicą, że zastosowano roztwór ChK o stężeniu 3g/l w 0,1M NaCl.

*Przykład 6. Oplaszczanie przy użyciu karboksymetylochitozanu modyfikowanego anionowo trójtlenkiem siarki (ChA) nanocząstek pokrytych chitozanem modyfikowanym kationowo.*

30 5 ml zawiesiny oczyszczonych superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza oplaszczonych chitozanem modyfikowanym kationowo z przykładu 2 poddano sonikacji przez 5 min. Wprowadzono 20 ml roztworu ChA o stężeniu 1g/l w 0,1M NaCl i kontynuowano sonikację przez 10 min. Oczyszczono zawiesinę nanocząstek pokrytych ChA z nadmiaru polimeru i soli stosując chromatografię magnetyczną jak w przykładzie 1.

*Przykład 7. Oplaszczanie przy użyciu chitozanu modyfikowanego kationowo*

*nanocząstekotrzymanych jak w przykładzie 6, o ładunku powierzchniowym ujemnym.*

4 ml zawiesiny oczyszczonych superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza opłaszczonych ChK, a następnie ChA z przykładu 6 poddano sonikacji przez 5 min. Następnie wprowadzono 10 ml roztworu ChK o stopniu podstawienia 56% i stężeniu 1g/l w 0,1M NaCl, i kontynuowano sonikację jeszcze przez 10 min. Zawiesinę nanocząstek pokrytych ChK/ChA/ChK oczyszczono z nadmiaru polimeru i soli stosując chromatografię magnetyczną jak w przykładzie 1.

*Przykład 8. Opłaszczenie przy użyciu heparyny nanocząstek pokrytych chitozaniem modyfikowanym kationowo.*

10 10 ml zawiesiny z przykładu 5 (do sporządzenia nanocząstek wykorzystano ChK o stopniu podstawienia 56%) sonikowano przez 5 min, stosując sonikację ciągłą. Następnie, cały czas kontynuując sonikację, wprowadzono 10 ml roztworu heparyny o stężeniu 3g/l w 0,2M NaCl. Tak powstałą mieszaninę sonikowano jeszcze 10 min, kontynuując sonikację ciągłą. Oczyszczono zawiesinę nanocząstek pokrytych heparyną z nadmiaru polimeru i soli stosując chromatografię magnetyczną jak w przykładzie 1.

*Przykład 9. Opłaszczenie przy użyciu poli(chlorek N,N-dimetylo-N-4'-winylobenzylo-N-2-(perfluorooktanoilo-N'-metyloimino)etyloamoniowy)-co-(chlorek N,N,N-trimetylo-N-4'-winylobenzyloamoniowy) (AK-St-F) nanocząstek otrzymanych jak w przykładzie 6, o ładunku powierzchniowym ujemnym.*

20 10 ml zawiesiny z przykładu 6 sonikowano przez 5 min, stosując sonikację ciągłą. Następnie, cały czas kontynuując sonikację, wprowadzono 10 ml roztworu AK-St-F o stężeniu 3 g/l w 0,2M NaCl. Tak powstałą mieszaninę sonikowano jeszcze 10 min, kontynuując sonikację ciągłą. Oczyszczono zawiesinę nanocząstek pokrytych AK-St-F z nadmiaru polimeru i soli stosując chromatografię magnetyczną jak w przykładzie 1.

25 *Przykład 10. Oznaczanie żelaza w zawieszynie nanocząstek.*

W celu oznaczenia zawartości żelaza w koloidach uzyskanych według procedury opisanej w przykładach 1-5 wykorzystano metodę spektrofotometryczną opartą na tworzeniu barwnych kompleksów żelaza(II) z fenantroliną. 1 ml badanej próbki zadano 1 ml 1M HCl, podgrzewając w gorącej wodzie w celu rozтворzenia nanocząstek tlenku żelaza. Następnie, w celu redukcji Fe(III) do Fe(II), dodano witaminę C w stosunku molowym 1:1 do teoretycznej zawartości żelaza w badanej próbce. W kolejnym etapie rozcieńczono roztwór 50-krotnie i odpipetowano 6,25 ml do kolby na 25 ml, do której dodano również 3 ml 0,2% roztworu wodzianu 1,10-fenantroliny w 0,08M HCl, po czym uzupełniono wodą dejonizowaną do kreski. Po 10 min zmierzono absorbancję roztworu przy długości fali  $\lambda_{\max} = 512$  nm. Z otrzymanych wartości obliczono zawartość żelaza w otrzymanych koloidach (przykłady 1-5) na podstawie uprzednio wyznaczonej krzywej kalibracyjnej dla różnych stężeń Fe(II). Wyniki te wraz z wydajnością

otrzymywania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza ilustruje Tabela 1.

**Tabela 1**

Koloid z przykładu	cFedośw [mg/ml]	cFeteor [mg/ml]	Wydajność syntezy [%]
1	0,189	0,920	20,5
2	0,220	0,915	24,0
3	0,019	0,918	2,1
4	0,159	0,916	17,4
5	0,365	0,915	39,9

*Przykład 11. Badanie stabilności koloidów w wodzie dejonizowanej.*

Przed wykonaniem pomiarów potencjału zeta próbki koloidów sonikowano przez 5 min.

- 5 Pomiary wykonano na przyrządzie Zetasizer Nano ZS firmy Malvern. Wyniki pomiarów potencjału zeta dla koloidów z przykładów 1-7 zebrano w Tabeli 2.

**Tabela 2**

Koloid z przykładu	Zeta-potencjał [mV]
1	51,2
2	47,3
3	47,0
4	49,3
5	41,8
6	-40,6
7	46,7

- 10 Roztwory koloidalne są stabilne, gdy wartości potencjałów zeta cząstek fazy rozproszonej są mniejsze od -30 mV lub większe od 30 mV. Z danych zgromadzonych w Tabeli 2 wynika, że w wyniku syntezy cząstek wg procedur opisanych w przykładach 1-7 uzyskano stabilne koloidy. Cząstki koloidu uzyskanego jak w przykładzie 6 mają ujemny potencjał zeta, co świadczy o tym, iż zostały one pokryte polimerem anionowym co spowodowało zmianę ładunku powierzchniowego z dodatniego na ujemny. Natomiast cząstki koloidu z przykładu 7 posiadają dodatni potencjał zeta, co świadczy o całkowitym pokryciu polimerem kationowym i odwróceniu ładunku powierzchniowego z ujemnego na dodatni. Eksperyment ten dowodzi, iż opracowany został sposób pozwalający na łatwe, kontrolowane manipulowanie ładunkiem na powierzchni superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza poprzez adsorpcję przeciwnie naładowanych polielektrolitów.
- 15

*Przykład 12. Wyznaczanie rozmiarów rdzeni nanocząstek przy użyciu TEM.*

W celu wyznaczenia wielkości nanocząstek koloidy uzyskane wg procedur opisanych w przykładach 2 i 6 poddano sonikacji przez 2 min. Następnie niewielkie objętości tych roztworów naniesiono na błonki węglowe i pod przykryciem pozostawiono do wyschnięcia. Natomiast w celu zobrazowania nanocząstek wykonanych wg procedury opisanej w przykładzie 5 (do syntezy próbki koloidu z przykładu 5 zastosowano w tym przypadku ChK o stopniu podstawienia 56%, który wyznaczono z widm magnetycznego rezonansu jądrowego) koloid ten poddano liofilizacji, a następnie wysuszone nanocząstki rozpuszczono w metanolu i sonikowano przez 2 min. Tak otrzymany preparat naniesiono na błonkę węglową i pod przykryciem pozostawiono do odparowania rozpuszczalnika. Pomiar wykonano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tecnai G2 F20 (200kV) wyposażonego w działo z emisją polową FEG w jasnym polu oraz trybie wysokorozdzielczym (HREM). Zdjęcia koloidu z przykładu 2 przedstawiono na Fig. 2 i 3, koloid z przykładu 6 obrazuje Fig. 4, natomiast nanocząstki z przykładu 5 przedstawiono na Fig. 5 i 6. Na podstawie zdjęć wykonanych w trybie wysokorozdzielczym wyznaczono średnicę nanocząstek z przykładu 2, natomiast rozmiar superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza z przykładu 6 określono wykorzystując zdjęcia TEM w jasnym polu. Każdorazowo dokonano ok. 100 zliczeń wielkości nanocząstek. Wykresy obrazujące rozkład średnicy superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza przedstawiono na Fig. 7 i 8. Na poszczególnych figurach przedstawiono:

- TEM w jasnym polu nanocząstek z przykładu 2 na Fig. 2,
- HREM nanocząstek z przykładu 2 na Fig. 3,
- TEM w jasnym polu nanocząstek z przykładu 6 na Fig. 4,
- TEM w jasnym polu nanocząstek z przykładu 5 w skali 50 nm na Fig. 5,
- TEM w jasnym polu nanocząstek z przykładu 5 w skali 100 nm na Fig. 6,
- Rozkład wielkości nanocząstek z przykładu 2 na Fig. 7,
- Rozkład wielkości nanocząstek z przykładu 6 na Fig. 8.

Nanocząstki z przykładu 2 mają rozmiar  $11,9 \pm 1,7$  nm, natomiast superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza z przykładu 6 charakteryzują się wielkością  $10,1 \pm 2,9$  nm. Znaczny błąd pomiaru w przypadku nanocząstek z przykładu 6 wynika z tego, że zliczeń dokonywano ze zdjęć wykonanych w jasnym polu (mniej dokładnych), gdyż rodzaj próbki nie pozwolił na uzyskanie dobrych obrazów w wysokiej rozdzielczości. Jak można zauważyć z Fig. 5 i 6, zwiększenie ilości polimeru w trakcie współstrącania powoduje zmniejszenie wielkości powstających nanocząstek; na zdjęciach widoczne obiekty o rozmiarach mniejszych niż 10 nm. Agregaty widoczne na Fig. 2-6 powstały w wyniku wymuszonego procedurą pomiarową suszenia próbek procesu agregacji koloidów.

*Przykład 13. Wyznaczenie średnic hydrodynamicznych nanocząstek.*

W celu wyznaczenia średnic hydrodynamicznych nanocząstek koloidy z przykładów 2, 6 i

7 poddano sonikacji przez 5 min. Pomiaru wykonano na przyrządzie Zetasizer Nano ZS firmy Malvern wykorzystując dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) mierzone przy 173° w temperaturze 25°C. Uzyskane rezultaty przedstawiono na Fig. 9. Rozkłady wielkości średnic hydrodynamicznych nanocząstek w zawiesinie wodnej wskazują, iż nanocząstki z przykładu 2 oscylują wokół 80 nm, SPION z przykładu 6 wokół 70 nm, a SPION z przykładu 7 - 160 nm. W związku z wynikami z przykładu 10 można wnioskować, iż jedna nanocząstka utworzona jest z kilku rdzeni zbudowanych z tlenku żelaza o średnicach ok. 10-12 nm połączonych łańcuchem polimerowym.

*Przykład 14. Określenie struktury krystalograficznej nanocząstek.*

10 Na podstawie zdjęć wykonanych w trybie wysokorozdzielczym nanocząstek z przykładu 2 wyznaczono strukturę krystalograficzną tlenku żelaza tworzącego superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza w syntezach opisanych w przykładach 1-6. Przykładowe zdjęcie przedstawiające płaszczyzny krystalograficzne uzyskane przy użyciu HREM dla koloidu z przykładu 2 zamieszczono na Fig. 10. Wyznaczenia odległości międzyplaszczynowych dokonano również na podstawie transformaty Fouriera otrzymanych obrazów HREM dla 15 przykładu 2. W Tabeli 3 zamieszczono uzyskane odległości międzyplaszczynowe wraz z przypisanymi do nich płaszczyznami dla próbki z przykładu 2.

**Tabela 3**

Odległość międzyplaszczynowa d zmierzona [Å]	Odległość międzyplaszczynowa d dla Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> * [Å]	Wskaźniki Millera dla płaszczyzny
4,82	4,85	111
3,06	2,97	220
2,58	2,53	311
2,80	2,81	221
1,68	1,71	422
1,55	1,56	423

\* Na podstawie wyliczeń wynikających z parametrów komórki elementarnej dla a = 8,396 Å

20 Fig. 10 przedstawia płaszczyzny (220) dla Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Iidaa 2007). Odległości między płaszczyznami krystalograficznymi wynoszą 0,306 nm. Z danych zamieszczonych w Tabeli 3 wynika, iż współstrącanie jonów żelaza(II) i żelaza(III) z chitozanem modyfikowanym kationowo nie zmienia struktury krystalograficznej otrzymanego Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

*Przykład 15. Określenie rodzaju oddziaływań polimeru z powierzchnią nanocząstek.*

25 Aby określić sposób wiązania polimeru z tlenkiem żelaza wykonano widma w podczerwieni dla próbek z przykładów 2 i 5. Płytkę szklaną z warstwą odbijającą (szkło MirrIR firmy Kevley Technologies) przemyto etanolem, a następnie naniesiono na nią po 20 kropeł

zawiesiny nanocząstek z przykładów 2 i 5 (w różnych miejscach) odczekując po każdej kropli aż rozpuszczalnik odparuje. Widma IR nanocząsteczek zilustrowane na Fig. 11 (linia B dla nanocząsteczek z przykładu 5 i C dla nanocząsteczek z przykładu 2) zbierano w trybie transrefleksji na spektrometrze FT-IR Varian 670. Widmo IR czystego chitozanu modyfikowanego kationowo (Fig. 11 linia A) uzyskano badając pastylkę z KBr na spektrometrze z transformatą Fouriera EQUINOX 55 firmy Bruker.

Z widm na Fig. 11 wynika, że pasmo przy  $1601\text{ cm}^{-1}$ , przypisane drganiom I-rzędowej grupy aminowej, zanika dla nanocząstek z przykładów 2 i 5. Wskazuje to na chelatację jonów żelaza z nanocząstek przez grupy aminowe polimeru (Wang 2008). Następuje również przesunięcie pasma drgań rozciągających C-O przy  $1114\text{ cm}^{-1}$  (ChK) do  $1068\text{ cm}^{-1}$  (przykłady 2 i 5), co wskazuje na występowanie oddziaływań także grupy hydroksylowej przy węglu  $C_3$  z nanocząstkami magnetytu (Hernández 2009).

#### *Przykład 16. Obrazowanie właściwości magnetycznych nanocząstek.*

W celu zobrazowania właściwości magnetycznych superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza wykonano pomiary przy użyciu mikroskopii sił magnetycznych. W tym celu wafel krzemowy pocięto na płytki, które umieszczono w roztworze będącym mieszaniną stęż.  $H_2SO_4$  oraz 30%  $H_2O_2$  w stosunku objętościowym 1:1 na 30 min w celu ich oczyszczenia. Płytki oplukano dużą ilością wody destylowanej i wysuszono w strumieniu argonu. Koloid z przykładu 2 sonikowano przez 5 min, a następnie rozcieńczono 10-krotnie.  $10\ \mu\text{l}$  tak przygotowanej próbki naniesiono na wspomniane wyżej płytki, pozostawiono na 15 min., a następnie wysuszono w strumieniu argonu. Pomiar wykonywano przy użyciu mikroskopu sił atomowych zaopatrzonego w kontroler NanoScope IVA (Bruker, USA), wykorzystując ostrze krzemowe pokryte warstwą magnetyczną Co/Cr (Bruker). Pomiaru dokonano w trybie oscylacyjnym (tzw. „tappingmode”) z zastosowaniem trybu tzw. „lift mode” przy obrazowaniu właściwości magnetycznych. Uzyskane zdjęcia z mikroskopu sił magnetycznych dla koloidu z przykładu 2 przedstawiono na Fig. 12 (od lewej: topografia, obrazowanie fazowe, obrazowanie sił magnetycznych). Pomiary magnetyczne wykonano dla różnych odległości pomiędzy ostrzem a badaną próbką (1-75 nm, 2 - 50 nm, 3-25 nm).

Z Fig. 12 wynika, że koloid z przykładu 2 wykazuje właściwości magnetyczne. Świadczą o tym zmiany kontrastu na zdjęciach po prawej stronie wynikające ze zmniejszania odległości pomiędzy ostrzem a próbką (odległość oddziaływania). Oddziaływania magnetyczne są oddziaływaniami dalekiego zasięgu, dlatego są obserwowane nawet przy dużych odległościach ostrze-próbka (1 na Fig. 12 po prawej stronie). Agregaty obserwowane na zdjęciach powstają w wyniku działania tzw. sił kapilarnych w trakcie suszenia próbki.

#### *Przykład 17. Pomiar podatności magnetycznej nanocząstek.*

Celem zbadania podatności magnetycznej koloid z przykładu 2 umieszczono w pojemniku

Lake ShoreCryotronics Inc. o symbolu 700 SC-10 i poddano badaniom. Składową rzeczywistą podatności magnetycznej jako funkcji zmiennoprądowego pola magnetycznego mierzono przy częstotliwości 189 Hz na nanowoltomierzu Stanford SR 830. Podatność magnetyczna w funkcji temperatury została przedstawiona na Fig. 13 w postaci wykresu zależności składowej rzeczywistej podatności magnetycznej od temperatury dla koloidu z przykładu 2.

Podatność magnetyczna zobrazowana na Fig. 13 ma wartość w przybliżeniu stałą równą  $1,4 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Dodatnia wartość podatności wskazuje, iż nanocząstki zbudowane są z paramagnetyku.

*Przykład 18. Pomiary magnetyzacji nanocząstek.*

W celu wyznaczenia zależności magnetyzacji ( $M$ ) od indukcji pola magnetycznego ( $\mu_0 H$ ) koloid z przykładu 2 umieszczono w pojemniku Lake ShoreCryotronics Inc. o symbolu 700 SC-10 i poddano badaniom. Do pomiaru wykorzystano kontroler magnetometru wibracyjnego Lake Shore Model 7300. Próbkę termostatowano w temperaturze 200 K za pomocą kriostatu przepływowego Janis. Wykres powyższej zależności przedstawiono na Fig. 14 (zależność magnetyzacji od indukcji pola magnetycznego dla koloidu z przykładu 2).

Fig. 14 przedstawia typową zależność  $M=f(\mu_0 H)$  dla substancji superparamagnetycznych. Nie jest obserwowana ani zależność liniowa (paramagnetyki) ani nie występuje histereza charakterystyczna dla substancji ferromagnetycznych. Otrzymana wartość magnetyzacji nasycenia  $123 \pm 12 \text{ emu/g Fe}$  jest bliska wartości mierzonej dla magnetytu (Jung 1995), a biorąc pod uwagę całkowitą masę opłaszczonych nanocząstek wartość ta wynosi  $61 \pm 6 \text{ emu/g}$ , co jest porównywalne z wartościami zmierzonymi dla podobnych superparamagnetycznych nanocząstek (Iida 2007).

*Przykład 19. Wyznaczanie relaksacyjności koloidalnych roztworów nanocząstek.*

Pomiarom poddano odpowiednio rozcieńczone wodą dejonizowaną próbki koloidów z przykładów 2, 5 i 6 oraz FeREX-u, komercyjnego środka kontrastowego. Pomiary czasów relaksacji  $T_1$  i  $T_2$  przeprowadzono na doświadczalnym tomografie magnetycznego rezonansu z horyzontalnym magnesem nadprzewodzącym MR 4,7 T firmy Bruker. W celu uzyskania wartości relaksacyjności  $r_1$  i  $r_2$  dla poszczególnych koloidów wykorzystano poniższe zależności:

$$R_1 = \frac{1}{T_1} \quad R_2 = \frac{1}{T_2}$$

$$R_1 = R_1^0 + r_1 \cdot c_{Fe} \quad R_2 = R_2^0 + r_2 \cdot c_{Fe}$$

gdzie:  $R_1$  ( $R_2$ ) - stopień relaksacji podłużnej (poprzecznej);

$T_1$  ( $T_2$ ) - czas relaksacji podłużnej (poprzecznej);

$R_1^0$  ( $R_2^0$ ) - stopień relaksacji podłużnej (poprzecznej) dla próbki bez środka kontrastowego;

$r_1$  ( $r_2$ ) - relaksacyjność dla relaksacji podłużnej (poprzecznej);  
 $c_{Fe}$  - stężenie żelaza w badanym środku kontrastowym.

Wyniki zamieszczono w Tabeli 4 przedstawiającej relaksacyjności koloidów z przykładów 2, 5 i 6 oraz FeREX-u.

5

Tabela 4

	$c_{Fe}$ [µg/ml]	$T_1$ [ms]	$T_2$ [ms]	$R_1$ [1/s]	$R_2$ [1/s]	$r_1$ [s <sup>-1</sup> (µg/ml) <sup>-1</sup> ]	$r_2$ [s <sup>-1</sup> (µg/ml) <sup>-1</sup> ]
woda dejonizowana	0	3945,535	3367,175	0,253	0,297		
Koloid z przykładu 2	2,20	2905,722	106,471	0,344	9,392	0,036 ± 0,008	4,1 ± 0,7
	1,10	3355,022	336,797	0,298	2,969		
	0,22	3476,840	1071,545	0,288	0,933		
Koloid z przykładu 5	3,65	2676,982	116,599	0,374	8,576	0,031 ± 0,003	2,3 ± 0,2
	1,82	3135,589	279,195	0,319	3,582		
	0,36	3530,280	1385,030	0,283	0,722		
Koloid z przykładu 6	3,02	2932,147	49,522	0,341	20,193	0,028 ± 0,003	6,60 ± 0,05
	0,60	3564,371	241,697	0,281	4,137		
FeREX	2,53	2948,600	150,322	0,339	6,652	0,035 ± 0,003	2,5 ± 0,3
	1,26	3277,343	236,700	0,305	4,225		
	0,25	3818,088	898,820	0,262	1,113		

Na podstawie uzyskanych wartości relaksacyjności  $r_1$  oraz  $r_2$  można wnioskować o przydatności otrzymanych nanocząstek jako kontrastów w pomiarach MRI. Im większa wartość  $r_2$  dla danego koloidu, przy podobnej wartości  $r_1$  do komercyjnego FeREX-u, tym większe wzmocnienie kontrastu (zaciemnienie pola) w obrazowaniu rezonansem magnetycznym.

10 Uzyskane koloidy w przykładach 2 i 6 wykazują zatem znacznie lepsze właściwości magnetyczne niż badany komercyjny środek kontrastowy.

*Przykład 20. Wpływ nanocząstek na koagulację erytrocytów.*

15 W celu zbadania oddziaływania koloidów z przykładów 2 i 6 z krwią ludzką na szkiełka podstawowe nakroplono po 4 µl krwi oraz 18 µl odpowiedniego koloidu. Po wymieszaniu nakryto preparaty szkiełkiem nakrywkowym i obserwowano pod mikroskopem optycznym ECLIPSE LV100D firmy Nikon. Otrzymane obrazy przedstawiono na Fig. 15-17. Fig. 17 przedstawia samą krew ludzką (a) oraz agregaty powstałe z erytrocytów (b), jako wzorce dla badanych koloidów. Fig.15 przedstawia koloid z przykładu 6 z krwią, natomiast na Fig. 16 przedstawiono koloid z przykładu 2 (a) bez rozcieńczania, (b) 10-krotnie rozcieńczony, (c)

100-krotnie rozcieńczony, (d) 1000-krotnie rozcieńczony z krwią.

Na podstawie poczynionych obserwacji można wnioskować o możliwym zastosowaniu biologicznym koloidów z przykładów 2 i 6. Koloid z przykładu 2 należy przed podaniem rozcieńczyć, aby uniknąć agregacji erytrocytów. Natomiast koloid z przykładu 6 można stosować nawet w stężonych dawkach, gdyż nie obserwuje się agregatów erytrocytów. Karboksymetylochitozan modyfikowany anionowo trójtlenkiem siarki dobrze związany z powierzchnią nanocząstek o ładunku dodatnim (superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza pokryte chitozanem modyfikowanym kationowo) zapewnia odwrócenie ładunku powierzchniowego na ujemny, a tym samym większą zgodność biologiczną z krwią ludzką.

#### 10 *Przykład 21. Wyznaczanie zawartości polimeru w nanocząstkach.*

W celu zbadania zawartości ChK we współstrącanych nanocząstkach tlenku żelaza próbki koloidów z przykładów 2 i 5 (do syntezy próbki koloidu z przykładu 5 zastosowano w tym przypadku ChK o stopniu podstawienia 56%) poddano liofilizacji. Tak otrzymane proszki umieszczono w platynowych naczynkach, a te w analizatorze termogravimetrycznym Netzsch STA 449 F1 Jupiter. Pomiar prowadzono w temperaturach 23-810 °C z szybkością przyrostu 10 °C/min. w atmosferze argonu. Termogramy zarejestrowane dla czystego chitozanu modyfikowanego kationowo oraz nanocząstek z przykładów 2 i 5 przedstawiono na Fig. 18, 19, 20:

- Termogram dla czystego ChK na Fig. 18,
- Termogram dla nanocząstek z przykładu 2 na Fig. 19,
- Termogram dla nanocząstek z przykładu 5 na Fig. 20.

Z termogramu na Fig. 18 wynika, że w badanych warunkach ubytek masy dla czystego ChK wynosi 93%. Dla próbki z przykładu 2 ubytek masy związany z rozkładem ChK wynosi 30% (Fig. 19), natomiast dla próbki z przykładu 5 wynosi 11% (Fig. 20). Na tej podstawie wyznaczono zawartość ChK w próbkach koloidów z przykładów 2 i 5, otrzymując następujące wartości:

- nanocząstki z przykładu 2 zawierają 32% ChK ( $0,3/0,93=0,32$ ),
- nanocząstki z przykładu 5 zawierają 12% ChK.

Chociaż do syntezy superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza z ChK użyto w przykładzie 5 roztworu o większym stężeniu ChK, jego zawartość w układzie jest mniejsza niż przy zastosowaniu niższego stężenia. Należy jednak pamiętać, iż w tym konkretnym przypadku dla koloidu z przykładu 5 zastosowano polimer o innym stopniu podstawienia grupami amoniowymi, co wpłynęło znacząco na właściwości produktu końcowego.

#### *Przykład 22. Nanocząstki tlenku żelaza z przyłączoną do powierzchni sondą fluorescencyjną.*

10 ml zawiesiny z przykładu 5 (do sporządzenia nanocząstek wykorzystano ChK o stopniu podstawienia 56%) wymieszano z 2 ml roztworu fluoreskaminy w acetonie o stężeniu 1mg/ml.

Po 15 min usunięto aceton przedmuchując mieszaninę gazem obojętnym. Następnie oczyszczono nanocząstki stosując chromatografię magnetyczną. W celu potwierdzenia sfunkcjonalizowania dodatnio naładowanej powierzchni SPION sondą fluorescencyjną, którą jest fluoreskamina, zawiesinę oczyszczonych nanocząstek odpowiednio rozcieńczono wodą  
5 dejonizowaną. Następnie wykonano widma wzbudzenia ( $\lambda_{em} = 500$  nm; Fig. 21A) i emisji ( $\lambda_{ex} = 395$  nm; Fig. 21B) na spektrofluorymetrze LS 55 firmy PerkinElmer.

Na Fig. 21 widoczne są charakterystyczne pasma dla produktu reakcji fluoreskaniny z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, które w swej strukturze zawiera ChK, co potwierdza otrzymanie SPION o ładunku powierzchniowym dodatnim sfunkcjonalizowanych sondą  
10 fluorescencyjną.

*Przykład 23. Obserwacja in vivo wpływu nanocząstek tlenku żelaza z przykładu 5 (stopień podstawienia 56%) i 6 na przykładzie wątrobowych map czasu relaksacji T<sub>2</sub>.*

Po umieszczeniu w skanerze myszy BALB/c wykonano pomiar A (Fig. 22). Następnie podano nanocząstki z przykładu 6 w dawce 0,55 mg/kg w 5% roztworze glukozy i wykonano  
15 pomiar B (Fig. 22). Po ok. 12 min. podano nanocząstki z przykładu 5 (stosowano ChK o stopniu podstawienia 56%) w dawce 0,55 mg/kg w 5% roztworze glukozy i wykonano pomiar C (Fig. 22). Nanocząstki podawano przez cewnik założony do tętnicy udowej. Do pomiaru użyto sekwencji MSME, TE = 4 ms, TR = 1500 ms, efektywny TR to ok. 2000 ms - co drugi oddech, podwójne bramkowanie, FOV = 22x22 mm, MTX 128x128.

20 Jak można zauważyć, każda następna mapa czasu relaksacji T<sub>2</sub> obrazuje czas T<sub>2</sub> przy niższej wartości. Można zatem wnioskować, iż otrzymane wg przykładów 5 i 6 nanocząstki tlenku żelaza zachowują się w układach *in vivo* jak środki kontrastowe skracające czas relaksacji T<sub>2</sub>.

#### Bibliografia

- 25 1. Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M. (2004). *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28.
2. Bulwan, M., Zapotoczny, S., Nowakowska, M. (2009). *Soft Matter*, 5, 4726-4732.
3. Cho, J., Grant, J., Piquette-Miller, M., Allen, C. (2006). *Biomacromolecules*, 7, 2845-2855.
- 30 4. Geraldes, C.F.G.C. S., Laurent, C.F.G.C. (2009). *Contrast Media Mol. Imaging*, 4, 1-23.
5. Gupta, A.K., Gupta, M. (2005). *Biomaterials*, 26, 3995-4021.
6. Hernández, R., Zamora-Mora, V., Sipaja-Ballester, M., Vega-Baudrit, J., López, D., Mijangos, C. (2009). *Journal of Colloid and Interface Science*, 339, 53-59.
7. Iida, H., Takayanagia, K., Nakanishib, T., Osakaa, T. (2007). *Journal of Colloid and*  
35 *Interface Science*, 314, 274-280.
8. Jung, C.W., Jacobs, P. (1995). *Magnetic Resonance Imaging*, 13, 661-674.

9. Kwak, S., Lafleur, M. (2003). *Macromolecules*, 36, 3189-3195.
10. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R.N. (2008). *Chemical Reviews*, 108 , 2064-2110.
11. Tartaj, P., del Puerto Morales, M., Veintemillas-Verdaguer, S., González-Carreño, T.,  
5 Serna, C.J. (2003). *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, R182-R197.
12. Tartaj, P., Morales, M.P., González-Carreño, T., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C.J.  
(2005). *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 290-29, 28-34.
13. Teja, A.S., Pei-Yoong Koh (2009). *Progress in Crystal Growth and Characterization of  
Materials*, 55, 22-45.
- 10 14. Wang, Y., Li, B., Zhou, Y., Jia, D. (2008). *Polymers for Advanced Technologies*, 19, 1256-  
1261.
15. Yuan, Q., Venkatasubramanian, R., Hein, S., Misra, R.D.K. (2008). *Acta Biomaterialia*, 4,  
1024-1037.
  
- 15 Zgłaszający: Uniwersytet Jagielloński  
Pełnomocnik: rzecz. pat. Maciej Czarnik