



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA  
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## DZIEDZINA NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH

DYSCYPLINA WIODĄCA NAUKI FIZYCZNE  
DYSCYPLINA DODATKOWA NAUKI CHEMICZNE

# ROZPRAWA DOKTORSKA

## *Nanokapsuły polimerowe z magnetycznym rdzeniem do zastosowań biomedycznych*

Autor: **mgr Elżbieta Gumieniczek-Chłopek**

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Czesław Kapusta  
Prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny

Praca wykonana w Katedrze Fizyki Ciała Stałego Wydziału Fizyki i Informatyki  
Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie  
i Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu  
Jagiellońskiego

Kraków, 2022



**Oświadczenie autora rozprawy:**

Oświadczam, świadoma odpowiedzialności karnej za poświadczenie nieprawdy, że niniejszą pracę doktorską wykonałam osobiście i samodzielnie i że nie korzystałam ze źródeł innych niż wymienione w pracy.

data, podpis autora

**Oświadczenie promotora rozprawy:**

Niniejsza rozprawa jest gotowa do oceny przez recenzentów.

data, podpis promotora rozprawy





**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, nr projektu POWR.03.02.00-00-I004/16, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej.



Część zaprezentowanych badań wykonana została w ramach grantu dziekańskiego Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH „Biopolimerowe kapsuły jako nośniki magnetycznych nanocząstek tlenków żelaza przeznaczone do aplikacji biomedycznych”, numer projektu 15.11.220.717/3 realizowanego od 10.07.2018 do 31.12.2018. oraz w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w AGH.

## **PODZIĘKOWANIA**

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

**prof. dr hab. Czesławowi Kapuście**  
**i prof. dr hab. Szczepanowi Zapotocznemu**

*Za współpracę, życzliwość i wsparcie oraz stworzenie możliwości prowadzenia badań w swoich Zespołach.*

**Zespołowi Materiałów Magnetycznych Litych i Nanomateriałów,**  
a w szczególności mgr. Adrianie Gilarskiej, dr Kamilowi Goc, dr Sylwii Fiejdasz  
i dr inż. Tomaszowi Strączkowi oraz **Zespołowi Nanotechnologii Polimerów**  
**i Biomateriałów,** a w szczególności dr Joannie Odrobińskiej-Baliś, mgr Mateuszowi  
Zającowi i dr Małgorzacie Janik-Hazuka

*Za miłą atmosferę pracy i pomoc.*

***Pracę dedykuję mojej Córcie i Mężowi***





# Spis treści

PODZIĘKOWANIA .....	6
Spis treści.....	9
Wykaz zastosowanych skrótów .....	13
Streszczenie .....	15
Abstract .....	18
Wstęp .....	21
CZĘŚĆ LITERATUROWA .....	23
1. Polimery.....	23
1.1. Klasyfikacja polimerów.....	23
1.2. Polimery w zastosowaniach biomedycznych .....	25
1.3. Chitozan.....	26
2. Nanocząstki .....	28
2.1. Klasyfikacja nanocząstek.....	28
2.2. Nanocząstki magnetyczne tlenków żelaza .....	29
2.2.1. Podstawowe definicje związane z magnetyzmem nanocząstek.....	29
1.1.1. Tlenki żelaza - struktura i podstawowe właściwości.....	33
1.1.2. Właściwości nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza.....	34
1.1.3. Preparatyka nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza .....	36
1.1.4. Nanocząstki magnetyczne tlenków żelaza – zastosowania biomedyczne .....	42
3. Układy do celowanego i kontrolowanego magnetycznie dostarczania i uwalniania związków biologicznie aktywnych .....	50
3.1. Wymagania stawiane nośnikom przeznaczonym do terapii celowanej ...	51
3.2. Klasyfikacja nośników magnetycznych .....	52
3.3. Kapsuły magnetyczne .....	56
4. Magnetycznie wspomagane sterowanie układami do celowanego i kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie aktywnej .....	59

4.1.	Klasyfikacja metod dostarczania i procesów uwalniania substancji enkapsulowanych w polimerowych nośnikach .....	61
4.2.	Pole magnetyczne w układach do celowanego i kontrolowanego dostarczania i uwalniania substancji biologicznie aktywnych .....	63
4.3.	Magnetycznie sterowalne kapsuły do celowanego i kontrolowanego transportu substancji biologicznie aktywnej – stan badań.....	66
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA .....		68
1.	Zakres przeprowadzonych prac .....	68
2.	Wykorzystane odczynniki, metody badań i aparatura .....	69
2.1.	Odczynniki.....	69
2.2.	Metody badań i aparatura.....	71
2.2.1.	Miareczkowanie konduktometryczne oraz pomiary pH.....	71
2.2.2.	Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego ( $^1\text{H}$ NMR).....	71
2.2.3.	Analiza elementarna .....	71
2.2.4.	Fourierowska spektroskopia w podczerwieni .....	71
2.2.5.	Skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa.....	72
2.2.6.	Jednoczesna analiza termiczna (STA).....	72
2.2.7.	Dyfraktometria rentgenowska .....	72
2.2.8.	Spektrometria Mössbauera .....	72
2.2.9.	Magnetometria z wibrującą próbką .....	73
2.2.10.	Pomiary średnic hydrodynamicznych oraz potencjału dzeta .....	73
2.2.11.	Transmisyjna mikroskopia elektronowa w warunkach kriogenicznych .....	73
2.2.12.	Fluorescencyjna mikroskopia konfokalna .....	74
2.2.13.	Spektrofotometria do pomiarów płytek mikrotitracyjnych .....	74
2.2.14.	Źródło stałego pola magnetycznego.....	74
2.2.15.	Generator zmiennego pola magnetycznego.....	75
2.2.16.	Inna używana aparatura .....	75
3.	Przeprowadzone syntezy i inne procedury.....	76
3.1.	Modyfikacje chitozanu .....	76
3.1.1.	Modyfikacja chitozanu grupą kationową .....	76

3.1.2.	Hydrofobowa modyfikacja kationowej pochodnej chitozanu .....	77
3.1.3.	Modyfikacja chitozanu grupą anionową .....	77
3.1.4.	Wyznaczenie stopnia podstawienia chitozanu grupą glicydylotrimetyloamoniową.....	78
3.2.	Wysokotemperaturowa synteza nanocząstek tlenków żelaza z powłoką hydrofobową .....	79
3.3.	Tworzenie kationowych kapsuł opartych na ciekłych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi.....	80
3.4.	Tworzenie anionowych kapsuł opartych na ciekłych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi.....	82
3.5.	Tworzenie kapsuł opartych na ciekłych fluorescencyjnych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi.....	82
3.6.	Tworzenie stężonych zawiesin kationowych kapsuł opartych na ciekłych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi .....	83
3.7.	Hodowla komórek nowotworowych linii 4T1 .....	83
3.8.	Test cytotoksyczności kapsuł względem komórek nowotworowych linii 4T1 (test XTT) .....	84
3.9.	Sterowanie kapsuł do wnętrza komórek nowotworowych stałym polem magnetycznym .....	85
3.10.	Uwalnianie enkapsulowanej substancji z kapsuł wewnątrz komórek nowotworowych za pomocą zmiennego pola magnetycznego .....	87
3.11.	Weryfikacja przeżywalności komórek po przeprowadzeniu eksperymentów z zewnętrznym polem magnetycznym .....	88
4.	Wyniki badań i ich dyskusja .....	89
4.1.	Modyfikowany chitozan .....	89
4.1.1.	Charakterystyka kationowej pochodnej chitozanu.....	89
4.1.2.	Charakterystyka kationowej pochodnej chitozanu modyfikowanej hydrofobowo.....	89
4.1.3.	Charakterystyka anionowej pochodnej chitozanu .....	91
4.1.4.	Podsumowanie.....	92
4.2.	Nanocząstki magnetyczne .....	93
4.2.1.	Charakterystyka otrzymanych nanocząstek magnetycznych.....	93

4.2.2.	Podsumowanie.....	102
4.3.	Kapsuły.....	103
4.3.1.	Charakterystyka otrzymanych kapsuł.....	103
4.3.2.	Podsumowanie.....	107
4.4.	Badania komórkowe .....	109
4.4.1.	Badania cytotoksyczności kapsuł względem komórek nowotworowych .....	109
4.4.2.	Sterowanie kapsułami zewnętrznym stałym polem magnetycznym 110	
4.4.3.	Uwalnianie enkapsulowanej substancji zmiennym polem magnetycznym .....	116
4.4.4.	Podsumowanie.....	122
	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	123
	BIBLIOGRAFIA .....	125
	SPIS RYSUNKÓW.....	132
	SPIS TABEL.....	137
	DOROBEK NAUKOWY.....	138

## Wykaz zastosowanych skrótów

**ACHit** – chitozan modyfikowany anionowo poprzez przyłączenie grup sulfaminowych

**BCM** - biologicznie kontrolowana biomineralizacja (*ang.* Biologically Controlled Biomineralization)

**BIM** - biologicznie indukowana biomineralizacja (*ang.* Biologically Induced Biomineralization)

**CChit** – chitozan modyfikowany kationowo chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym

**CChitC12** – chitozan modyfikowany kationowo chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym z naszczepionymi hydrofobowymi łańcuchami n-dodecyłowymi

**cryo-TEM** – krioskopowa transmisyjna mikroskopia elektronowa (*ang.* Cryogenic Transmission Electron Microscopy)

**DLS** – metoda pomiaru średnic hydrodynamicznych w oparciu o dynamiczne rozpraszanie światła (*ang.* Dynamic Light Scattering)

**DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (*ang.* deoxyribonucleic acid)

**FC** – krzywa podatności magnetycznej w funkcji temperatury mierzona w warunkach chłodzenia w stałym polu magnetycznym (*ang.* Field Cooled)

**FT-IR** - fourierowska spektroskopia w podczerwieni (*ang.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

**GMR** - sensor magnetorezystywny bazujący na gigantycznym magnetooporze (*ang.* Giant MagnetoResistance)

**GTMAC** - chlorek glicydylotrimetyloamoniowy

**LbL** – technika nakładania przeciwnie naładowanych warstw (*ang.* Layer by Layer)

**MRI** - obrazowanie metodą magnetycznego rezonansu (*ang.* Magnetic Resonance Imaging)

**NMR** - jądrowy rezonans magnetyczny (*ang.* Nuclear Magnetic Resonance)

**SPION** – superparamagnetyczne nanocząstki tlenków żelaza (*ang.* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles)

**STEM** - skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa (*ang.* Scanning Transmission Electron Microscopy)

**TEM** - transmisyjna mikroskopia elektronowa (*ang.* Transmission Electron Microscope)

**TGA-DSC** - jednoczesna analiza obejmująca analizę termogravimeryczną (*ang.* Thermogravimetric Analysis) i skaningową kalorymetrię różnicową (*ang.* Differential Scanning Calorimetry)

**TMR** - sensor magnetorezystywny bazujący na magneoporze tunelowym (*ang.* Tunnel MagnetoResistance)

**VSM** - magnetometria z wibrującą próbką (*ang.* Vibrating Sample Magnetometry)

**XRD** - dyfraktometria rentgenowska (*ang.* X-Ray Diffraction)

**ZFC** - krzywa podatności magnetycznej w funkcji temperatury mierzona w warunkach grzania w stałym polu magnetycznym uprzednio schłodzonej próbki (*ang.* Zero Field Cooled)

## Streszczenie

**Celem niniejszej pracy było otrzymanie oraz scharakteryzowanie sterowalnych magnetycznie nośników polimerowych w postaci kapsuł opartych na ciekłych olejowych rdzeniach stabilizowanych modyfikowanym polimerem pochodzenia naturalnego. Zgodnie z hipotezą przeprowadzonych badań, nośniki te mają za zadanie wprowadzić do komórki enkapsulowaną substancję, a następnie umożliwić jej uwolnienie. Cały proces ma się odbywać w sposób magnetycznie kontrolowany.**

Opracowane zostały dwa rodzaje nośników, z ujemnym oraz dodatnim ładunkiem powierzchniowym, które wewnątrz zawierały enkapsulowane nanocząstki magnetyczne. Badane struktury dedykowane są aplikacjom biomedycznym jako układy zdolne do celowanego i kontrolowanego transportu oraz uwolnienia hydrofobowej substancji biologicznie aktywnej. Terapie wykorzystujące nośniki, które umożliwiają dokładne i ukierunkowane dostarczanie terapeutyków w organizmie stanowią innowacyjne i bardzo obiecujące podejście, zwłaszcza w terapii chorób nowotworowych. Do głównych zalet takiej formy leczenia należy możliwość utrzymywania odpowiedniego stężenia substancji czynnej w miejscu docelowym, prowadzącego do śmierci komórek chorych, bez uszkodzenia komórek zdrowych, czyli bez dodatkowych skutków ubocznych. Pierwszy etap badań stanowiło otrzymanie i zbadanie substancji potrzebnych do utworzenia biopolimerowych kapsuł. Ze względu na dedykowane biomedyczne zastosowanie nośnika, przeprowadzone zostały syntezы polegające na modyfikacjach polimeru pochodzenia naturalnego oraz reakcje prowadzące do otrzymania nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza. Wykonana została dwuetapowa modyfikacja chitozanu polegająca na przyłączeniu grup kationowych oraz hydrofobowych łańcuchów alifatycznych. Otrzymany związek, w kolejnych etapach badań, miał za zadanie stabilizację olejowych rdzeni kapsuł poprzez zjawisko solubilizacji micelarnej. Wyznaczony na podstawie miareczkowania konduktometrycznego stopień podstawienia pochodnej chitozanu grupami kationowymi wyniósł 63%, natomiast stopień podstawienia grupami hydrofobowymi, określony w oparciu o spektroskopię NMR, równy był 3%. Następnie przeprowadzona została anionowa modyfikacja pochodnej chitozanu. Otrzymany produkt reakcji został wykorzystany do opracowania drugiego rodzaju kapsuł wykazującego ujemny ładunek powierzchniowy. Poprawne przeprowadzenie syntezы zostało potwierdzone pomiarem przy wykorzystaniu spektroskopii FT-IR, a stopień podstawienia pochodnej chitozanu grupami anionowymi, wyznaczony na podstawie analizy elementarnej, wyniósł 53%. Ostatnią część prac z zakresu

wykonanych syntez obejmowała wysokotemperaturowa reakcja prowadząca do otrzymania nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza pokrytych substancją hydrofobową, które mają odpowiadać za magnetyczny charakter całego nośnika. Obrazowanie przeprowadzone z użyciem STEM potwierdziło sferyczny kształt nanocząstek o średnich rozmiarach równych 15 nm. W celu potwierdzenia poprawnego odłożenia się warstwy substancji hydrofobowej na powierzchni nanocząstek wykonano pomiary spektroskopią FT-IR oraz analizę termiczną TGA-DSC. Na podstawie wyników pomiarów XRD wywnioskowano, że otrzymane nanocząstki wykazują budowę typu rdzeń-powłoka, przy czym rdzeń zbudowany jest z wustytu (22%), a powłoka z innej fazy tlenku żelaza (77%). Pomiary przeprowadzone za pomocą spektroskopii Mössbauera, przy różnych temperaturach, pozwoliły wykazać, że drugą fazą tlenku żelaza tworzącą nanocząstki jest maghemit, a badane struktury wykazują właściwości superparamagnetyczne. Superparamagnetyczny charakter nanocząstek dla temperatury powyżej 275 K potwierdzony został poprzez pomiary VSM. Drugi etap przeprowadzonych badań obejmował optymalizację procedury syntezy oraz analizę fizykochemiczną dwóch typów magnetycznych kapsuł, o ujemnym oraz o dodatnim ładunku powierzchniowym, które zostały otrzymane przy wykorzystaniu związków i struktur wytworzonych we wcześniejszym etapie pracy. Kapsuły o dodatnim ładunku powierzchniowym zostały otrzymane na drodze samoorganizacji amfifilowej pochodnej chitozanu, modyfikowanej grupami kationowymi i z naszczepionymi łańcuchami alkilowymi, na powierzchni kropelek oleju zawierających zdyspergowane nanocząstki magnetyczne. Dodatkowe nałożenie, poprzez zastosowanie techniki LbL, warstwy anionowego chitozanu na powierzchnię kapsuł, prowadziło do otrzymania drugiego typu nośnika (z ujemnym ładunkiem powierzchniowym). Na podstawie pomiarów DLS określono zmiany średnich wielkości średnic hydrodynamicznych mierzonych w ciągu 48 tygodni - otrzymane wartości mieszczą się w zakresie 140-170 nm dla kapsuł kationowych i 140-230 nm dla kapsuł anionowych. Zmierzone wartości potencjału dzeta, wyznaczone również w ciągu 48 tygodni, oscylowały w granicach 30-40 mV dla kapsuł o dodatnim ładunku zewnętrznym i -35 do -45 mV dla kapsuł o ujemnym ładunku. Otrzymane wartości wskazują na wysoką stabilność wytworzonych nośników. Zdjęcia wykonane przy wykorzystaniu cryo-TEM potwierdzają obecność nanocząstek magnetycznych w rdzeniu nośnika oraz jego rozmiar i sferyczny kształt. Możliwość enkapsulacji substancji hydrofobowych została potwierdzona przez obrazowanie mikroskopią konfokalną kapsuł zawierających dodatkowo w fazie olejowej sondę w postaci hydrofobowego związku fluorescencyjnego. Natomiast superparamagnetyczny charakter nośnika został potwierdzony pomiarami VSM. Tak opracowane układy



zostały poddane badaniom komórkowym, które stanowiły trzeci etap części doświadczalnej niniejszej pracy. Przeprowadzone badania miały na celu weryfikację potencjału aplikacyjnego opracowanych kapsuł w kontekście sterowanych magnetycznie nośników zdolnych do celowanego i kontrolowanego transportu oraz uwalniania enkapsulowanej hydrofobowej substancji. Wszystkie testy wykonane zostały względem linii komórkowej raka sutka pochodzącej z tkanki gruczołu sutkowego mysiego (4T1). Cytotoksyczność kapsuł została sprawdzona za pomocą testu XTT, a otrzymane wyniki pozwoliły wyznaczyć odpowiednie stężenie kapsuł anionowych, jak i kationowych, które nie wykazuje toksyczności względem komórek. Następnie, przy wykorzystaniu stałego pola magnetycznego przeprowadzono eksperyment mający na celu sterowanie kapsułami zawierającymi modelowy hydrofobowy barwnik fluorescencyjny i wprowadzenie ich do wnętrza komórek nowotworowych oraz weryfikację wpływu prowadzonych doświadczeń na stan komórek, wykorzystując zdjęcia pochodzące z mikroskopu konfokalnego. W początkowej fazie testów wykluczony został negatywny wpływ stałego pola magnetycznego na komórki linii 4T1. Dalsza część eksperymentów wskazała na możliwość samoistnego wnikania do komórek kapsuł o dodatnim ładunku powierzchniowym oraz, że zastosowanie zewnętrznego stałego pola magnetycznego zwiększa efektywność badanego zjawiska, przyczyniając się głównie do nagromadzenia kapsuł w okolicy komórek nowotworowych. Analogiczny eksperyment przeprowadzony został przy wykorzystaniu kapsuł o ujemnym ładunku powierzchniowym. Wykonane zdjęcia wskazują na zwiększoną tendencję do samoistnego wnikania kapsuł do wnętrza komórki (w odniesieniu do kapsuł kationowych), a zastosowanie stałego pola magnetycznego zwiększa efektywność tego procesu. Ostatni etap badań komórkowych miał na celu sprawdzenie możliwości kontrolowanego uwalniania substancji enkapsulowanej w nośniku, który uprzednio, za pomocą stałego pola magnetycznego, został wprowadzony do komórki. W tym celu odpowiednio przygotowaną próbkę poddawano ekspozycji na działanie zewnętrznego zmiennego pola o różnych parametrach. Analogicznie, jak w przypadku eksperymentów związanych ze stałym polem magnetycznym, wykluczony został szkodliwy wpływ działania samego pola na komórki. Obrazy z mikroskopu konfokalnego otrzymane po przeprowadzeniu eksperymentów z kapsułami o dodatnim ładunku powierzchniowym ukazują zjawisko zwiększonego wnikania kapsuł do wnętrza komórki, jednak bez uwolnienia transportowanego barwnika w jej wnętrzu. Natomiast wyniki badań wykonanych dla kapsuł o ujemnym ładunku powierzchniowym potwierdzają możliwość uwolnienia enkapsulowanej substancji we wnętrzu komórki poprzez zastosowanie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego.

## **Abstract**

**The aim of this work was to obtain and characterize magnetically controllable polymeric carriers in the form of capsules with oil cores stabilized by modified polymers of natural origin. According to the research hypothesis, these carriers are designed to introduce the encapsulated substance into the cell and then enabling its release. The entire process should be magnetically controlled.**

Two types of carriers were developed, with a negative and with a positive surface charge, which contained encapsulated magnetic nanoparticles inside. The investigated structures are dedicated for biomedical applications as systems being capable of targeted and controlled transport and release of hydrophobic biologically active substances. The therapies which provide carriers that will enable precise and targeted therapeutics delivery consist an innovative and very promising approach, especially in the treatment of neoplastic diseases. The main advantages of this form of treatment include the ability to maintain an appropriate concentration of the active substance at the target site leading to the death of diseased cells, without damaging healthy cells, i.e. without causing additional side effects of the therapy. The first stage of the research was to obtain and study the substances needed to create biopolymer capsules. Due to the dedicated biomedical use of the carrier, syntheses were carried out involving the modification of a natural origin polymer and reactions leading to the production of magnetic iron oxide nanoparticles. A two-stage modification of chitosan was performed, involving the addition of cationic groups and hydrophobic aliphatic chains. The compound obtained, in the subsequent stages of the work, was utilized to stabilize the oil capsule cores through the phenomenon of micellar solubilization. The degree of substitution of the chitosan derivative with cationic groups, determined on the basis of conductometric titration, was 63%, while the degree of substitution with hydrophobic groups, determined on the basis of NMR spectroscopy, was 3%. Then an anionic modification of the chitosan derivative was performed. The reaction product obtained was used to develop a second type of capsules with a negative surface charge. Proper modification was confirmed by measurement using FT-IR spectroscopy, degree of substitution of the chitosan derivative with anionic groups, determined on the basis of elemental analysis, was 53%. The last part of the work in the performed syntheses part consisted of a high-temperature reaction leading to the obtaining of magnetic iron oxide nanoparticles coated with a hydrophobic substance, which are to be responsible for the magnetic feature of the entire carrier. STEM imaging confirmed the spherical shape of nanoparticles

with an average size of 15 nm. In order to confirm the correct deposition of the hydrophobic substance layer on the surface of nanoparticles, FT-IR spectroscopy and thermal analysis TGA-DSC were performed. Based on the results of XRD measurements, it was indicated that the nanoparticles obtained had a core-shell structure, with the core made of wustite (22%), and the coating made of a different phase of iron oxide (77%). Measurements carried out with Mössbauer spectroscopy at various temperatures, showed that this second phase is maghemite, and the structures examined show superparamagnetic properties. The superparamagnetic nature of nanoparticles at temperatures above 275 K was confirmed by VSM measurements. The second stage of the research was the optimization of the capsules preparation procedure and the physicochemical analysis of two types of magnetic carriers, with a negative and with a positive surface charge. They were obtained by utilization of the compounds and structures synthesized at an earlier stage of the work. Capsules with a positive surface charge were produced by self-assembly of an amphiphilic chitosan derivative, modified with cationic groups and with grafted alkyl chains, on the surface of oil droplets containing dispersed magnetic nanoparticles. The additional application of an anionic chitosan layer on the capsule surface by the LbL technique led to the second type of carrier (with a negative surface charge). Based on the DLS measurements, changes in the mean size of the hydrodynamic diameters measured during 48 weeks were determined - the values obtained are in the range of 140-170 nm for cationic capsules and 140-230 nm for anionic capsules. The zeta potential values measured, also determined during 48 weeks, oscillated in the range of 30-40 mV for capsules with a positive charge and -35 to -45 mV for capsules with a negative charge. The values indicate the high stability of the produced carriers. Images taken with the use of cryo-TEM confirm the presence of magnetic nanoparticles in the core of the carrier and its size and spherical shape. The possibility of encapsulating hydrophobic substances was confirmed by confocal microscopy imaging of capsules which additionally contain a probe in the form of a hydrophobic fluorescent compound in the oil phase. The superparamagnetic nature of the carrier was confirmed by VSM measurements. The systems developed were subjected to cellular tests, which constituted the third stage of the experimental part of this work. The research conducted was aimed to verify the application potential of the capsules in the context of magnetically controlled carriers capable of targeted and controlled transport and release of the encapsulated hydrophobic substance. All assays were performed against a mouse mammary gland tissue derived breast cancer cell line (4T1). The cytotoxicity of the capsules was checked using the XTT test, and the obtained results determined the appropriate concentration of anionic and cationic capsules, which do not show

toxicity to cells. Then, with the use of a constant magnetic field, an experiments based on the controllable introduction of the capsules, containing the model hydrophobic fluorescent dye, inside the tumour cells were performed. As a verification of the influence of the experiments on the condition of the cells, proper confocal microscope images were collected. In the initial phase of the tests, the possible negative influence of the constant magnetic field on the cells of the 4T1 line was excluded. The further part of the experiments showed the possibility of spontaneous penetration of capsules with a positive surface charge and that the use of an external permanent magnetic field increases the effectiveness of the phenomenon studied, contributing mainly to the accumulation of capsules in the vicinity of cancer cells. A similar experiment was carried out with the use of capsules with a negative surface charge. The images taken indicated an increased tendency for spontaneous penetration of capsules inside the cell (with reference to cationic capsules), and the use of a constant magnetic field increases the efficiency of this process. The last stage of cell research was verification the possibility of a controlled release of the substance encapsulated in a carrier that had previously been introduced into the cell by a constant magnetic field. For this purpose, a properly prepared sample was exposed to an external alternating field of various parameters. Similarly to the experiments related to the constant magnetic field, the harmful effect of the field itself on the cells was excluded. Images obtained after experiments with positive surface charge capsules indicate the phenomenon of increased penetration of capsules into the cell, but without the release of the transported dye inside the cell. In contrast to that, the results of experiments carried out for capsules with a negative surface charge confirm the possibility of releasing the encapsulated substance inside the cell through the use of an appropriate alternating magnetic field.

## Wstęp

Nanomedycyna jako prężnie rozwijająca się dziedzina nanotechnologii stanowi współcześnie bardzo obiecujące podejście w wielu zagadnieniach biomedycznych. Interdyscyplinarny charakter rozwiązań proponowanych przez tę ścieżkę nauki wymaga łączenia wiedzy, technik i doświadczenia z zakresu chemii, inżynierii materiałowej, biologii, fizyki i medycyny oraz zaawansowanych testów umożliwiających w efekcie końcowym komercjalizację, wprowadzenie bezpiecznego produktu na rynek. Wyjątkowe właściwości materiałów, które pojawiają się na skutek zmniejszenia ich rozmiarów do skali nanometrycznej, ich różnorodność oraz możliwość działania na poziomie procesów biologicznych i mechanizmów komórkowych nadają nanomedycynie duży potencjał w leczeniu i diagnostyce licznych schorzeń.<sup>1</sup>

Do najpopularniejszych zagadnień wykorzystujących nanotechnologiczne podejście w medycynie należą m.in. projektowanie zaawansowanych urządzeń diagnostycznych, opracowywanie nowych materiałów wykorzystywanych w implantologii i inżynierii tkankowej oraz tworzenie systemów przeznaczonych do dostarczania związków biologicznie aktywnych. Wspomniane nośniki, zdolne do celowanego i kontrolowanego transportu oraz uwolnienia substancji, stanowią bardzo przyszłościowe podejście zwłaszcza w leczeniu nowotworów. Odpowiednio skonstruowany układ umożliwi precyzyjne dotarcie w miejsce zmiany chorobowej i uwolnienie substancji bez uszkodzenia zdrowych komórek oraz utrzymanie stężenia leku na poziomie dawki terapeutycznej. Wysoki potencjał tego typu układów sprawia, że liczne grupy badawcze proponują rozwiązania wykorzystujące różnorodne nośniki i sposoby sterowania nimi. Bardzo interesujące i stosunkowo popularne wydaje się być zastosowanie kontrolowalnych nośników polimerowych w postaci kapsuł opartych na polimerach pochodzenia naturalnego, które mogą zostać wykorzystane również w charakterze materiałów samoleczących się, w konserwacji składników odżywczych, czy uwalnianiu zapachów i dostarczaniu nawozów. Ponadto, odpowiednie środowisko wewnątrz kapsuły umożliwia enkapsulację różnego typu związków, które w konwencjonalnym leczeniu wykazują słabą przyswajalność i problemy z dostarczaniem.<sup>2</sup> Odpowiedni nośnik, to jednak tylko część rozwiązania dedykowanego terapii celowanej. Równie istotny jest sposób kontroli transportu oraz procesu uwalniania. W tym celu stosowane są różnego rodzaju funkcjonalizacje, czy wzbogacania struktury nanocząstkami. Jedno z proponowanych rozwiązań opiera się na wykorzystaniu zewnętrznego pola magnetycznego, które dzięki dodatkowej obecności nanocząstek tlenków żelaza

w strukturze nośnika, umożliwi sterowanie, kontrolowane przemieszczanie układu oraz uwolnienie leku. **Badania nad zastosowaniem pola magnetycznego w charakterze zjawiska umożliwiającego sterowanie nośnikiem przeznaczonym do celowanego i kontrolowanego transportu substancji aktywnej, stanowiące główną hipotezę niniejszej pracy, zyskują na popularności w ciągu ostatnich lat. Jednak połączenie nośnika w postaci biopolimerowej kapsuły z możliwością magnetycznego sterowania stanowi innowacyjne podejście w tworzeniu układów dedykowanych nanomedycynie, zwłaszcza gdy możliwa jest enkapsulacja biologicznie aktywnych związków hydrofobowych wewnątrz układu.**

## CZĘŚĆ LITERATUROWA

### 1. Polimery

Polimery towarzyszą człowiekowi od początku istnienia pełniąc istotną rolę w wielu procesach życiowych oraz jako związki znajdujące się w materiałach takich jak skóra, włókna naturalne, czy drewno. Historia laboratoryjnego rozwoju polimerów sięga pierwszej połowy XIX wieku, kiedy to niemiecki aptekarz otrzymał po raz pierwszy styren. Sukcesywnie prowadzone badania doprowadziły do kolejnych osiągnięć wdrażanych do produkcji przemysłowych. Ważność zagadnienia potwierdza przyznanie czterech Nagród Nobla za badania prowadzone nad tymi strukturami oraz fakt, że wyobrażenie sobie współczesnego świata bez materiałów polimerowych jest praktycznie niemożliwe.<sup>3,4,5</sup>

#### 1.1. Klasyfikacja polimerów

To właśnie jeden z noblistów, niemiecki chemik Herman Staudinger zdefiniował pojęcie polimerów jako gigantycznych makrocząsteczek o budowie łańcuchowej. Łańcuchy te tworzone są przez powtarzające się jednostki budulcowe zwane merami. Polimery wykazują różnorodne właściwości fizykochemiczne, które w dużej mierze determinowane są przez oddziaływania międzycząsteczkowe. Szerokie spektrum właściwości sprawiło, że materiały polimerowe stanowią fundament współczesnej technologii, przemysłu oraz bardzo popularną i prężnie rozwijającą się dziedzinę nauki.

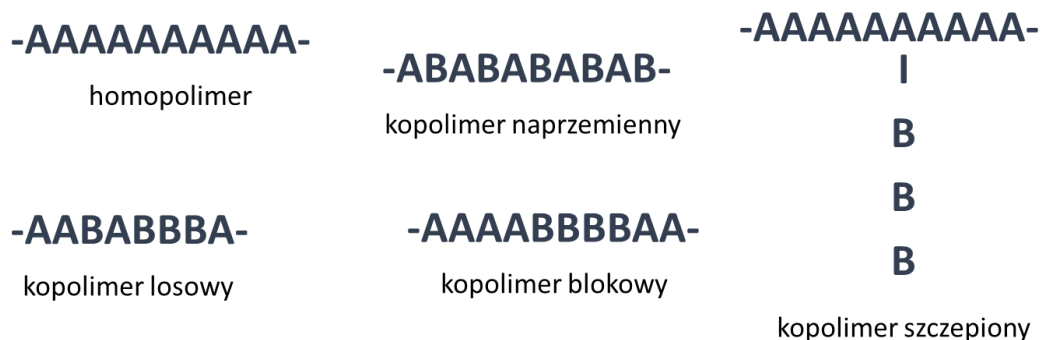
Istnieje wiele sposobów klasyfikacji polimerów w zależności od przyjętego kryterium podziału. Ze względu na **rodzaj monomerów** tworzących strukturę biopolimeru wyróżnić możemy:

- **polinukleotydy**, tworzone przez minimum 13 monomerów kwasów nukleotydowych występujących w łańcuchu,
- **polipeptydy i białka**, czyli struktury zbudowane z odpowiednio ułożonych aminokwasów,
- **polisacharydy**, które zbudowane są z liniowo połączonych węglowodanów.

Analizując **budowę przestrzenną łańcucha** można zasadniczo wyróżnić polimery wykazujące **budowę liniową**, **rozgałęzioną** i **usięciowaną**. Polimery o budowie

liniowej tworzone są przez połączone mery tworzące pojedynczy łańcuch, polimery rozgałęzione to polimery liniowe, w których występują przyłączone dodatkowo do łańcucha głównego różnej długości odgałęzienia. Natomiast polimery usieciowane tworzą przestrzenną sieć zbudowaną z połączonych łańcuchów.

Ze względu na **budowę chemiczną** wyróżnić możemy **homopolimery**, zbudowane z jednego typu merów lub **kopolimery** zbudowane z więcej niż jednego rodzaju merów. W zależności od układu merów, wśród kopolimerów wyszczególnić możemy m.in. kopolimery naprzemienne, blokowe, szczepione i o sekwencji losowej (bezladne, statystyczne). Podział polimerów pod kątem ich budowy ilustruje Rysunek 1. Ciekawą własnością niektórych kopolimerów jest jednocześnie powinowactwo do dwóch różnych typów środowiska określane mianem **amfifilowości**. Zjawisko to wynika bezpośrednio z budowy związku, który w swojej strukturze zawiera jednocześnie segmenty o właściwościach np. hydrofilowych oraz segmenty hydrofobowe. Warto podkreślić, że tego typu związki wykazują zdolność do samoorganizacji (*ang.* self-assembling), która umożliwia tworzenie różnego rodzaju warstw lub zamkniętych domen wewnątrz których, w zależności od środowiska zewnętrznego, możliwa jest solubilizacja związków dobrze lub słabo rozpuszczalnych w wodzie.



**Rysunek 1** Schemat ilustrujący podział polimerów ze względu na ich budowę chemiczną.

Pod względem **budowy fizycznej** polimery dzielimy na polimery **termoplastyczne** i polimery **duroplastyczne**, **chemo-** lub **termo-utwardzalne**. Natomiast, biorąc pod uwagę **predyspozycje do odkształceń** pod wpływem przyłożonego naprężenia wyróżnić możemy **elastomery**, które nawet przy małych naprężeniach wykazują duże odkształcenia oraz **plastomery** wykazujące niewielkie odkształcenia wywołane zewnętrzną siłą.

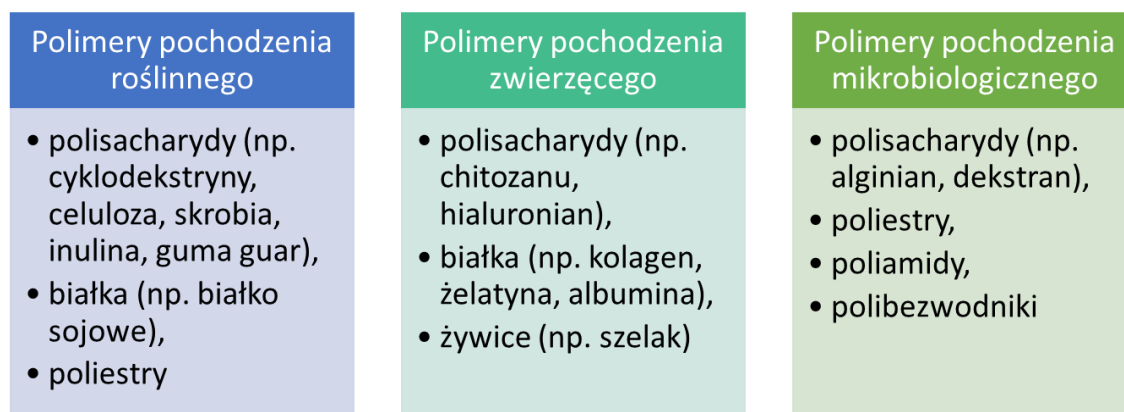


Uwzględniając **pochozenie** polimerów można dokonać podziału na polimery **pochozenia naturalnego**, polimery **syntetyczne** oraz **modyfikowane polimery pochozenia naturalnego**. Wśród polimerów pochozenia naturalnego wyróżnić można biopolimery, które występują naturalnie w organizmach żywych i ze względu na swoje właściwości stanowią bardzo obiecujące rozwiązanie w materiałach przeznaczonych do aplikacji biomedycznych.<sup>3,6,7</sup>

## 1.2. Polimery w zastosowaniach biomedycznych

Materiały wykorzystywane w biomedycynie muszą spełniać szereg wymagań warunkujących ich bezpieczeństwo dla organizmu człowieka. Do najważniejszych cech takich materiałów zaliczyć należy **biokompatybilność**, **biofunkcyjność**, **brak reakcji alergicznych** i **toksycznych** oraz **biodegradowalność** lub **bioresorbowalność**. Istnieją różne typy materiałów spełniających wyżej wymienione wymagania, jednak współcześnie to właśnie polimery stanowią główny komponent układów znajdujących zastosowanie w licznych aplikacjach biomedycznych takich jak diagnostyka, inżynieria tkankowa, biosensoryka i farmakoterapia.

Ze względu na wyjątkowe właściwości i przyjazność środowisku, wynikające z naturalnego podobieństwa struktury polimerów do budowy makrocząsteczek biologicznych, obecnie uwaga znacznej części naukowców pracujących w dziedzinie technologii biomedycznych skierowana jest na biodegradowalne polimery, naturalnie występujące w organizmach żywych. Klasyfikację biodegradowalnych biopolimerów przedstawia Rysunek 2.

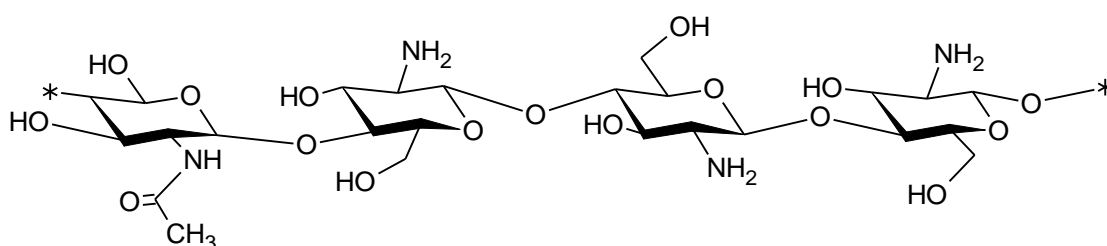


**Rysunek 2** Schemat klasyfikacji biodegradowalnych polimerów pochozenia naturalnego.

Uwzględniając potencjalne aplikacje, każdy materiał dedykowany zastosowaniom biomedycznym podlega szeregom analiz i badań, które umożliwiają dokładne poznanie jego właściwości fizykochemicznych. Zrozumienie właściwości polimerów opiera się na wiedzy związanej z oddziaływaniami wewnątrzcząsteczkowymi odpowiedzialnymi za właściwości chemiczne oraz międzycząsteczkowymi, często determinującymi ich właściwości fizyczne. Rozwój nauki umożliwił kontrolowaną modyfikację polimerów pochodzenia naturalnego prowadzącą do otrzymywania pochodnych wykazujących cechy naturalnych biopolimerów uzupełnione o właściwości niezbędne do stworzenia biomateriału o pożądanym parametrach. Do najpopularniejszych związków polimerowych wykorzystywanych we współczesnej biomedycynie należy skrobia, celuloza, kolagen, hialuronian i chitozan. Materiały te, z powodzeniem znajdują zastosowanie w implantologii, medycynie regeneracyjnej oraz systemach przeznaczonych do dostarczania leków.<sup>6,7,8,9,10</sup>

### 1.3. Chitozan

Chitozan stanowi liniowy polisacharyd otrzymywany na drodze chemicznej deacetylacji chityny, będącej biopolimerem naturalnie występującym w pancerzykach morskich skorupiaków, insektów oraz ścianach komórkowych niektórych bakterii i grzybów. Chitozan to liniowy polimer z grupy kopolimerów losowych/bezładnych, w którego skład wchodzi mery aminoglukozy i N-acetyloglukozy. Schemat struktury chitozanu przedstawiony został na Rysunku 3:.



**Rysunek 3** Schemat struktury chitozanu.

Do najważniejszych właściwości chitozanu w kontekście zastosowań biomedycznych należy:

- biokompatybilność,
- wysoka bioaktywność,
- lizosomalna biodegradowalność,
- nietoksyczność,
- selektywna przepuszczalność,
- aktywność przeciwbakteryjna,
- działanie przeciwnowotworowe,
- mukoadhezyjność,
- działanie hemostatyczne,
- zdolność do tworzenia żeli oraz cienkich filmów (warstw).

Zarówno chitozan, jak i sama chityna wykazują duże ograniczenia związane z ich rozpuszczalnością, fakt ten spowodował, że związki te w pierwotnej postaci nie zyskały na popularności tak jak ich pochodne. Dzięki obecności grup aminowych oraz grup hydroksylowych w łańcuchu chitozanu możliwe są jego chemiczne modyfikacje prowadzące do tworzenia związków wykazujących dodatkowe właściwości. Pochodne chitozanu otrzymywane są głównie poprzez jego acylowanie, alkilowanie, hydroksylowanie, estryfikację, sulfonowanie lub poprzez przyłączenie grup zawierających czwartorzędowe sole amoniowe. Przeprowadzenie odpowiednich modyfikacji może prowadzić do uzyskania pochodnych chitozanu wykazujących lepszą rozpuszczalność w roztworach wodnych, silne właściwości jonowe i amfifilowe. Takie rozwiązanie zostało wykorzystane w czasie badań zaprezentowanych w niniejszej pracy.

Unikatowe właściwości pochodnych chitozanu sprawiły, że związki te odnaleźć możemy w licznych zastosowaniach biomedycznych, żywności, chemii, kosmetykach oraz w procesach uzdatniania wody. Analizując chitozan w aspekcie wykorzystania jego biomedycznego potencjału wyróżnić można trzy główne nurty, które stanowią: wielofunkcyjne materiały opatrunkowe, preparaty antybakteryjne oraz układy przeznaczone do celowanego dostarczenia substancji biologicznie aktywnych.<sup>7,8,11,12,13</sup>

## **2. Nanocząstki**

Mogłoby się wydawać, że nanocząstki to odkrycie należące wyłącznie do współczesnej cywilizacji. Jednak historyczne i naukowo potwierdzono, że świadome zastosowanie unikalnych właściwości tego typu struktur miało miejsce już dużo wcześniej. Najstarszym przykładem, dokładnie opisanym przez nowożytną naukę, jest pochodzący z IV wieku rzymski Puchar Likurga. Puchar ten, znajdujący się w zbiorach Muzeum Brytyjskiego, wykonany został ze szkła dichroicznego, które w zależności od padającego światła może wykazywać zielone lub czerwone zabarwienie. Przeprowadzone w 1990 roku badania wyjaśniły, że za zjawisko to odpowiadają domieszkowane miedzią nanocząstki srebra i złota o rozmiarach między 50 a 100 nm. Zjawisko to wykorzystywane było również w witrażach pochodzących z późnego średniowiecza, islamskich szklivach ceramicznych oraz włoskiej ceramice z XVI wieku. Kolejny przykład dawnego zastosowania struktur nanometrycznych to domieszkowanie stali nanorurkami węgla, proces ten miał na celu zapewnienie lepszej wytrzymałości i sprężystości materiału przeznaczonego do tworzenia średniowiecznej broni białej. Opisywana struktura to stal damasceńska, której technologia otrzymywania została zapomniana i w dalszym ciągu nie udało się jej dokładnie odtworzyć. Laboratoryjne odkrycia sięgają drugiej połowy XIX wieku, kiedy to Michael Faraday przedstawił nanocząstki złota, które w zależności od padającego światła zmieniają kolor roztworu, w którym są zawieszone. Jednak to noblista, Richard P. Feynman, określany mianem ojca nanotechnologii oraz zaliczany do grona najwybitniejszych fizyków wszech czasów, w 1959 roku podczas corocznego spotkania Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego wygłosił wykład zatytułowany „There`s Plenty of Room at the Bottom – An invitation to enter a new field of physics” definiując nanotechnologię i umiejscawiając ją tym samym w kanonie dziedzin nauki. W kolejnych latach, dzięki pojawianiu się zaawansowanych technik badawczych oraz intensywnym pracom nad strukturami mieszczącymi się w pojęciu nanotechnologii, różnego rodzaju materiały nanocząstkowe stały się nieodzownym elementem współczesnego świata.<sup>14,15</sup>

### **2.1. Klasyfikacja nanocząstek**

Zgodnie z definicją przedstawioną przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej w 2012 roku, nanocząstki to struktury o dowolnym kształcie oraz rozmiarze, który w co najmniej dwóch wymiarach, mieści się w zakresie

**1 do 100 nm.**<sup>16</sup> Popularność cząstek o rozmiarach nanometrycznych oparta jest na ich dużej różnorodności pod względem budowy chemicznej, struktury i parametrów fizycznych.

Biorąc pod uwagę pochodzenie nanocząstek wyróżnić możemy struktury pochodzenia naturalnego oraz takie, do powstania których przyczynił się człowiek. Nanocząstki pochodzenia naturalnego powstają głównie w procesach erozji materiałów geologicznych, czy rozkładu materiałów biologicznych. Prowadzone badania wskazują również na naturalne występowanie nanocząstek w organizmach żywych, gdzie pełnią określoną rolę (np. nanocząstki magnetytu służą bakteriom do orientacji w polu ziemskim). Możliwe jest laboratoryjne odtworzenie tego typu struktur, jednak istnieją też nanocząstki, które powstają jedynie z udziałem człowieka.<sup>17,18</sup> Spośród tych struktur wyszczególnić można układy złożone z komponentów organicznych lub nieorganicznych. Nanocząstki można klasyfikować również uwzględniając ich budowę przestrzenną lub właściwości fizyczne.<sup>19</sup>

## **2.2. Nanocząstki magnetyczne tlenków żelaza**

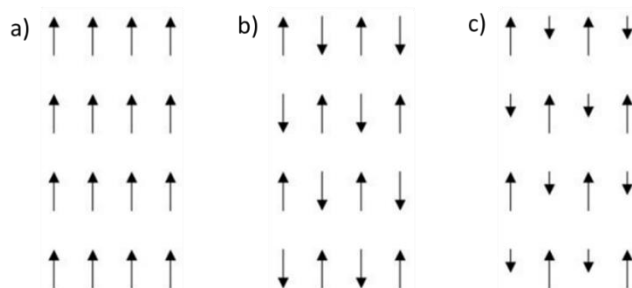
Unikalne własności nanocząstek magnetycznych sprawiły, że w ciągu ostatnich dwóch dekad, układy te stały się bardzo istotnym nanomateriałem w dziedzinie nauki i technologii. Szczególna uwaga skierowana jest na struktury tworzone przez tlenki żelaza, które znajdują miejsce w licznych badaniach ukierunkowanych na potencjalne aplikacje biomedyczne.<sup>20</sup> To właśnie odpowiednia specyfika właściwości fizycznych spowodowała, że w realizacji niniejszej pracy, wykorzystane zostały nanocząstki magnetyczne tlenków żelaza.

### **2.2.1. Podstawowe definicje związane z magnetyzmem nanocząstek**

Fizyczne podejście do zjawiska jakim jest magnetyzm rozpatrywać można w dwóch aspektach. W podejściu **makroskopowym**, gdzie oddziaływania magnetyczne wytwarzane są na skutek działania prądu elektrycznego lub w podejściu **mikroskopowym** - tutaj za powstałe pole magnetyczne odpowiedzialny jest głównie ruch elektronów wokół własnej osi - tworzący spinowy moment magnetyczny. Istnieją również inne czynniki mikroskopowe wpływające w pewnym stopniu na wytwarzane pole magnetyczne tj. orbitalny moment magnetyczny, wynikający z ruchu elektronów dookoła jądra atomowego i moment magnetyczny

neutronów i protonów w jądrze. Wszystkie te składowe sumują się tworząc **wypadkowy moment magnetyczny** determinujący zachowanie magnetyka w obecności zewnętrznego pola magnetycznego. Spośród wielu typów magnetyzmu wyróżnić należy 5 podstawowych zjawisk, do których należą: diamagnetyzm, paramagnetyzm, ferromagnetyzm, antyferromagnetyzm i ferrimagnetyzm. Materiały **diamagnetyczne** wykazują ujemną podatność magnetyczną wynikającą zapełnionych orbitali (pasm) elektronów w atomach występujących w strukturze, skutkującej brakiem trwałych momentów magnetycznych. Elektryczne prądy orbitalne elektronów w diamagnetykach, w obecności zewnętrznego pola magnetycznego, dążą do częściowego ekranowania wnętrza ciała, co skutkuje ich wypychaniem z zewnętrznego pola magnetycznego. Właściwości diamagnetyczne występują w przeważającej liczbie związków, jednak zazwyczaj dominowane są przez zwykle silniejsze przeciwne zjawisko nazywane paramagnetyzmem. Materiały **paramagnetyczne** w swojej strukturze posiadają atomy, cząsteczki lub defekty sieci krystalicznej generujące nieparzystą liczbę elektronów, co występuje w metalach i tlenkach pierwiastków grup przejściowych, a wyjątkowo w niektórych związkach lub pierwiastkach o parzystej liczbie elektronów (np. tlen cząsteczkowy). W przypadku braku obecności zewnętrznego pola magnetycznego paramagnetyki wykazują nieuporządkowanie momentów magnetycznych i wypadkowy moment magnetyczny równy zero, dopiero przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego skutkuje ich częściowym uporządkowaniem. Podatność magnetyczna większości materiałów paramagnetycznych zależy od temperatury (wyjątkiem są niektóre metale będące pasmowymi paramagnetykami Pauliego o podatności niezależnej od temperatury) zdefiniowanej jako temperatura Curie, poniżej której paramagnetyk przechodzi do stanu ferromagnetycznego. W stanie **ferromagnetycznym** obserwowany jest spontaniczny moment magnetyczny, tzn. taki który występuje nawet przy braku zewnętrznego pola magnetycznego. Momenty magnetyczne w materiale ferromagnetycznym ułożone są w sposób regularny (równoległy w obszarach zwanych domenami) i zwykle niekompensujący się wzajemnie, nadając tym samym całej strukturze niezerowy wypadkowy moment magnetyczny. Materiał taki umieszczony w zewnętrznym polu magnetycznym (niejednorodnym) ulega silnemu przyciąganiu w kierunku największego pola. W materiałach **ferrimagnetycznych** dwa (lub więcej) rodzaje momentów magnetycznych ułożone są wzajemnie antyrównoległe, i nie kompensują się do zera, w przeciwieństwie do materiałów **antyferromagnetycznych**, w których takie same momenty magnetyczne są sprzężone antyrównoległe. Materiały antyferromagnetyczne wykazują przejście fazowe do układu paramagnetycznego powyżej temperatury nazywanej temperaturą Neela. Uporządkowanie momentów magnetycznych

w materiałach ferromagnetycznych, antyferromagnetycznych i ferrimagnetycznych przedstawia Rysunek 4.



**Rysunek 4** Uporządkowanie momentów magnetycznych w materiale: a) ferromagnetycznym, b) antyferromagnetycznym, c) ferrimagnetycznym.

Ograniczenie rozmiaru struktury do wielkości nanometrowych skutkuje pojawieniem się kolejnego rodzaju magnetyzmu nazywanego **superparamagnetyzmem**, który w przybliżony sposób można porównać do paramagnetyzmu, ze znaczną różnicą wartości momentu magnetycznego. Szczegółowy opis tego zjawiska znajduje się w podrozdziale 1.1.2.

Przy opisie zjawisk oraz parametrów, które występują w badanych materiałach magnetycznych niezbędna jest znajomość pojęć wyjaśnionych poniżej. **Indukcja magnetyczna (B)**, czyli wielkość wektorowa związana z **natężeniem pola magnetycznego (H)**. Zależność łącząca oba parametry wyraża się wzorem:

$$B = \mu H \quad \text{Równanie 1}$$

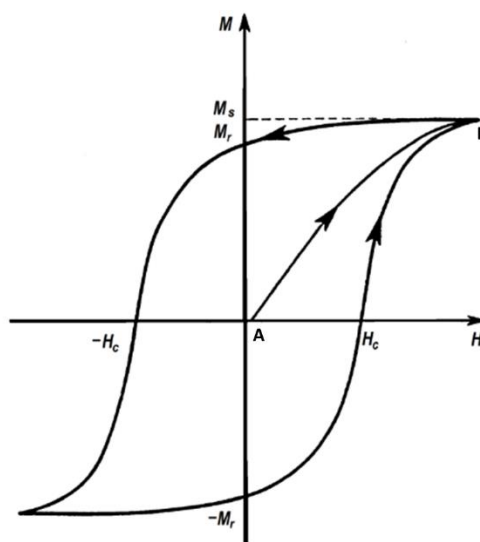
gdzie:  $\mu$  - przenikalność magnetyczna ośrodka [henr/metr, H/m].

Jednostką indukcji magnetycznej jest Tesla [T], a natężenia pola magnetycznego amper na metr [A/m]. **Moment magnetyczny (m)** to moment siły działający na magnes ustawiony prostopadle do linii pola magnetycznego o jednostkowym natężeniu, którego jednostką jest  $\text{Am}^2$ , a w układzie cgs, emu (*ang.* electromagnetic unit of magnetic moment). **Magnetyzacja (M)** to moment magnetyczny w jednostce objętości równej  $1 \text{ cm}^3$ . Związek między magnetyzacją i indukcją magnetyczną wyraża się wzorem:

$$B = \mu(H + M) \quad \text{Równanie 2}$$

**Magnetyzacja nasycenia ( $M_s$ )** to maksymalna osiągalna wartość magnetyzacji, świadcząca o uporządkowaniu momentów magnetycznych na skutek przyłożonego zewnętrznego pola magnetycznego. Parametr opisujący zmianę momentu

magnetycznego w funkcji natężenia przyłożonego pola magnetycznego określa **podatność magnetyczna ( $\chi$ )**. Natężenie pola potrzebne do całkowitego rozmagnesowania magnetyka to **pole koercji ( $H_c$ )**. Duża wartość tego parametru świadczy, że badany materiał to magnes trwały. Natomiast, wartość indukcji magnetycznej pozostała w materiale po usunięciu zewnętrznego pola magnetycznego to **remanencja**. Przebieg magnesowania materiału w funkcji przyłożonego pola przedstawia **pętla histerezy**, którą można określić na podstawie pomiarów magnetometrycznych. Podczas takiego pomiaru uzyskuje się również **krzywą pierwotnego magnesowania**, która powstaje przy pierwszym pomiarze, od stanu zerowego natężenia pola magnetycznego. Kształt tej krzywej pozwala na określenie typu mechanizmu zjawiska koercji. Otrzymana pętla umożliwia określenie istotnych parametrów magnetycznych badanego materiału, przykładowa pętla histerezy przedstawiona została na Rysunku 5:.



**Rysunek 5** Krzywa magnesowania ferromagnetyka: odcinek A-B – krzywa pierwotnego magnesowania,  $M_s$  – magnetyzacja nasycenia,  $H_c$  – pole koercji,  $M_r$  – remanencja.

**Anizotropia magnetyczna** to zależność właściwości magnetycznych od kierunku w którym są one badane. W materiałach magnetycznych wyróżnić można kilka rodzajów anizotropii np. magnetokrystaliczną, kształtu, wymiany, powierzchniową. Anizotropię wypadkową stanowi suma wszystkich rodzajów anizotropii występujących w danym materiale. Modyfikacje właściwości fizykochemicznych, takich jak np. kształt, rozmiar lub skład fazowy, układów magnetycznych silnie wpływają na zmiany poszczególnych anizotropii, czyli jednocześnie wypadkowej



anizotropii magnetycznej, a co się z tym wiąże na właściwości magnetyczne materiału.

Warto również podkreślić, że w dziedzinie magnetyzmu wykorzystuje się równoległe dwa systemy jednostek: **cgs** (centymetr-gram-sekunda) oraz **SI** (*fr.* *Système international d'unités*).<sup>21,22,23</sup>

### 1.1.1. Tlenki żelaza - struktura i podstawowe właściwości

Tlenki żelaza to bardzo popularne związki występujące naturalnie w przyrodzie oraz często otrzymywane laboratoryjnie. Wyróżnić można 6 typów tlenków żelaza, spośród których 4 występują naturalnie. Zaliczamy do nich: hematyt, magnetyt, maghemit i wustyt, zdjęcia próbek wymienionych związków przedstawione zostały na Rysunku 6:.

**Hematyt** ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) to najwcześniej odkryty tlenek żelaza występujący naturalnie w glebie i skałach charakteryzujący się bardzo dużą stabilnością. Krystalizuje w strukturze heksagonalnej gęstego upakowania. W temperaturze poniżej przejścia Morina (~260 K) wykazuje właściwości antyferromagnetyczne, natomiast pomiędzy tym przejściem, a temperaturą Neela (~984 K) słaby ferromagnetyzm wynikający z nieidealnego uporządkowania (odchylenia od idealnego) kierunków spinów.

**Magnetyt** (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) to minerał o strukturze odwróconego spinelu, krystalizujący w strukturze regularnej sześciennej powierzchniowo centrowanej, występujący w skałach oraz organizmach żywych, odpowiadając za nawigację geomagnetyczną (np. pszczoł i ptaków).<sup>24</sup> Poniżej temperatury Curie (~860 K) wykazuje właściwości ferrimagnetyczne, natomiast w temperaturze ~120 K przechodzi transformację strukturalną Verweya do układu rombowego, która znacząco obniża jego przewodnictwo elektryczne.

**Maghemit** ( $\gamma$ - Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) stanowi minerał o strukturze analogicznej jak magnetyt z dodatkowymi wakancjami kationowymi, krystalizujący w strukturze regularnej sześciennej oraz podobnie jak magnetyt, poniżej temperatury Curie (~900 K) wykazujący właściwości ferrimagnetyczne. W przeciwieństwie do magnetytu jest izolatorem. Powstaje w glebach jako produkt wietrzenia skał zawierających magnetyt.

**Wustyt** (FeO) występuje naturalnie w płaszczu skorupy ziemskiej, jako zwykle niestechiometryczny związek o strukturze krystalicznej regularnej powierzchniowo centrowanej, analogicznej do struktury chlorku sodu. Poniżej temperatury Neela (~200 K) wykazuje właściwości antyferromagnetyczne. Jest to związek

metastabilny, który w lekko podwyższonej temperaturze i warunkach atmosferycznych ulega utlenieniu.<sup>25,26</sup>



**Rysunek 6** Zdjęcia tlenków żelaza: a) hematyt, b) magnetyt, c) maghemit, d) wustyt.<sup>27,28,29,30</sup>

### 1.1.2. Właściwości nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza

Nanotechnologiczne podejście w badaniach naukowych opiera się nie tylko na samej potrzebie nanometryzacji niektórych z tworzonych struktur, ale głównie na konsekwencjach wynikających ze znacznego zmniejszenia rozmiaru badanych układów. Okazuje się bowiem, że przejście do skali nanometrowej niesie za sobą szereg zjawisk, które nie występują w skali makroskopowej. To właśnie nowe właściwości tworzonych materiałów, wraz z ich niewielkim rozmiarem sprawiają, że nanocząstki tlenków żelaza wydają się być bardzo atrakcyjne w kontekście nowych rozwiązań technologicznych, w tym biomedycznych. Magnetyczne właściwości nanocząstek są silnie determinowane przez ich rozmiar, budowę, kształt, skład fazowy, mikrostrukturę i rodzaj zastosowanego pokrycia. Parametry te w sposób bezpośredni wpływają na dwa kluczowe zjawiska rozpatrywane w aspekcie nanocząstek magnetycznych, **powierzchniowe** (*ang.* surface effects) i związane z **ograniczonym rozmiarem struktur** (*ang.* finite-size effects).

**Ograniczenie rozmiaru nanocząstek**, prowadzące do przejścia do skali nanometrowej, skutkuje pojawieniem się dwóch głównych efektów określanych jednodomenowością i superparamagnetyzmem. W przypadku materiałów magnetycznych o rozmiarach większych niż rozmiary nanostruktur wyróżnić można układy składające się z wielu domen o różnych kierunkach lokalnej magnetyzacji. Ograniczenie rozmiaru tego typu układów powoduje pojawienie się krytycznej objętości, dla której utworzenie ściany oddzielającej domeny magnetyczne wymaga więcej energii niż utrzymanie zgromadzonej w domenie energii magnetostatycznej. Osiągnięcie takiego stanu powoduje przejście do układów **jednodomenowych**, które wykazują jednorodną magnetyzację w obrębie całej swojej objętości. W przypadku jednodomenowych materiałów ferromagnetycznych, przy braku zewnętrznego pola magnetycznego moment magnetyczny skierowany jest wzdłuż osi łatwej, którą wyznacza całkowita anizotropia magnetyczna cząstki. W 1930 roku zjawisko to zostało opisane przez Frenkla i Dorfmana, a następnie w latach 40. XX wieku dopracowane w opisach matematycznych przez Kittela i Neela oraz w modelu Stonera i Wohlfartha. Eksperymentalne obserwacje układów jednodomenowych doprowadziły, w 1950 roku, Beana i Livingstona do zdefiniowania pojęcia **superparamagnetyzmu**. Fizyczne wyjaśnienie tego zjawiska oparte jest o barierę energetyczną (związaną z rozmiarem i stałą anizotropii nanocząstki), która oddziela dwa sąsiednie kierunki łatwego namagnesowania o równych energiach. Odpowiednia energia termiczna (odpowiednio wysoka temperatura) umożliwia pokonanie tej bariery, co skutkuje spontaniczną fluktuacją wektora magnetyzacji cząstki od jednego kierunku łatwego do drugiego. Jednocześnie momenty magnetyczne obecnych w niej atomów pozostają nadal sprzężone oddziaływaniami wymiennymi, natomiast wektor wypadkowej magnetyzacji ulega fluktuacjom termicznym, a jego wartość jest uśredniona do zera (w skali czasowej - rzędu sekund lub dłuższej). Przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego prowadzi do wygaszenia fluktuacji i wymuszonej orientacji momentów magnetycznych cząstek wzdłuż kierunku przyłożonego pola – powstania niezerowego namagnesowania. Usunięcie pola powoduje spadek namagnesowania do zera, co przy pomiarze pętli histerezy przejawia się zerowym polem  $H_c$ , czyli brakiem histerezy. Temperatura poniżej której materiał traci właściwości superparamagnetyczne i zachowuje się jak ferro/ferrimagnetyk (histereza), to **temperatura blokowania**. Wystąpienie **efektów powierzchniowych** związane jest ze zwiększonym stosunkiem powierzchni do objętości nanocząstki pojawiającym się poprzez zmniejszenie jej rozmiaru. Efekty te prowadzić mogą do obniżenia magnetyzacji struktur nanometrycznych w odniesieniu do większych układów zbudowanych z tych samych komponentów. Za bezpośrednią przyczynę spadku magnetyzacji

odpowiedzialnych może być wiele mechanizmów np. obecność paramagnetycznej warstwy na powierzchni nanocząstek. Ponadto, zwiększenie stosunku powierzchni do objętości przyczynia się do zwiększenia udziału anizotropii powierzchniowej powodując tym samym zwiększenie całkowitej anizotropii magnetycznej.

31,31,32,33,34,35

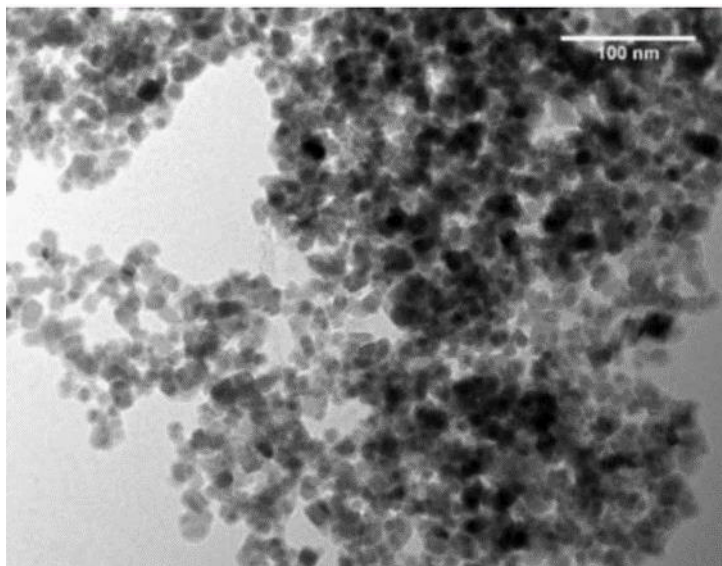
### 1.1.3. Preparatyka nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza

W nanotechnologicznym podejściu do metod tworzenia nowych struktur wyróżnić można dwie konkurencyjne ścieżki: **top-down** i **bottom-up**. Pierwsze rozwiązanie polega na tworzeniu nanostruktur poprzez zmniejszanie rozmiaru większych materiałów, natomiast podejście drugie bazuje na tworzeniu nanoukładów poprzez łączenie pojedynczych atomów i cząsteczek. Wśród licznych dostępnych rozwiązań stosowanych w preparatyce nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza, dokonać można również podziału na metody fizyczne, chemiczne oraz metody mikrobiologiczne. **Metody fizyczne** opierają się na podejściu *top-down*, a do najpopularniejszych technik zaliczyć można **metodę aerozolową, osadzanie z fazy gazowej, laserowo indukowaną pirolizę, mielenie, ablację laserową i elektronolitografię**. Wymienione tutaj techniki pozwalają na otrzymywanie nanocząstek o bardzo czystym składzie fazowym, różnych rozmiarach i kształtach, jednak posiadają one również pewne ograniczenia związane z kontrolą rozmiaru oraz wysokimi kosztami. Podejście oparte na ścieżce *bottom-up* obejmuje różnorodne **metody chemiczne**, które stanowią najpopularniejszy trend w technikach prowadzących do otrzymywania nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza. Do najpopularniejszych metod chemicznych należą współstrącanie, metoda mikroemulsyjna, hydrotermalna, sonochemiczna oraz termiczna dekompozycja. Ze względu na stosunkową prostotę i niewielki koszt, najczęściej wykorzystywaną metodą otrzymywania nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza jest **metoda współstrąceniowa**. Metoda ta opiera się na reakcji prekursorów zawierających jony żelaza  $Fe^{2+}$  i/lub  $Fe^{3+}$  (np. chlorki żelaza) z zasadą (np. wodorotlenek sodu, amoniak) prowadząc do uzyskania tlenków żelaza. Zachodzącą reakcję pozwalającą uzyskać  $Fe_3O_4$  można opisać równaniem:



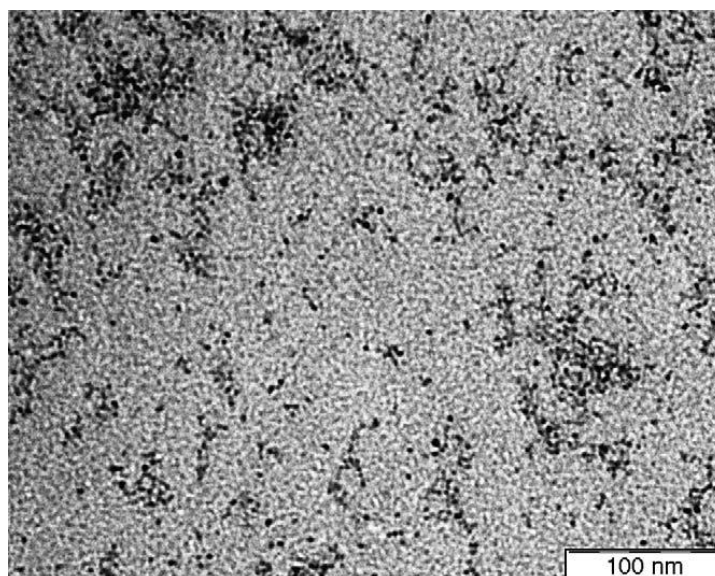
Właściwości fizykochemiczne otrzymywanych nanocząstek są silnie zależne od parametrów reakcji, tj. pH, stężenia prekursora i zasady, temperatury i siły jonowej. Otrzymywane struktury mogą być niewielkiego rozmiaru, jednak jego

rozkład (rozrzut) może być stosunkowo szeroki, a same nanocząstki wykazują tendencję do agregacji. Zdjęcie TEM nanocząstek tlenku żelaza pokrytych poli(kwasem glikolowym) otrzymanych metodą współstrącania przedstawia Rysunek 7.



**Rysunek 7** Zdjęcie TEM nanocząstek tlenku żelaza otrzymanych metodą współstrącaniową.<sup>36</sup>

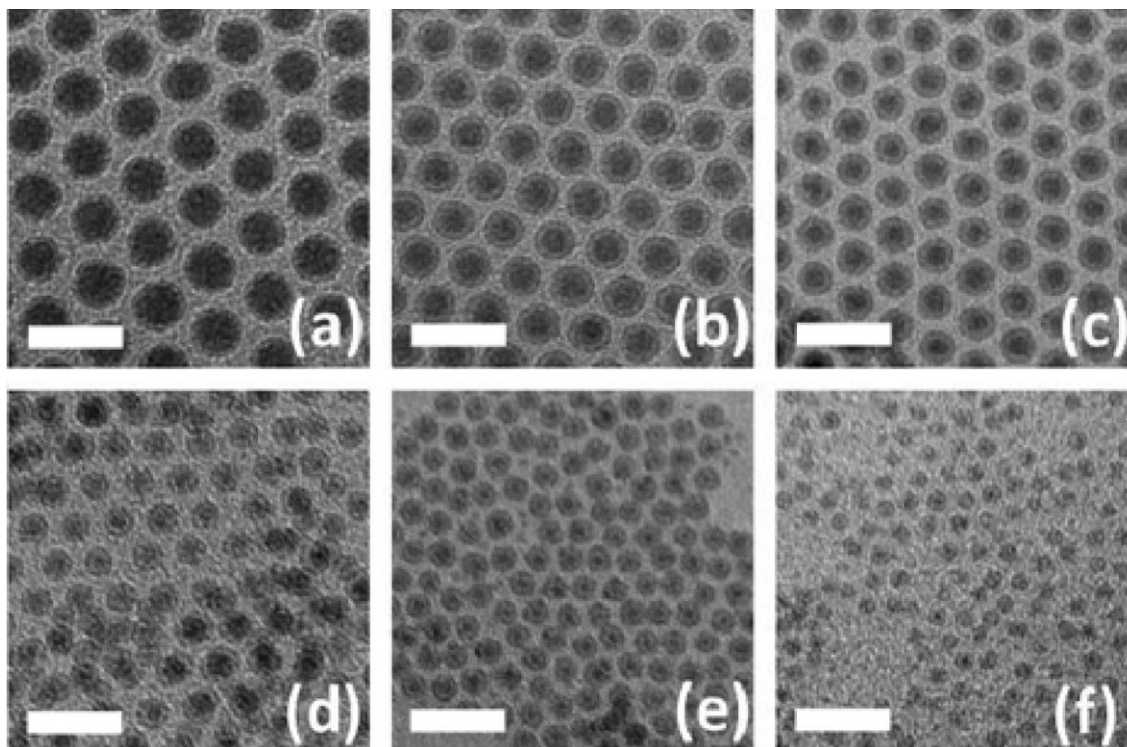
W **metodzie mikroemulsyjnej** wykorzystywana jest zawiesina kropeł wody w fazie olejowej stabilizowanych za pomocą surfaktanta. W fazie wodnej, stanowiącej nanoreaktor, znajdują się sole żelaza zawierające jony  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ , krople wody ulegają ciągłym zderzeniom i koalescencji, które prowadzą do kontrolowanego procesu nukleacji i wzrostu krystalitów skutkujących utworzeniem produktu w postaci nanocząstek tlenków żelaza. Otrzymywane struktury zwykle wykazują niewielki rozmiar (4-15 nm), właściwości superparamagnetyczne oraz dużą magnetyzację. Do ograniczeń związanych z opisywaną metodą zaliczamy problemy z usunięciem zastosowanego surfaktanta oraz niską wydajność metody. Zdjęcie maghemitowych nanocząstek magnetycznych pokrytych oleiloaminą otrzymanych metodą mikroemulsyjną przedstawione zostało na Rysunku 8:.



**Rysunek 8** Zdjęcie TEM nanocząstek tlenku żelaza otrzymanych metodą mikroemulsyjną.<sup>37</sup>

Do bardziej skomplikowanych metod, wymagających zastosowania specjalistycznej aparatury należy metoda **hydrotermalna**. W technice tej reakcje zmierzające do otrzymania nanocząstek prowadzone są w warunkach wysokiego ciśnienia i temperatury ( $>200^{\circ}\text{C}$ ), warunki te umożliwiają krystalizację w roztworach wodnych lub rozpuszczalnikach organicznych. Sterowanie parametrami reakcji pozwala na tworzenie nanostruktur o różnorodnych kształtach i rozmiarach. W **metodach sonochemicznych** wykorzystywane są ultradźwięki, które, poprzez zjawisko kawitacji akustycznej, umożliwiają dekompozycję organometalicznego prekursora. Kawitacja przyczynia się do stworzenia warunków reakcji umożliwiających otrzymywanie nanocząstek o zróżnicowanym kształcie i dobrze zdefiniowanej morfologii, jednak proces ten jest wysoce energochłonny i problematyczny w kwestii przeniesienia do większej skali.<sup>38,39,40</sup> Metoda syntezy oparta na **termicznej dekompozycji** organometalicznego prekursora (np. oleinian żelaza(III), tlenowodorotlenek żelaza(III), pentakarbonyłek żelaza) prowadzona jest w wysokich temperaturach, warunkach gazu obojętnego, w obecności rozpuszczalnika organicznego z wysoką temperaturą wrzenia (np. toluen, heksan) i surfaktanta (np. heksadecyloamina, kwas oleinowy, oleiloamina). Kontrolowane zmiany temperatury w czasie prowadzenia reakcji umożliwiają oddzielenie etapu zarodkowania i etapu krystalizacji, co skutkuje powstawaniem struktur o dobrze zdefiniowanym kształcie i rozmiarze. Metoda termicznej dekompozycji jest techniką bardzo czułą na jakiegokolwiek zmiany parametrów reakcji, jednakże dzięki tej wrażliwości możliwe jest otrzymywanie nanocząstek o różnorodnych rozmiarach, kształtach, składzie fazowym

i właściwościach magnetycznych.<sup>41,42,43</sup> Zdjęcia nanocząstek magnetycznych otrzymanych metodą termicznej dekompozycji przy różnych parametrach reakcji przedstawia Rysunek 9.

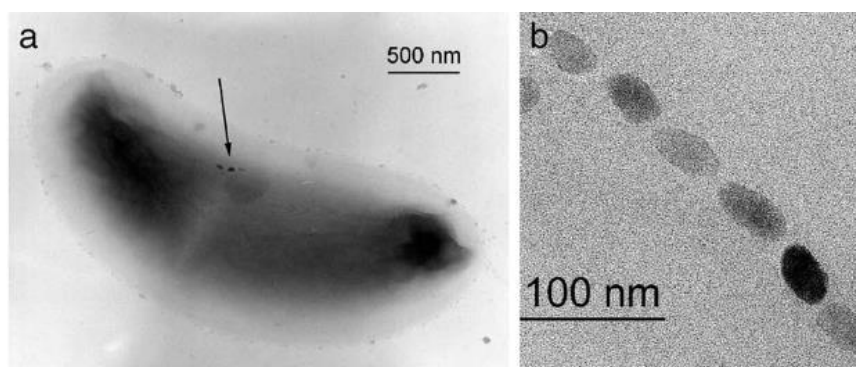


**Rysunek 9** Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych syntezowanych metodą termicznej dekompozycji prekursora  $\text{Fe}(\text{CO})_x$ -oleiloamina przy różnych parametrach reakcji: a) 30°C przez 1 minutę, b) 30°C przez 60 minut, c) 30°C przez 180 minut, d) 70°C przez 60 minut, e) 100°C przez 60 minut, f) 130°C przez 60 minut. Skala 20 nm.<sup>44</sup>

Przedstawione powyżej metody syntezy nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza mogą być dodatkowo wspomagane przez inne techniki, takie jak np. działanie mikrofal, zewnętrznego pola magnetycznego czy dodatkowe wygrzewanie. Wzbogacenie procedury preparatyki nanocząstek o dodatkowe etapy skutkować może zmniejszeniem czasu potrzebnego na przeprowadzenie syntezy, zwiększeniem jej wydajności lub modyfikacją właściwości fizykochemicznych otrzymywanych układów.<sup>45,46,47</sup>

Magnetyczne nanocząstki tlenków żelaza można również otrzymywać poprzez **metody mikrobiologiczne** polegające na procesach biologicznych zachodzących w żywych organizmach. Nanocząstki magnetyczne powstawać mogą w oparciu o **biologicznie indukowaną biomineralizację** lub o **biologicznie kontrolowaną biomineralizację**. Wykorzystanie metody BIM umożliwia zewnątrzkomórkowe tworzenie nanocząstek, które powstają z wydzielonych na zewnątrz produktów

metabolizmu komórki. Metabolity reagują ze związkami znajdującymi się w medium lub zaadsorbowanymi na ścianie komórkowej tworząc nanocząstki magnetytu. Otrzymane struktury charakteryzują się dużym rozkładem rozmiaru i brakiem klarownej morfologii krystalicznej. Do najpopularniejszych przykładów bakterii zdolnych do częściowej redukcji  $Fe^{3+}$  należą *Geobacter metallireducens* i *Shewanella putrifaciens*. Rysunek 10 przedstawia krystality magnetytu i nanocząstki magnetyczne wytworzone przez bakterie *Desulfovibrio magneticus*.



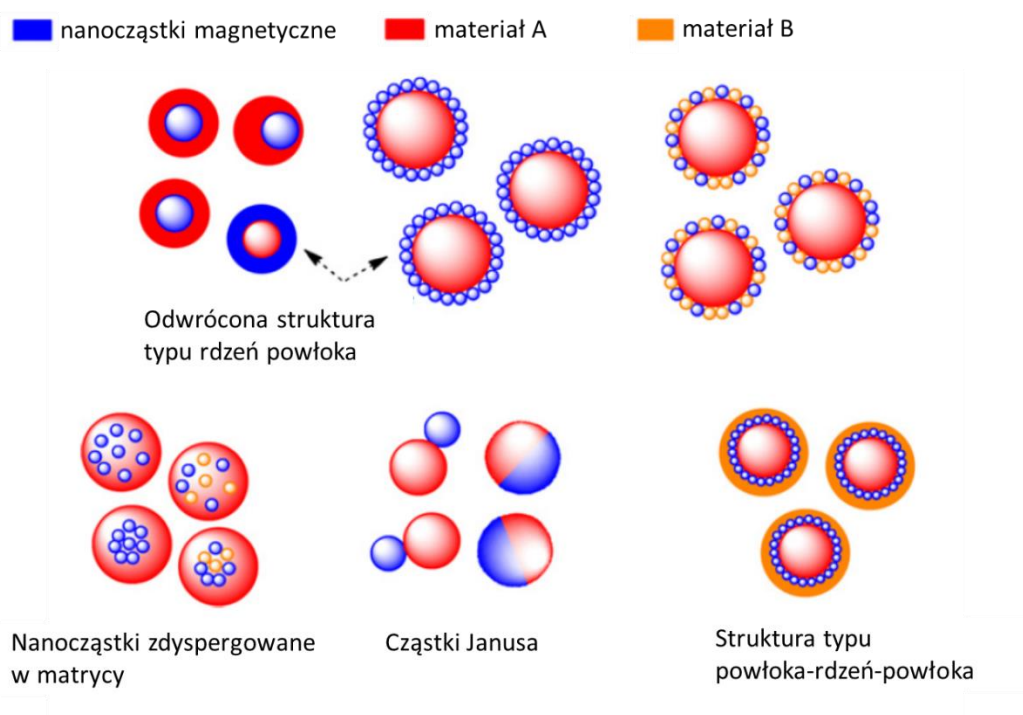
**Rysunek 10** Zdjęcia TEM: a) krystalitów magnetytu (zaznaczone strzałką) wewnątrz bakterii *D. magneticus*, b) utworzonych przez bakterię *D. magneticus* nanocząstek magnetytu.<sup>48</sup>

W metodzie BCM nanocząstki tworzone są wewnątrzkomórkowo w procesie kontrolowanym przez mikroorganizm (np. bakterie *Magnetospirillum magnetotactium*, *Desulfovibrio magneticus*). Proces zachodzi poprzez transport wyselekcjonowanych jonów do odpowiedniego miejsca w cytoplazmie lub ścianie komórkowej, następnie po osiągnięciu przesylenia tymi jonami zachodzi nukleacja. Proces ten kontrolowany jest poprzez, odpowiednie dla danych jonów, ligandy. Otrzymane nanocząstki wykazują dobrze uporządkowaną strukturę krystaliczną i wąski rozkład rozmiarów.<sup>49,50</sup>

Przedstawione powyżej przykłady metod preparatyki potwierdzają, że wybór odpowiedniej techniki otrzymywania nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza umożliwia pozyskiwanie struktur o ściśle określonych właściwościach, ponieważ starannie przeprowadzona procedura pozwala na tworzenie układów o różnych parametrach fizykochemicznych, przy uwzględnieniu ich wysokiej stabilności, kontrolowanego kształtu i rozmiaru. Niestety, tego typu struktury, ze względu na swój niewielki rozmiar, wykazują tendencję do agregacji, która prowadzi do redukcji ich energii powierzchniowej oraz ulegają utlenianiu skutkującym pogorszeniem właściwości magnetycznych. W związku z tym niezbędne okazuje się



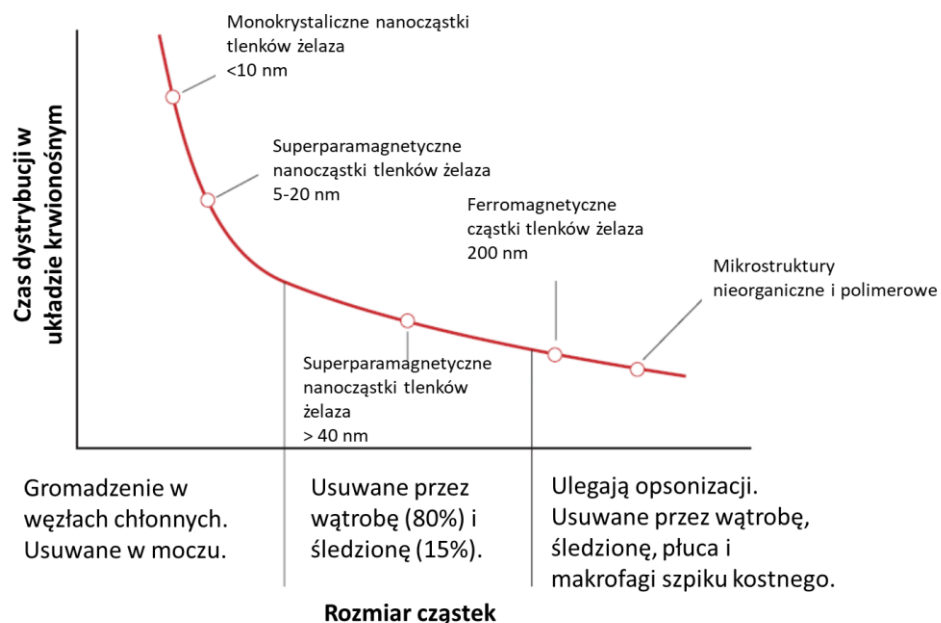
zastosowanie odpowiedniego **pokrycia nanocząstek**, które zapewnia ich ochronę przed agregacją oraz umożliwia specyficzną funkcjonalizację, przy uwzględnieniu potencjalnego zastosowania układów. W tym celu, najczęściej już na etapie syntezy, stosowane są odpowiednie związki, które po przeprowadzonej procedurze stanowią zewnętrzną barierę ochronną nanostruktur. Stabilizacja nanocząstek możliwa jest również poprzez umieszczenie struktur magnetycznych wewnątrz odpowiedniej matrycy albo poprzez utworzenie cząstek Janusa. Różne strategie stabilizacji tego typu układów przedstawione zostały na Rysunku 11:. W wielu przypadkach odpowiednio pokryte nanocząstki poddawane są dalszej funkcjonalizacji, która w przypadku aplikacji biomedycznych ma na celu zniwelowanie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego, utworzenie specyficjnej interakcji z komórkami organizmu, zmniejszenie toksyczności oraz zapewnienie optymalnej biodostępności.<sup>51,52</sup>



**Rysunek 11** Schemat ilustrujący różne strategie stabilizacji nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza (kolor niebieski: magnetyczne nanocząstki, kolor czerwony i żółty: materiały wykorzystane do stabilizacji). [opracowane na podstawie <sup>20]</sup>

### 1.1.4. Nanocząstki magnetyczne tlenków żelaza – zastosowania biomedyczne

Zastosowanie nanocząstek magnetycznych w charakterze układów dedykowanych biomedycznym aplikacjom zawęża w sposób znaczący spektrum pożądanych właściwości fizykochemicznych. Przede wszystkim, układy te, w temperaturze pokojowej lub fizjologicznej, powinny wykazywać właściwości **superparamagnetyczne, wysoką stabilność w środowisku o pH=7, ściśle określony rozmiar i ładunek powierzchniowy** oraz **brak toksyczności**.<sup>53</sup> Parametry te w sposób znaczący wpływają na zachowanie nanostruktur w warunkach *in vivo*. Ponadto **odpowiednia biodystrybucja** oraz **czas cyrkulacji** nanocząstek w organizmie są determinowane głównie przez architekturę powierzchni oraz rozmiar nanostruktur i są ograniczane przez zjawisko opsonizacji oraz działanie układu fagocytarnego. Przeprowadzone badania wskazują, że układy o rozmiarach przekraczających 200 nm, poprzez filtrację, zostają wychwycone przez śledzionę i wątrobę, natomiast struktury o rozmiarach poniżej 10 nm są wydalane przy udziale nerek. Jako optymalny rozmiar, umożliwiający skuteczną biodystrybucję nanocząstek w organizmie, przyjmuje się wartość w granicy 10-100 nm. Rysunek 12 obrazuje wpływ wielkości struktur na ich dystrybucję w organizmie.

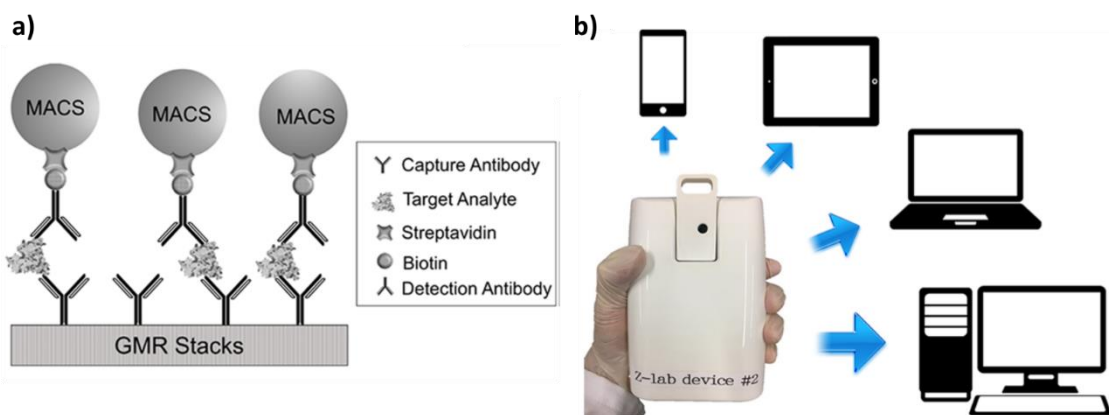


**Rysunek 12** Schemat ilustrujący zależność pomiędzy rozmiarem cząstek, a dystrybucją w organizmie. [opracowane na podstawie <sup>54</sup>]

Spośród związków stosowanych najczęściej w charakterze pokryć nanocząstek tlenków żelaza wyróżnić należy dekstran, poloksamery i poli(glikol etylenowy). Obecność tych substancji zapewnia omawianym nanostrukturom stabilność oraz osłabienie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego.<sup>55</sup> Kolejnym fundamentalnym zagadnieniem rozważanym przy zastosowaniu nanocząstek w kontekście biomedycznym jest ich toksyczność. Zaprezentowane przez Gupta *et al.* wyniki badań wskazują na silną zależność pomiędzy stężeniem, a toksycznością badanych układów. Przeprowadzone eksperymenty dotyczące nanocząstek pokrytych poli(glikolem etylenowym) potwierdzają możliwość stosowania układów, które nie wykazują toksyczności, a nawet są biokompatybilne względem badanych komórek.<sup>56</sup> Podobne obserwacje zostały przedstawione przez inne zespoły badawcze opisujące brak toksyczności nanocząstek tlenków żelaza z różnymi pokryciami i większymi stężeniami.<sup>57</sup> Silna zależność pomiędzy koncentracją nanocząstek, a odpowiedzią organizmu związana jest z oddziaływaniem pomiędzy strukturami a komponentami komórkowymi. Pojawienie się nanocząstek tlenków żelaza wewnątrz komórki, powoduje uwolnienie żelaza z nanocząstek poprzez działanie lizosomów w sprzyjającym wewnątrz nich kwaśnym środowisku, a następnie transport jonów do cytozolu przez odpowiednie białko transportowe. W płynie wewnątrzkomórkowym może zachodzić szereg reakcji prowadzących do utworzenia białek odpowiedzialnych za magazynowanie żelaza, jednakże w przypadku zbyt wysokiego stężenia jonów żelaza może wystąpić zjawisko stresu oksydacyjnego, które przyczynia się do nekrozy komórki.<sup>58</sup> Liczne grupy naukowców publikują nowe informacje z zakresu zjawisk zachodzących w organizmie wywołanych obecnością nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza, prezentowane wyniki prowadzą do jednego wniosku: błędnym byłoby ogólne przypisanie wszystkim tego typu układom braku toksyczności, niemniej jednak możliwe jest ich stosowanie w kontekście aplikacji biomedycznych; jednak ze względu na różnorodność proponowanych rozwiązań, każdy układ wymaga dokładnej, indywidualnej charakterystyki oraz szeregu badań biologicznych.<sup>50,59,60,61,62</sup>

Pomimo braku jednoznacznej odpowiedzi odnośnie zachowania się nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza w warunkach biologicznych, wielu naukowców skierowało swoją uwagę na tego typu układy. Proponowane rozwiązania podzielić można na te, które stosowane są w **diagnostyce** oraz na układy stosowane w **terapii**. Odpowiednio wczesne wykrycie choroby w organizmie w sposób znaczący zwiększa szanse na skuteczne wyleczenie. Dlatego też rozwój narzędzi diagnostycznych stanowi istotny aspekt w dziedzinie nowoczesnych technologii. Intensywnie rozwijającą się techniką wykorzystującą nanocząstki magnetyczne

w wykrywaniu schorzeń są **magnetyczne biosensory**. Zmiany zachodzące w komórkach organizmu monitorować można poprzez wykorzystanie sensorów magnetorezystywnych bazujących na **gigantycznym magnetooporze**, który obserwowany jest w układach zbudowanych z naprzemiennie ułożonych warstw ferromagnetyka i niemagnetycznych warstw metali. Najczęściej stosowane magnetyczne testy immunologiczne opierają się na reakcji przeciwciało-antygen. Przykładem takiego układu jest opracowany przez Wu *et al.* Biosensor Z-lab.<sup>63</sup> Działanie urządzenia polega na wychwycie odpowiedniego antygenu przez przeciwciała, które znajdują się na powierzchni sensora, a następnie przyłączenie do niego przeciwciała detekcyjnego połączonego z odpowiednio sfunkcjonalizowaną magnetyczną nanocząstką tlenku żelaza. Pod wpływem działania zewnętrznego pola magnetycznego zachodzi magnesowanie nanocząstek, co umożliwia ich wykrycie przez sensor. Urządzenie Z-lab zaprojektowane zostało z myślą o wykrywaniu wirusa *Influenzavirus A*, który wywołuje ptasią grypę i świńską grypę. Otrzymywane dane mogą być zbierane bezprzewodowo do smartfonu, tabletu, laptopa lub poprzez połączenie USB do komputera. Rysunek 13 przedstawia schemat budowy oraz omawiany biosensor.

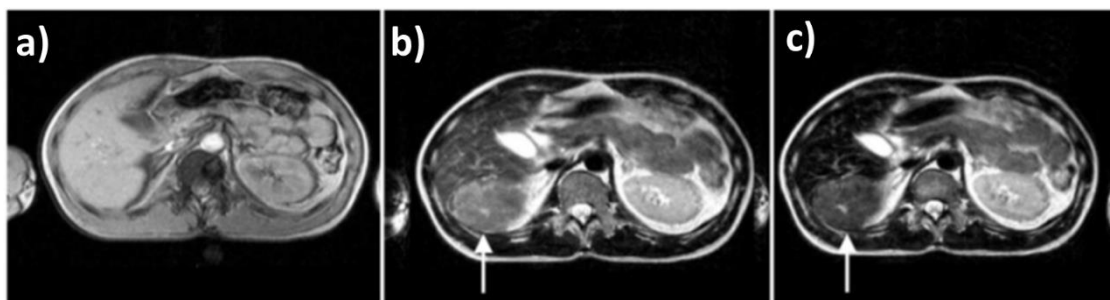


**Rysunek 13** a) schemat budowy testu magnetycznego wykorzystującego efekt GMR, wysokie powinowactwo wiązania między biotyną i pokrytymi streptawidyną nanocząstkami tlenku żelaza umieszczonymi w matrycy z dekstranu (MACS) pozwala na krótszy czas oznaczenia; b) biosensor Z-lab.<sup>64</sup>

Poza biosensorymi bazującymi na zjawisku gigantycznego magnetooporu, obiecujące wydają się również magnetyczne testy immunologiczne bazujące na **tunelowym magnetooporze**. Nanocząstki magnetyczne są zintegrowane z sensorem analogicznie jak w przypadku biosensory typu GMR, jednak sam układ zbudowany jest ferromagnetyków oddzielonych przez cienki izolator, umożliwiający tunelowanie elektronów. Zarówno sensory oparte na efekcie gigantycznego

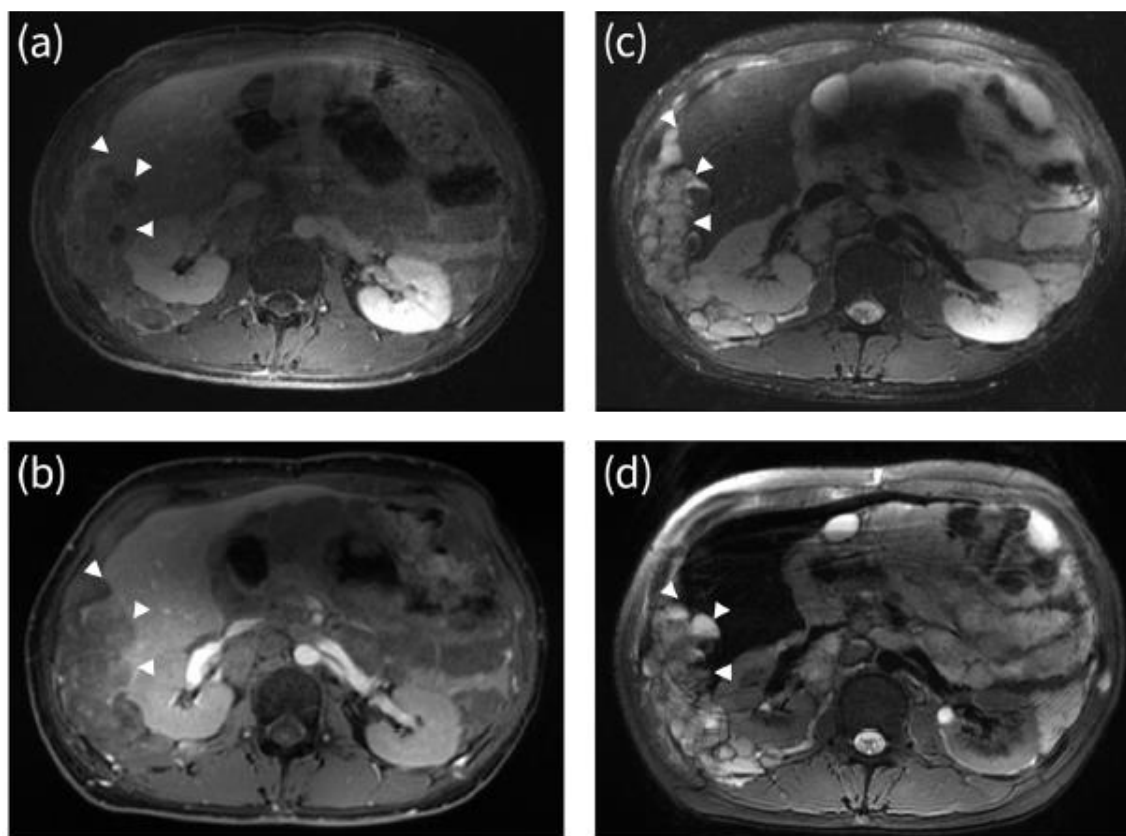
magnetooporu, jak i te wykorzystujące tunelowy magnetoopór wykorzystywane są do detekcji różnych analitów biologicznych, np. DNA, wirusy, toksyny, bakterie, drobnoustroje oraz do monitorowania podstawowych parametrów życiowych takich jak tętno, częstość oddechów i ciśnienie krwi.<sup>64,65</sup>

Nanocząstki magnetyczne wykorzystywane są również w **charakterze środków kontrastujących** w technikach opartych na zjawisku jądrowego rezonansu magnetycznego. W badaniu tym, poprzez zastosowanie silnego stałego pola magnetycznego, wykorzystuje się sygnał powstający na skutek procesów relaksacji spinów protonów w atomach wodoru obecnych w cząsteczkach wody, które znajdują się w obrazowanych układach biologicznych. Jedną z najpopularniejszych metod diagnostycznych, wykorzystujących zjawisko NMR, jest **obrazowanie metodą magnetycznego rezonansu**. Technika obrazowania MRI opiera się na polaryzacji spinów jąder wodoru zgodnie z kierunkiem przyłożonego zewnętrznego stałego pola magnetycznego. Następnie, po przyłożeniu pola zmiennego o częstotliwości rezonansowej, ich wypadkowa magnetyzacja zostaje wprowadzona ze stanu równowagi. Po usunięciu zmiennego pola magnetyzacja powraca do stanu równowagi zgodnego ze stałym polem magnetycznym. Osiągnięcie stanu równowagi związane jest z oddziaływaniami relaksacyjnymi: typu spin-sieć (czas relaksacji T1) oraz typu spin-spin (czas relaksacji T2). W zależności od zastosowanego środka kontrastującego otrzymywane obrazy tworzone są w oparciu o odpowiednie sygnały. Środki kontrastujące, dla których obraz otrzymywany jest na podstawie sygnału T1 określa się jako grupę pozytywną, natomiast substancje wykorzystujące sygnał T2, grupę negatywną. Obecnie istnieje jeden przykład nanocząstek magnetycznych, należący do grupy środków negatywnych, dopuszczony przez Agencję Żywności i Leków (FDA, *ang.* Food and Drug Administration) i jednocześnie dostępny na rynku w wybranych krajach, którym jest Resovist<sup>®</sup>. Środek ten, przeznaczony do obrazowania zmian chorobowych zachodzących w wątrobie, stanowią nanocząstki magnetyczne o średnicy hydrodynamicznej równej 62 nm, tworzone przez tlenki żelaza (magnetyt i maghemit) pokryte karboksydekstranem. Rysunek 14 przedstawia, na przykładzie ogniskowego rozrostu guzkowego wątroby, wpływ zmiany rodzaju sygnału w oparciu o który powstał obraz oraz widoczną poprawę jakości otrzymanego zdjęcia po zastosowaniu środka kontrastującego w postaci Resovist<sup>®</sup>.



**Rysunek 14** Obrazy MRI ogniskowego rozrostu guzkowego wątroby. Obraz otrzymany na postawie sygnału: a) T1; b) T2; c) T2, z użyciem Resovist® jako środka kontrastującego.<sup>68</sup>

Stosowanie nanocząstek magnetycznych w charakterze negatywnych środków kontrastujących związane jest z pewnymi ograniczeniami, do których zaliczyć możemy: zaciemnienie otrzymanych obrazów utrudniające uwidocznienie występujących krwawień lub zwapnień, pojawienie się artefaktów na skutek zaburzeń wywołanych dużymi momentami magnetycznymi nanocząstek, długi czas usuwania nanostruktur z organizmu ze względu na ich stosunkowo duży rozmiar oraz dłuższy czas potrzebny na zebranie obrazu. Rozwiązanie tych problemów możliwe jest poprzez zastosowanie pozytywnych środków kontrastujących. Obecnie na rynku dostępny jest jeden środek zaliczany do tej grupy związków, Ferumoxytol. Jednak środek ten wykorzystywany jest jedynie w **terapii leczenia niedoborów żelaza** u osób z chorobami nerek. Stosowany jest od 2009 roku w Stanach Zjednoczonych (pod nazwą Feraheme®) i od 2013 roku w krajach Unii Europejskiej (pod nazwą Rienso®). Dopuszczenie tego produktu na rynek medyczny przyczyniło się do dużego wzrostu ilości badań mających na celu wprowadzenie tego środka również w charakterze kontrastu wykorzystywanego przy obrazowaniu techniką MRI. Ferumoxytol stanowią nanocząstki tlenku żelaza pokryte karboksymetylodekstranem, o średnicy hydrodynamicznej równej 23 nm. Rysunek 15 przedstawia wyniki testów klinicznych prowadzonych na pacjencie z desmoplastycznym guzem drobnookrągląkomórkowym mające na celu porównanie działania popularnego środka kontrastującego na bazie gadolinu z działaniem Ferumoxytolu.<sup>66,67,68,69</sup>



**Rysunek 15** Obrazy MRI przersutów do otrzewnej i wątroby (groty strzałek) u pacjenta z desmoplastycznym guzem drobnookrągłokomórkowym przy wykorzystaniu różnych środków kontrastujących i sygnałów relaksacyjnych. a) kontrastowanie gadolinem, obraz zebrany w oparciu o sygnał T1; b) kontrastowanie Ferumoxytolem, obraz zebrany w oparciu o sygnał T1; c) kontrastowanie gadolinem, obraz zebrany w oparciu o sygnał T2; d) kontrastowanie Ferumoxytolem, obraz zebrany w oparciu o sygnał T2.<sup>70</sup>

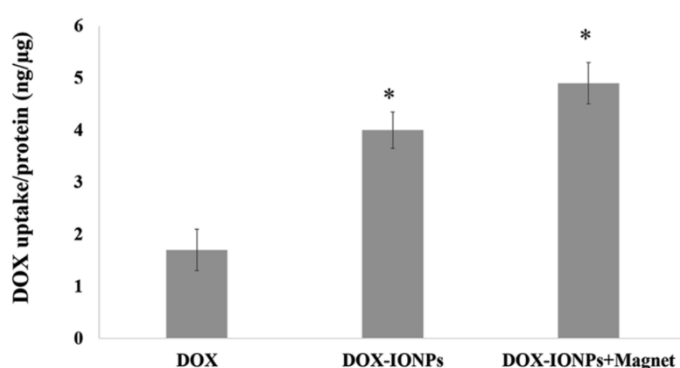
Spośród terapeutycznych aplikacji magnetycznych nanocząstek tlenków żelaza, oprócz wspomnianej wcześniej terapii mającej na celu leczenie niedoborów żelaza, wyróżnić można dwa najpopularniejsze zastosowania stanowiące środki leczenia głównie w chorobach nowotworowych. Zastosowanie leczenia metodą **magnetycznej hipertermii** ma na celu lokalne podniesienie temperatury (w zakresie 41-46°C) prowadzące do osłabienia lub zniszczenia chorych komórek, przy możliwie jak największej ochronie komórek zdrowych i z uniknięciem efektów ubocznych wykorzystanej terapii. Metoda ta została zastosowana po raz pierwszy w 1954 roku w celu zniszczenia przersutów nowotworowych zlokalizowanych w węzłach chłonnych.<sup>71</sup> W hipertermii magnetycznej wykorzystywane są nanocząstki magnetyczne o rozmiarach w zakresie 10-100 nm, które umieszczane są w obszarze zmian nowotworowych bezpośrednio lub nakierowywane w miejsce docelowe za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego. Proces generowania ciepła przez nanocząstki magnetyczne poddane działaniu zmiennego pola magnetycznego o niskich częstotliwościach jest determinowany przez

mechanizm magnesowania. W przypadku jednodomenowych nanocząstek superparamagnetycznych dominującym zjawiskami odpowiedzialnym za wzrost temperatury są procesy relaksacji Neela i Browna. Proces relaksacji Neela jest efektem powrotu momentów magnetycznych do położenia równowagi po zaprzestaniu działania zewnętrznego pola magnetycznego, natomiast relaksacja Browna związana jest z ruchem całej cząstki. Możliwość lokalnego podniesienia temperatury wykorzystywana jest w metodzie Nanotherm<sup>®</sup>. Jest to rozwiązanie stosowane w leczeniu guzów mózgu, które polega na chirurgicznym wprowadzeniu implantu w postaci ferrofluidu nanocząstek tlenków żelaza o rozmiarach rzędu 15 nm bezpośrednio do zmiany chorobowej i zastosowaniu odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego prowadzącego do zniszczenia lub osłabienia komórek nowotworowych. Od 2019 roku leczenie terapią Nanotherm<sup>®</sup>, w formie badań klinicznych, jest dostępne w Polsce w Szpitalu Klinicznym Nr 4 w Lublinie.<sup>72</sup> Leczenie metodą hipertermiczną stanowi bardzo obiecującą metodę wykorzystywaną jako wspomaganie konwencjonalnych terapii takich jak chemioterapia i radioterapia. Liczne grupy naukowe dążą do opracowania układów, które będą zdolne do magnetycznie kontrolowanego lokalnego podniesienia temperatury, przy jednoczesnym uwolnieniu transportowanej substancji biologicznie aktywnej.<sup>73,74,75,76</sup>

Wśród **sterowanych magnetycznie układów przeznaczonych do celowanego i kontrolowanego dostarczenia substancji biologicznie aktywnych** wyróżnić można dwa rodzaje proponowanych systemów. Pierwszy typ nośników oparty jest na bardziej złożonych układach zawierających w swojej strukturze nanocząstki magnetyczne, takie rozwiązania zostały opisane szerzej w Rozdziale 3:. Natomiast drugie rozwiązanie wykorzystuje odpowiednio sfunkcjonalizowane nanocząstki magnetyczne zdolne do kontrolowanego magnetycznie transportu substancji terapeutycznych. Procedura tworzenia tego typu układów zazwyczaj opiera się na kilku etapach do których zaliczamy pokrycie powierzchni nanocząstek magnetycznych odpowiednim związkiem, który zapewni im stabilność, odpowiednie właściwości hydrofilowe oraz możliwość dalszej funkcjonalizacji białkami, peptydami lub kwasami nukleinowym i na końcu - dołączenie do struktury substancji o właściwościach terapeutycznych. Zastosowanie tego typu leczenia ma na celu uzyskanie optymalnej dawki i stężenia leku w czasie oraz zminimalizowanie skutków ubocznych działania podawanej substancji. Dostarczenie nośnika w miejsce docelowe może odbywać się poprzez transport aktywny, możliwy dzięki funkcjonalizacji struktury ligandem odpowiednim względem celu w organizmie lub transport pasywny wykorzystujący zwiększoną przepuszczalność komórek śródbłonna naczyń włosowatych i tendencję do zatrzymywania cząsteczek



w miejscu zmiany nowotworowej (*ang.* enhanced vascular permeability and retention, EPR). W obu podejściach proces kumulacji nośnika w pożądanym miejscu w organizmie może być dodatkowo wspomagany zewnętrznym stałym polem magnetycznym. Uwolnienie substancji aktywnej może zostać aktywowane na drodze działania odpowiednich enzymów w organizmie, odpowiedniego pH czy temperatury lub na drodze działania odpowiednim polem magnetycznym wytwarzanym przez magnes znajdujący się w ciele lub na zewnątrz.<sup>77,78,79,80</sup> Obecnie nie ma dostępnego na rynku produktu przeznaczonego do magnetycznie sterowanego transportu i uwolnienia substancji aktywnej, jednak układy te stanowią przedmiot badań licznych grup naukowych.<sup>77</sup> Prowadzone badania w sposób jednoznaczny pokazują pozytywny wpływ terapii celowanych z wykorzystaniem nanocząstek magnetycznych w leczeniu chorób nowotworowych. Przykład takich układów stanowią zaprezentowane przez Norouzi *et al.* nanocząstki tlenku żelaza stabilizowane kwasem N-[(3-trimetoksy-sililo) propylo] etylenodiaminowym transportujące popularny związek w leczeniu antynowotworowym – dokсорubicynę. Układy te zostały zaprojektowane z myślą o leczeniu glejaka wielopostaciowego poprzez zwiększenie efektywności pokonywania bariery krew-mózg dzięki zastosowaniu odpowiednich peptydów otwierających połączenia tej bariery oraz wykorzystanie zewnętrznego pola magnetycznego. Rysunek 16 obrazuje znaczący wzrost ilości leku w postaci dokсорubicyny pochłoniętej przez komórki glejaka dostarczone z wykorzystaniem nanocząstek magnetycznych i zewnętrznego pola magnetycznego.<sup>81</sup>



**Rysunek 16** Zależność ilości dokсорubicyny pochłoniętej przez komórki glejaka gwiaździstego od systemu podania leku. Kolumna: lewa – dokсорubicyna; środkowa – nanocząstki magnetyczne z przyłączoną dokсорubicyną; prawa – nanocząstki magnetyczne z przyłączoną dokсорubicyną przy zastosowaniu stałego zewnętrznego pola magnetycznego.<sup>81</sup>

### **3. Układy do celowanego i kontrolowanego magnetycznie dostarczania i uwalniania związków biologicznie aktywnych**

Intensywne poszukiwanie nowych, skuteczniejszych rozwiązań terapeutycznych związane jest w dużej mierze z silnym wzrostem liczby chorób nowotworowych dotykających współczesne społeczeństwo. Choroby te należą do grupy najczęstszych przyczyn śmierci, a stosowane dotychczas metody leczenia związane są z licznymi ograniczeniami. Wraz z opracowaniem nowych środków farmakologicznych, trwają nieustanne poszukiwania optymalnego sposobu podania tych substancji. Terapie wykorzystujące celowe i kontrolowane dostarczanie oraz uwalnianie substancji biologicznie aktywnych mają za zadanie zniwelowanie skutków ubocznych polegających na niszczeniu również zdrowych komórek oraz zapewnienie dawki terapeutycznej przy określonym stężeniu, w odpowiednim miejscu i czasie. Idea zastosowania tego typu rozwiązania przedstawiona została przez niemieckiego chemika i bakteriologa Paula Ehricha w 1909 roku. Koncepcja Ehricha opierała się na zaprojektowaniu układu, określonego przez niego jako „magiczny pocisk” (*ang.* magic bullet), składającego się z leku oraz farmakologicznie nieaktywnego nośnika, który będzie zdolny do dostarczenia substancji aktywnej w miejsce docelowe bez uszkodzenia zdrowych tkanek. Wraz z rozwojem nauki oraz pojawianiem się kolejnych odkryć i pomysłów prezentowane są nowe rozwiązania bazujące na idei Ehricha. Pierwsze podejścia do wykorzystania pola magnetycznego w kontekście terapii celowanych zostały zaprezentowane w latach 50-tych XX wieku, natomiast pierwsze wyniki testów klinicznych przedstawione zostały w 1966 roku. Zastosowanie układów zawierających nanocząstki superparamagnetyczne umożliwia bardzo dokładne sterowanie nośnikiem, poprzez szybką odpowiedź momentów magnetycznych na działanie zewnętrznego pola magnetycznego.

Należy podkreślić, że tworzenie układów przeznaczonych do tego typu zastosowań wymaga ścisłej, interdyscyplinarnej współpracy grup naukowych ponieważ wprowadzenie gotowego produktu na rynek uwarunkowane jest nie tylko otrzymaniem dobrze zdefiniowanego nośnika, ale również stworzeniem optymalnego magnetycznego systemu nawigacyjnego, które w kooperacji będą stanowiły rozwiązanie zdolne do pomyślnego przejścia odpowiednich testów klinicznych.<sup>82,83,84,85,86</sup>

### 3.1. Wymagania stawiane nośnikom przeznaczonym do terapii celowanej

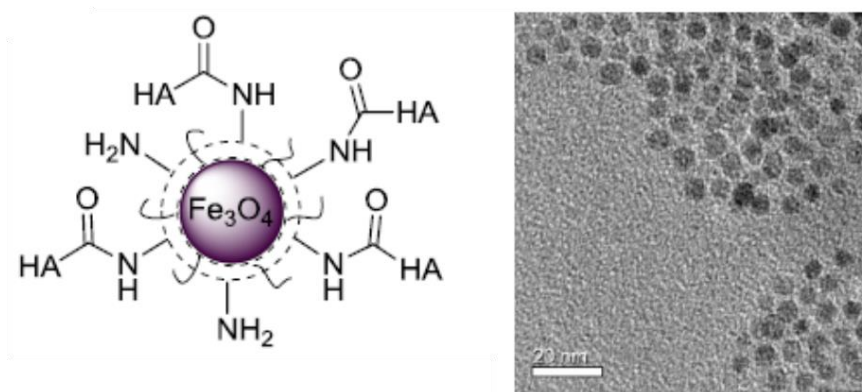
Tworzenie układów przeznaczonych do aplikacji biomedycznych stanowi bardzo specyficzną dziedzinę nauki, która narzuca wiele ograniczeń związanych z właściwościami oraz zachowaniem nośnika w warunkach *in vivo*. Projektowanie układów wykorzystywanych w terapiach celowanych wymaga uwzględnienia złożoności organizmu ludzkiego oraz specyfiki danego schorzenia. Procedura wprowadzania gotowego produktu na rynek jest bardzo czasochłonna i kosztowna, a wszystko to jest wynikiem konieczności zapewnienia maksymalnego bezpieczeństwa potencjalnemu pacjentowi. Spośród głównych warunków, które muszą być spełnione przez nośnik, aby móc rozpatrywać układ pod względem potencjalnych aplikacji medycznych wyróżnić należy:

- **biokompatybilność, brak toksyczności, brak immunogenności lub zdolność do omijania układu odpornościowego,**
- **odpowiedni i kontrolowany rozmiar oraz kształt,** które pozwalają na dłuższą cyrkulację w układzie krwionośnym, przenikanie do wnętrza komórek i gromadzenie się w miejscu docelowym,
- możliwość **biodegradacji** lub **bioeliminacji** z organizmu,
- **odpowiednią adhezję, endocytozę** oraz **oddziaływania wewnątrzkomórkowe,**
- **możliwość funkcjonalizacji** powierzchni w celu zapewnienia np. odpowiedniego ładunku powierzchniowego,
- wystarczająco **silna odpowiedź magnetyczna** umożliwiająca sterowanie nośnikiem,
- **minimalne oddziaływanie z elementami morfotycznymi, białkami i komórkami,**
- **powtarzalność procesu otrzymywania,**
- **czystość kliniczna.**

Spełnienie przedstawionych powyżej wymagań przez projektowany nośnik stanowi pierwszy etap na drodze do wprowadzenia go do użytku. Kolejne etapy weryfikacji obejmujące badania komórkowe, testy na zwierzętach oraz badania kliniczne mają na celu określenie zachowania układów wewnątrz żywych organizmów, co stanowić ma gwarancję bezpieczeństwa i potwierdzenie skuteczności proponowanych terapii.<sup>87,88</sup>

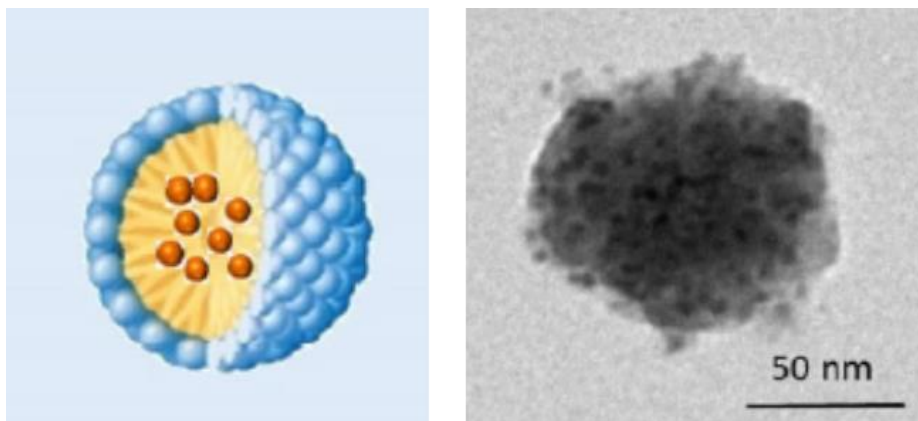
### 3.2. Klasyfikacja nośników magnetycznych

Spośród kilku sposobów klasyfikacji nośników magnetycznych takich jak: rodzaj materiału tworzącego układ, sposób wprowadzenia do organizmu, czy rodzaj transportowanej substancji aktywnej, wyszczególnić można również kryterium uwzględniające sposób wprowadzenia leku do struktury. Zgodnie z ostatnim spośród wymienionych, wyróżnić można nośniki (1) do powierzchni których przyłączona została odpowiednia substancja aktywna, takie które (2) zawierają terapeutyk zamknięty wewnątrz układu oraz (3) nośniki jednocześnie łączące oba rozwiązania. Pierwsze podejście wykorzystywane jest głównie w przypadku **superparamagnetycznych nanocząstek tlenków żelaza**, które dzięki odpowiedniej funkcjonalizacji powierzchni zdolne są do przyłączenia substancji biologicznie aktywnej. Układy te pokrywane są odpowiednim związkiem organicznym (np. polimery, syntetyczne związki biomimetyczne) lub nieorganicznym (np. krzemionka, złoto, srebro), który w znaczący sposób poprawia ich stabilność w wodnej zawiesinie, koniecznej do ich zastosowania w medycynie, biokompatybilność, biodegradowalność i umożliwia dalszą funkcjonalizację. Polega ona na przyłączeniu substancji terapeutycznej oraz może, poprzez dołączenie odpowiednich białek lub przeciwciał, poprawić ukierunkowanie nośnika względem miejsca docelowego w organizmie. Funkcjonalizacji mogą zostać poddane pojedyncze nanocząstki lub ich klastry tworząc tym samym większe układy połączone najczęściej polimerem sieciującym, natomiast samo przyłączenie odpowiedniego związku odbywać się może poprzez różnego typu oddziaływania kowalencyjne lub niekowalencyjne.<sup>89,89,90</sup> Przykładem tego typu nośników są zaprezentowane przez El-Dakdouki *et al.* SPIONy pokryte kwasem hialuronowym, które mają za zadanie kontrolowany transport cytostatyku w postaci dołączonej kowalencyjnie doksorubicyny. Schemat tych struktur oraz ich zdjęcie TEM przedstawia Rysunek 17. Układy te wykazują średnice hydrodynamiczne rzędu 122 nm i potencjał dzeta równy -44,5 mV, ponadto systemy te zaprojektowane zostały z myślą o jednoczesnym obrazowaniu rezonansem magnetycznym i niszczeniu komórek nowotworowych. Otrzymane wyniki badań w sposób jednoznaczny wskazują na zwiększoną ilość leku wprowadzonego do komórek nowotworowych, uzyskaną poprzez zastosowanie opisanych nanocząstek w stosunku do zastosowania samego leku w postaci doksorubicyny bez wykorzystania nośnika.<sup>91</sup>



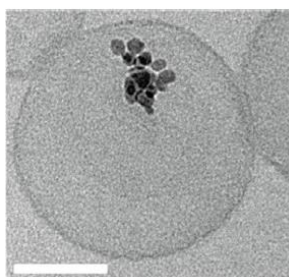
**Rysunek 17** Schemat nośnika dokсорubicyny w postaci superparamagnetycznej nanocząstki tlenku żelaza pokrytej hialuronianem (po lewej); zdjęcie układów wykonane mikroskopem TEM.<sup>91</sup>

Kolejny rodzaj magnetycznych nośników stanowią układy, które posiadają związek terapeutyczny oraz nanocząstki tlenków żelaza, odpowiedzialne za ich magnetyczne właściwości, zamknięte wewnątrz swojej struktury. Do grupy najbardziej popularnych układów tego typu zaliczyć należy: micelle, liposomy, niosomy, mikro- i nanosfery, hydrożele oraz kapsuły. Micelle, liposomy i niosomy to nośniki, które powstają w oparciu o zjawisko samoorganizacji związków amfifilowych w odpowiednich warunkach stężenia, pH i siły jonowej.<sup>92</sup> Zjawisko samoorganizacji związków amfifilowych polega na ułożeniu się fragmentów polarnych i niepolarnych łańcucha odpowiednio do środowiska w jakim znajduje się ten związek. Powstające w ten sposób **micelle** zawieszane w roztworach wodnych, składają się z otoczki zbudowanej z polarnych fragmentów i wnętrza zawierającego fragmenty niepolarne, nanocząstki magnetyczne oraz hydrofilową substancję biologicznie aktywną. Zaprezentowane przez Depalo *et al.* micelle fosfolipidowe modyfikowane glikolem polietylenowym z enkapsulowanymi SPION oraz lekiem przeciwnowotworowym (sorafenib) przedstawia Rysunek 18. Przeprowadzone badania *in vitro* wskazują na wzrost skuteczności działania leku umieszczonego w nośniku oraz na możliwość kontrolowanego uwalniania substancji aktywnej przy zastosowaniu zewnętrznego pola magnetycznego.<sup>93</sup>



**Rysunek 18** Schemat nośnika w postaci magnetycznie sterowanej miceli (po lewej); zdjęcie pochodzące z mikroskopu TEM miceli zawierającej wewnątrz nanocząstki superparamagnetyczne i lek sorafenib (po prawej).<sup>93</sup>

Zjawisko samoorganizacji dwuwarstwowych błon lipidowych, zbudowanych głównie z naturalnych lub syntetycznych fosfolipidów, umożliwia tworzenie zamkniętych i stabilnych struktur w postaci **liposomów**. Nośniki te umożliwiają jednoczesny transport dwóch typów substancji aktywnych, hydrofobowej i hydrofilowej. Magnetyczne właściwości układ ten pozyskuje poprzez enkapsulację superparamagnetycznych nanocząstek. Przedstawione przez Lu *et al.* termoczułe liposomy zaprojektowane zostały z myślą o indukowanym wysokoczęstotliwościowym polem magnetycznym dostarczaniu substancji aktywnej w chemioterapii guza mózgu. Nośniki te zawierają w swoim wewnętrznym wodnym środowisku nanocząstki magnetyczne i lek przeciwnowotworowy camptosar. Układy te zostały dodatkowo powierzchniowo sfunkcjonalizowane odpowiednim przeciwciałem umożliwiającym rozpoznanie nadekspresji receptorów czynnika wzrostu na powierzchni komórek nowotworowych. Zastosowanie takiego rozwiązania umożliwia uwolnienie transportowanej substancji po selektywnej endocytozie liposomów przez komórki nowotworowe. Rysunek 19 przedstawia opisane układy.<sup>94</sup>



**Rysunek 19** Zdjęcie z mikroskopu cryo-TEM liposomów zawierających lek przeciwnowotworowy i nanocząstki magnetyczne (skala 50 nm).<sup>94</sup>

**Niosomy** to struktury, które powstały w odpowiedzi na ograniczoną stabilność oraz duże koszty otrzymywania liposomów. W układach tych do utworzenia układu zamkniętej dwuwarstwy, w strukturze której możliwe jest umieszczenie leku hydrofobowego, wykorzystywane są niejonowe surfaktanty. Ponadto wewnątrz samego nośnika możliwa jest enkapsulacja związków hydrofilowych i nanocząstek magnetycznych. Przykład takich nośników stanowią, przedstawione przez Davarpanah *et al.*, niosomy transportujące lek przeciwnowotworowy w postaci karboplatyny, zbudowane z dwóch surfaktantów, zawierające dodatkowo nanocząstki tlenku żelaza pokryte krzemionką. W celu poprawienia biodostępności nośnika, jego powierzchnia została poddana PEGylacji, czyli kowalencyjnemu przyłączaniu poli(glikolu etylenowego) (PEG). Otrzymane w ten sposób układy wykazywały rozmiar nieprzekraczający 150 nm, dużą stabilność oraz zdolne były do magnetycznie kontrolowanego procesu uwalniania substancji biologicznie aktywnej.<sup>95</sup> Popularne są również nośniki składające się ze sferycznej matrycy, wewnątrz której umieszczony jest lek oraz nanocząstki magnetyczne. Takie układy, w zależności od rozmiaru, określane są jako **mikro- i nanosfery**. Przykład takich struktur stanowią zaprezentowane przez Mhlanga *et al.* polilaktydowe nośniki zawierające enkapsulowane magnetyczne nanocząstki tlenku żelaza  $Fe_3O_4$  oraz doksorubicynę. Układy te wykazują rozmiar rzędu kilku mikrometrów, dużą stabilność i biokompatybilność.<sup>96</sup> Bardzo obiecujące wydaje się być również podejście wykorzystujące **materiały hydrożelowe** zwłaszcza te, zbudowane z polimerów występujących naturalnie w przyrodzie, takich jak celuloza, chityna, skrobia, algininian i żelatyna. Zastosowanie tego typu materiałów w kontekście aplikacji biomedycznych z powodzeniem spełnia warunki biokompatybilności, biodegradowalności i braku toksyczności. Nadanie właściwości magnetycznych materiałom hydrożelowym realizowane jest poprzez umieszczenie magnetycznych nanocząstek tlenków żelaza w matrycy żelu.<sup>97</sup> Przykładowo, Naderi *et al.* opracowali materiał hydrożelowy zbudowany z karboksymetylocelulozy,  $\beta$ -cyklodekstryny i chitozanu posiadający w swojej strukturze dodatkowo magnetyczne nanocząstki tlenku żelaza  $Fe_3O_4$ . Obecność nanocząstek przyczyniła się do zwiększonej pojemności nośnika dla wybranego leku (metotreksat), wykorzystywanego w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów oraz umożliwiła kontrolę procesu uwalniania substancji aktywnej poprzez zastosowanie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego.<sup>98</sup>

Spośród magnetycznych nośników substancji biologicznie aktywnych wyróżnić należy również **kapsuły**, do których klasyfikują się układy stanowiące główny przedmiot badań niniejszej pracy. W związku z tym, układom takim poświęcony został oddzielny rozdział zawierający ich bardziej szczegółowy opis.

Podkreślić również należy, że opisane powyżej nośniki to systemy, które można określić mianem podstawowych, natomiast w praktyce laboratoryjnej bardzo często spotykane są struktury, które poddane zostały różnym modyfikacjom mającym na celu między innymi poprawienie ich stabilności, zmniejszenie dystrybucji rozmiarów, lepsze ukierunkowanie względem miejsca docelowego w organizmie, czy zapewnienie biokompatybilności i biozgodności.

### 3.3. Kapsuły magnetyczne

**Nanokapsuły** to układy definiowane jako sferyczne struktury, typu pęcherzykowatego, składające się z rdzenia (*ang.* core) i polimerowej powłoki (*ang.* shell). Rozmiar takich układów mieści się najczęściej w zakresie 100 – 500 nm, a w ich wnętrzu możliwa jest enkapsulacja związków aktywnych. Ze względu na różnorodność stosowanych rdzeni układy takie mogą stanowić nośnik dla licznych substancji, co stanowi bardzo obiecujący aspekt wykorzystywany przez branżę farmaceutyczną, kosmetyczną i medyczną. Spośród spotykanych rozwiązań wyróżnić można dwa główne typy kapsuł, tzn. układy oparte na **rdzeniach stałych** oraz na **rdzeniach ciekłych**, które mogą stanowić hydrofilowe roztwory wodne lub olejowe substancje hydrofobowe. Polimerowa powłoka nośnika może być tworzona przez polimer pochodzenia naturalnego lub polimer syntetyczny. Do najczęściej stosowanych polimerów syntetycznych spotykanych w tego typu układach zaliczyć należy polikaprolakton (PCL), polilaktyd (PLA), polilaktyd glikolid (PLGA) i poliwinylpirolidon (PVP), natomiast najczęściej wykorzystywane polimery naturalne to żelatyna, chitozan, alginian sodu i albumina. W celu lepszego ukierunkowania względem miejsca docelowego, polimerowa powłoka kapsuł może zostać poddana dalszej funkcjonalizacji polegającej na przyłączeniu specyficznych biomolekuł.<sup>99</sup> W przypadku nośników dedykowanych celowemu i kontrolowanemu dostarczaniu substancji aktywnych biologicznie, stosowane są również modyfikacje polegające na wzbogaceniu ich struktury o nanocząstki umożliwiające zewnętrzne sterowanie oraz kontrolowane uwolnienie enkapsulowanej substancji. Wykorzystywane w tym celu najczęściej są SPION lub plazmonowe nanocząstki srebra i złota.<sup>100</sup>

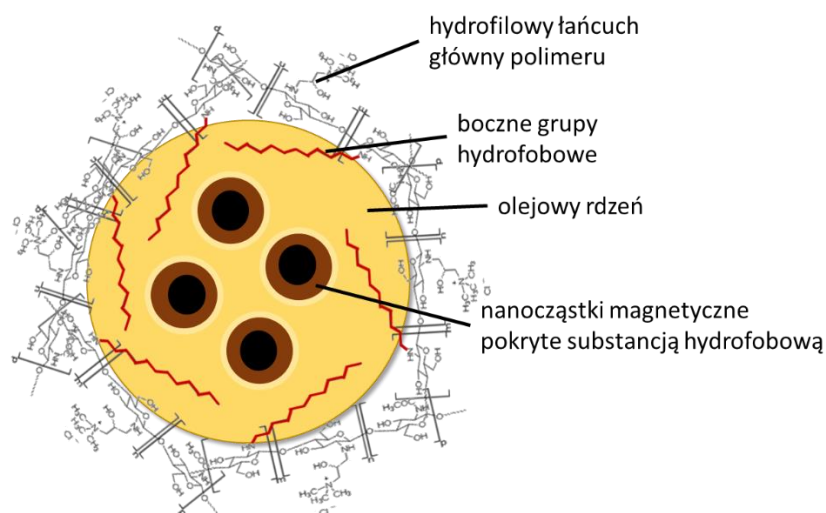
Spośród technik prowadzących do otrzymania nanokapsuł opartych na rdzeniach ciekłych, wyróżnić można cztery główne ścieżki fabrykacji: osadzanie międzyfazowe, polimeryzacja emulsyjna, nakładanie przeciwnie naładowanych warstw i koacerwacja. **Metoda osadzania międzyfazowego** polega na dodaniu



do fazy wodnej, za pomocą cienkiej igły, roztworu składającego się z fazy olejowej i substancji aktywnej rozpuszczonych w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym. Substancja polimerowa, stanowiąca późniejszą powłokę nośnika, w zależności od jej właściwości może być rozpuszczona w fazie wodnej lub organicznej. Ostatni etap preparatyki polega na usunięciu organicznego rozpuszczalnika z wodnej zawiesiny kapsuł poprzez jego dyfuzję lub odparowanie. W **metodzie polimeryzacji emulsyjnej** wykorzystywane jest zjawisko polimeryzacji zachodzące na powierzchni kropeł oleju w roztworze wodnym (o/w) lub odwrotnie (w/o). W pierwszym etapie, za pomocą intensywnego mieszania lub poprzez działanie ultradźwięków, tworzona jest emulsja. Następnie, dodanie odpowiednich monomerów powoduje polimeryzację np. na drodze reakcji kondensacji lub poprzez polimeryzację *in situ*. Kolejna technika, **nakładania przeciwie naładowanych warstw**, wykorzystuje oddziaływania elektrostatyczne jakie występują pomiędzy dodatnio i ujemnie naładowanymi polielektrolitami. Polimer dodany do wodnego roztworu z zawieszonymi nanocząstkami tlenków metali lub niewielkich struktur organicznych odkłada się na powierzchni mikro/nanometrycznego rdzenia, umożliwiając tym samym nałożenie kolejnego związku o przeciwnym ładunku. W metodzie **koacerwacji**, do otrzymania powłoki kapsuł, wykorzystywane są dwa przeciwie naładowane polimery, jeden znajdujący się w środowisku wodnym oraz drugi w fazie olejowej. Oddziaływania pomiędzy tymi polimerami prowadzą do utworzenia struktur, które układają się na granicy faz olej/woda tworząc w ten sposób polimerową otoczkę olejowego rdzenia nośnika.<sup>101</sup> Wzbogacenie struktury nośnika o nanocząstki umożliwiające lepszą kontrolę transportu oraz uwolnienia enkapsulowanej substancji odbywa się najczęściej podczas procedury tworzenia nośnika. Wykorzystywane są rozwiązania polegające na dodaniu nanocząstek do fazy olejowej lub wodnej, stanowiącej później rdzeń lub na bezpośrednim przyłączeniu tych struktur do związku polimerowego tworzącego powłokę kapsuły.<sup>102,103</sup>

Kapsuły przedstawione w niniejszej pracy zostały utworzone przy zastosowaniu **metody emulsyjnej**, która polega na dodaniu do amfifilowego polimeru rozpuszczonego w roztworze wodnym, fazy olejowej zawierającej zdyspergowane nanocząstki magnetyczne pokryte substancją hydrofobową. Następnie intensywne mieszanie oraz działanie fal ultradźwiękowych doprowadziło do powstania zamkniętych hydrofobowych domen zawierających nanocząstki magnetyczne. Olejowe magnetyczne rdzenie nośnika stabilizowane są poprzez polimer, którego hydrofilowy łańcuch główny odkłada się na powierzchni kropeł oleju, a hydrofobowe łańcuchy boczne wnikają do ich wnętrza w procesie samoorganizacji. Omawiany nośnik przedstawiony został na Rysunku 20:. Ponadto obecność ładunku na

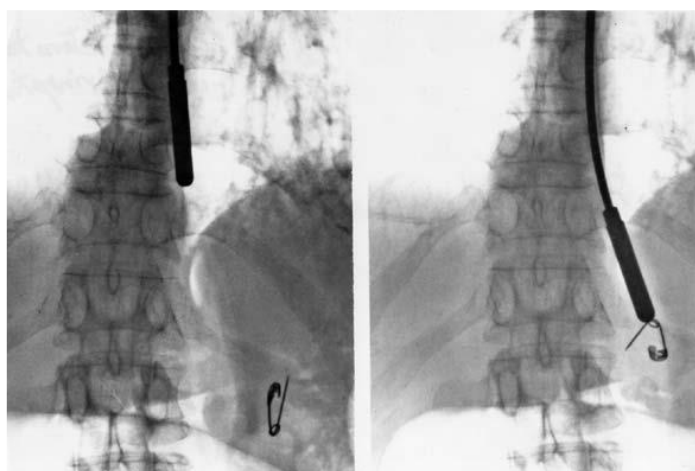
powierzchni powstałego nośnika umożliwia zastosowanie techniki LbL w celu nałożenia przeciwnie naładowanej warstwy polimeru, co pozwala na kontrolę ładunku powierzchniowego kapsuły. Parametry otrzymanych układów można modyfikować przez zmiany warunków w procedurze ich otrzymywania, takich jak np. temperatura, czas i intensywność mieszania oraz poprzez zmiany właściwości wykorzystanego polimeru np. rodzaj i gęstość szczypania bocznymi grupami hydrofobowymi, długość głównego łańcucha hydrofilowego, czy jego ładunek. Wykorzystanie amfifilowych polimerów szczypanych stanowi alternatywne podejście do stabilizacji olejowych rdzeni nośnika - wcześniej często spotykane rozwiązania opierały się na zastosowaniu niskocząsteczkowych surfaktantów, które ze względu na niekorzystne oddziaływanie z błonami komórkowymi nie są pożądane w aplikacjach biomedycznych.



**Rysunek 20** Schemat magnetycznej kapsuły opartej na ciekłym rdzeniu stabilizowanym amfifilowym polimerem szczypanym.

#### 4. Magnetycznie wspomagane sterowanie układami do celowanego i kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie aktywnej

Pierwsze zastosowania pola magnetycznego w charakterze medycznym przypisane są starożytnemu greckiemu uczonemu Talesowi z Miletu. Tales wierzył w obecność duszy w magnezie, zgodnie z założeniem, że dusza jest w stanie wytworzyć ruch, a skutkiem tych przekonań było przypisanie wielu uzdrowień magnetytowi. Żyjący 200 lat później Hipokrates z Kos wykorzystywał minerały tlenków żelaza w celu tamowania krwawienia. Do innych medycznych zastosowań magnetyzmu pochodzących z czasów starożytnych zaliczyć można picie magnetytu z mlekiem w celu usunięcia obrzęków, czy usuwanie magnezem opiłków żelaza z oka. Przez kolejne setki lat doskonalono techniki usuwania metalowych obiektów już nie tylko z oka ale również z organizmu człowieka poprzez zastosowanie pola magnetycznego oraz zgłębiano i definiowano właściwości pola magnetycznego. Przykład takiego zastosowania obrazuje Rysunek 21.



**Rysunek 21** Zdjęcia przedstawiające usuwanie agrafki z brzucha pacjenta za pomocą wprowadzonego do organizmu magnezu.<sup>104</sup>

Niestety, silnie rozwinęło się również podejście nie mające nic wspólnego z nauką, które opierało się na niezrozumieniu zjawiska jakim jest magnetyzm i łączeniu go ze zjawiskami nadprzyrodzonymi. W XIX wieku, głównie w Ameryce pojawiła się moda na różne pseudo-medyczne aplikacje magnetyzmu. Przykładem takich „odkryć” jest np. leczący bóle głowy i powstrzymujący wypadanie włosów magnetyczny grzebień profesora Longa, przeciwbólowy balsam magnetyczny czy

również przeciwbólowe magnetyczne tabletki. Również literatura wspierała błędną interpretację magnetyzmu takimi pozycjami jak np. pochodząca z ok 1930 roku książka zatytułowana „Najnowsze tajemnice i zagadnienia Czarnej magji, Hipnotyzmu i Spirytyzmu”, czy „Magnetyzm i Spirytyzm” z 1909 roku. Zdjęcia opisanych wyżej przedmiotów przedstawia Rysunek 22.



**Rysunek 22** Zdjęcie pierwszej strony książki „Najnowsze tajemnice i zagadnienia Czarnej magji, Hipnotyzmu i Spirytyzmu”<sup>105</sup>, magnetycznego grzebienia Profesora Longa<sup>106</sup> i magnetycznego balsamu<sup>107</sup>

Ograniczenie przedstawionych wyżej, pseudonaukowych praktyk przyniosła przedstawiona w 1906 roku Ustawa o czystości żywności i leków. Obecne medyczne wykorzystanie pola magnetycznego z powodzeniem znajduje swoje miejsce w zastosowaniu terapeutycznym oraz diagnostycznym w różnych specjalizacjach medycznych takich jak np. onkologia, kardiologia, stomatologia, czy chirurgia. Tak szerokie spektrum aplikacji medycznych jest częściowo związane z miniaturyzacją elektromagnesów, rozwojem elektromagnesów nadprzewodzących i powstawaniem nowych stopów.

Z perspektywy układów przeznaczonych do magnetycznie sterowanego celowanego i kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie aktywnej przełomowa okazała się opublikowana w 1960 roku praca zatytułowana „Magnetism in Medicine” autorstwa trzech amerykańskich naukowców, Freemana, Arrotta i Watsona.

Już pierwsze zdanie opublikowanego artykułu, które brzmi: *„If not with the marriage of magnetism and medicine, this paper is a least concerned with an affair between these two different fields”* w znaczący sposób podkreśla silny związek między magnetyzmem a medycyną. Zaproponowane w pracy rozwiązanie opierało się na wykorzystaniu niewielkich jednodomenowych cząstek tlenków żelaza w leczeniu raka i chorób psychicznych oraz w diagnostyce. To właśnie w oparciu o opisane wyżej idee oraz wspomnianą w Rozdziale 3 koncepcję Paula Ehricha projektowane są liczne, magnetycznie sterowane nośniki substancji terapeutycznych.<sup>108,109,110</sup>

#### **4.1. Klasyfikacja metod dostarczania i procesów uwalniania substancji enkapsulowanych w polimerowych nośnikach**

Poszukiwanie rozwiązań umożliwiających dostarczenie substancji biologicznie czynnej w sposób kontrolowany, bez uszkodzeń zdrowych komórek oraz z jak najlepszym efektem terapeutycznym doprowadziło do powstania licznych układów wykorzystujących różne podejścia w terapii celowanej. Metody dostarczania terapeutyków do miejsca docelowego w organizmie można sklasyfikować według kilku kategorii, przykładowo:

##### **a) miejsca dostarczenia terapeutyków**

- **ukierunkowanie pierwszorzędowe**, które polega na dostarczeniu substancji aktywnej do naczyń włosowatych okalających chory narząd lub tkankę,
- **ukierunkowanie drugorzędowe** opierające się na selektywnym przejściu leku w miejsce zmiany chorobowej,
- **ukierunkowanie trzeciorzędowe** wykorzystujące zjawiska zachodzące na poziomie komórkowym takie jak fuzja komórkowa, endocytoza i pinocytoza,

##### **b) sposobu kontroli nośnika**

- **transport pasywny**, który wykorzystuje naturalne rozprzestrzenianie się podanego leku w organizmie, najczęściej opierając się na układzie krwionośnym, a w przypadku zmian nowotworowych na zwiększonym ukrwieniu okolic guza,
- **transport aktywny** polegający na kontroli transportu substancji aktywnej poprzez odpowiednie właściwości nośnika np. jego rozmiar lub odpowiednie sfunkcjonalizowanie przeciwciałami ukierunkowanymi na chore komórki,

- **transport fizykochemicznie kontrolowany** wykorzystujący zjawiska fizyczne związane np. z magnetyzmem lub optyką, które dzięki obecności odpowiednich struktur wewnątrz nośnika, umożliwiają kontrolę procesu dostarczania i uwalniania substancji aktywnej,

**c) transportu nośnika wewnątrz tkanki docelowej**

- **biochemiczny transport** polegający na pozanacyniowym specyficznym oddziaływaniu między ligandami komórek docelowych a nośnikami leków,
- **biomechaniczny transport**, który opiera się na pozanacyniowym dostarczaniu substancji aktywnej przez przejściowe lokalne zwiększenie przepuszczalności śródbłonna w wyniku braku równowagi osmotycznej lub niedotlenienia po embolizacji,
- **biofizyczny transport** opierający się na zewnętrznym przeciągnięciu nośnika przez śródbłonek poprzez wykorzystanie pola magnetycznego lub zastosowanie układu wrażliwego na zmiany temperatury i lokalnej hipertermii,
- **bioadhezyjny transport**, który stanowi połączenie procesów zachodzących w transporcie biochemicznym i biofizycznym.

Drugim bardzo istotnym aspektem rozpatrywanym w badaniu układów przeznaczonych do terapii celowanych jest **sposób uwolnienia enkapsulowanej substancji w miejscu docelowym**. Terapie oparte na celowym dostarczaniu związków farmakologicznych mogą wykorzystywać **jednorazowo uwolnioną maksymalną dawkę**, która nie uszkodzi zdrowych komórek lub **kontrolowane, stopniowe uwalnianie** transportowanej substancji. **Odpowiedni mechanizm uwalniania** może zostać zainicjowany przez różne zjawiska fizykochemiczne, tj.:

- **promieniowanie świetlne**, dzięki znikomej absorpcji światła o długości fali w zakresie 800 – 1200 nm przez tkanki, możliwe jest zastosowanie promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni na światłoczułe nośniki zawierające odpowiednie nanocząstki lub chromofory,
- **czynniki chemiczne**, w tym rozwiązaniu można wyróżnić dwa główne podejścia opierające się na nośnikach czułych na zmianę pH mającą miejsce w endosomach lub na uwolnieniu enkapsulowanej substancji poprzez reakcje redukcji wiązań disiarczkowych przez występujący wewnątrz komórek glutation,
- **reakcje biologiczne**, spośród których dwa najczęściej spotykane podejścia opierają się na reakcjach chemicznych zachodzących wewnątrz środowiska komórkowego (przy odpowiednich warunkach np. pH) oraz drugie podejście

wykorzystujące oddziaływania zachodzące między nośnikiem a różnymi biomolekułami (takimi jak enzymy, cukry, czy fragmenty oligonukleotydów),

- **zmiany temperatury**, uwalnianie substancji aktywnej poprzez zmianę temperatury otoczenia może odbywać się na drodze bezpośrednich uszkodzeń nośnika lub przez zachodzące w jego strukturze przejścia fazowe,
- **działanie pola elektrycznego**, obecność materiałów podatnych na działanie pola elektrycznego (np. nanorurki węglowe, przeciwnie naładowane polimery) w strukturze nośnika umożliwia kontrolowane uwolnienie enkapsulowanej substancji na drodze reakcji redoks, czy kompensacji pól elektrycznych,
- **działanie zewnętrznego pola magnetycznego**, odpowiedź na działanie odpowiedniego pola magnetycznego ze strony nośnika możliwa jest poprzez umieszczenie w jego strukturze nanocząstek magnetycznych, natomiast uwolnienie substancji aktywnej zachodzi na drodze mechanicznych lub termicznych uszkodzeń platformy transportującej substancję aktywną.

Odpowiedni dobór przedstawionych powyżej metod transportu oraz procesów uwalniania stanowi kluczowy aspekt przy projektowaniu potencjalnego nośnika przeznaczonego do celowanego i kontrolowanego uwolnienia substancji biologicznie aktywnej.<sup>101,111,112,113,114</sup> Przewiedzione w niniejszej pracy mechanizmy transportu oraz uwolnienia enkapsulowanej substancji opierają się na zastosowaniu stałego oraz zmiennego pola magnetycznego. W związku z tym dalsza część rozdziału będzie skupiona na wykorzystaniu takiego rozwiązania.

#### **4.2. Pole magnetyczne w układach do celowanego i kontrolowanego dostarczania i uwalniania substancji biologicznie aktywnych**

Podczas projektowania systemów przeznaczonych do magnetycznie sterowanego celowanego i kontrolowanego dostarczania substancji biologicznie aktywnych w praktyce należy uwzględniać dwa układy, które współdziałając mają w sposób efektywny wypełnić swoje zadanie. Pierwszy układ stanowi **dobrze zdefiniowany nośnik**, który będzie zdolny do transportu terapeutyku w miejsce docelowe, jednocześnie będzie on spełniał wymagania stawiane układom przeznaczonym do zastosowań medycznych oraz wykazywał odpowiednią odpowiedź na zewnętrzne

pole magnetyczne. Natomiast drugi aspekt tego typu badań stanowi zaprojektowanie odpowiedniego, kompatybilnego z nośnikiem, **nawigującego systemu magnetycznego**. Stosowane układy magnetyczne można podzielić na dwa główne rodzaje: magnesy o stałym polu magnetycznym oraz te generujące zmienne pole magnetyczne. Uwzględniając źródło, z którego pochodzi **stałe pole magnetyczne** wyróżnić można **pojedyncze magnesy trwałe** i ich **układy** oraz **elektromagnesy**. Natomiast wśród magnesów generujących **zmienne pole** znajdują się **układy z ruchomym systemem magnesów trwałych** oraz **systemy elektromagnesów**. Porównanie wymienionych układów magnetycznych przedstawione zostało w Tabeli 1:.

**Tabela 1** Zestawienie układów magnetycznych wykorzystywanych w celowanym i kontrolowanym dostarczaniu substancji biologicznie aktywnych.

Typ układu	Zalety	Wady
<b>STAŁE POLE MAGNETYCZNE</b>		
pojedyncze magnesy trwałe	proste i wygodne w użytkowaniu, niedrogie	ograniczenia związane ze sterowaniem nośnikiem, niewielkie wartości indukcji i gradientu pola magnetycznego
układy magnesów trwałych	stosunkowo wysokie wartości indukcji i gradientu pola magnetycznego	ograniczenia związane ze sterowaniem nośnikiem, skomplikowane układy
elektromagnesy	proste, wysokie wartości indukcji i gradientu pola magnetycznego	ograniczenia związane ze sterowaniem nośnikiem, energochłonne
<b>ZMIENNE POLE MAGNETYCZNE</b>		
układy z ruchomym systemem magnesów trwałych	większa precyzyjności sterowania nośnikiem, stosunkowo proste	niewygodny konieczny ruch magnesów
elektromagnesy	większa precyzyjności sterowania nośnikiem, wysokie wartości indukcji i gradientu pola magnetycznego	wymagają zaawansowanych obliczeń, energochłonne



Należy podkreślić, że w przypadku układów magnetycznych dedykowanych celowemu i kontrolowanemu dostarczaniu substancji biologicznie aktywnych uwzględnić trzeba wiele dodatkowych czynników związanych głównie z przemieszczaniem się nośnika w krwi lub innych płynach ustrojowych. Te specyficzne warunki środowiska przyczyniają się do występowania kombinacji dodatkowych oddziaływań takich jak np. magnetyczne oddziaływania dipolowe, siły van der Waalsa, czy lepkość. Ponadto występują dodatkowe, naturalne ograniczenia takie jak np. bariera krew-mózg i bariera krew-grasica, które w niektórych przypadkach muszą zostać pokonane w czasie transportu terapeutycznego. Istotne jest również umiejscowienie zmiany chorobowej, jej kształt oraz wielkość. Wobec występujących różnych czynników, projektowany układ magnetyczny musi generować pole wystarczające do pokonania występujących ograniczeń. Siła pola magnetycznego ( $F_m$ ) działająca na nanocząstki magnetyczne znajdujące się w nośniku opisywana jest równaniem:

$$F_m = -V \frac{\chi}{\mu_0} BB'$$

**Równanie 3**

gdzie:  $V$  – objętość nanocząstek,  $\chi$  – podatność magnetyczna nanocząstek,  $\mu_0$  – przenikalność magnetyczna próżni,  $B$  – pole magnetyczne,  $B'$  – gradient pola magnetycznego.

Procedura doboru odpowiedniego pola magnetycznego, umożliwiającego precyzyjny transport substancji biologicznie aktywnej w miejsce docelowe musi uwzględniać wszystkie wymienione wcześniej ograniczenia, siłę pola magnetycznego opisaną przez **Równanie 3** oraz fizykochemiczne parametry samego nośnika. Kolejny aspekt stanowi umiejscowienie magnesu sterującego układem transportującym. Układ ten może znajdować się wewnątrz organizmu pacjenta w postaci sondy lub implantu lub może być przyłożony w odpowiednie miejsce na zewnątrz organizmu. Zważając na te wszystkie uwarunkowania, terapie oparte na magnetycznie sterowanym transporcie substancji biologicznie aktywnych w wielu przypadkach będą stanowiły podejście dedykowane medycynie personalizowanej, która w ostatnich latach nabiera coraz większego znaczenia.<sup>78, 87,115</sup>

### **4.3. Magnetycznie sterowalne kapsuły do celowanego i kontrolowanego transportu substancji biologicznie aktywnej – stan badań**

Pomimo faktu, że na chwilę obecną nie ma dostępnego na rynku magnetycznie sterowanego nośnika przeznaczonego do celowanego i kontrolowanego dostarczania substancji aktywnych, badania nad tego typu układami stanowią ciągle rozwijającą się dziedzinę nanomedycyny. Ponadto analizy przeprowadzone na wynikach opublikowanych w latach 2005-2015 wskazują, że jedynie średnio 0,7% z podanej dawki nanocząstek udaje się dotrzeć w miejsce guza litego.<sup>116</sup> Wobec tego, konieczne jest opracowanie bardziej efektywnej strategii dostarczania substancji aktywnych biologicznie, a zastosowanie w tym celu zewnętrznego pola magnetycznego stanowi bardzo obiecujące podejście.

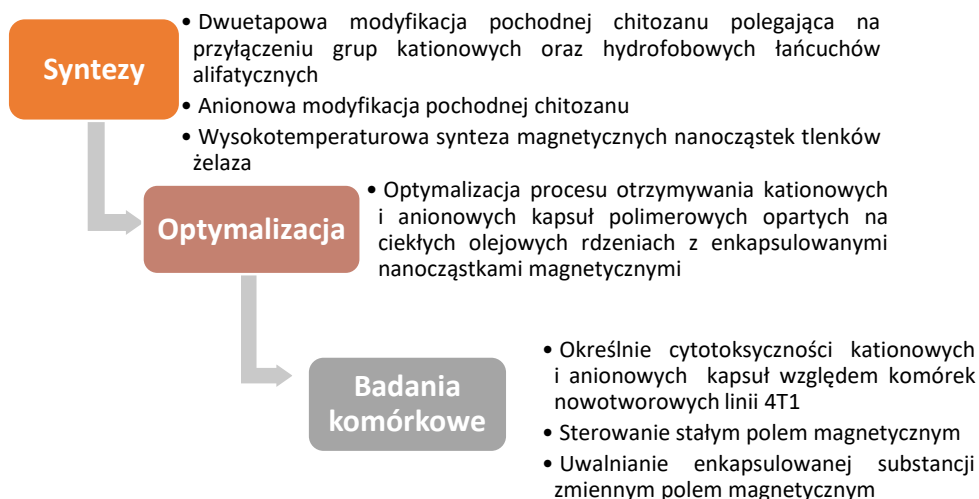
Jedno z rozwiązań proponowane przez Svenskaya *et al.*<sup>117</sup> opiera się na biodegradowalnych polimerowych kapsułach otrzymanych metodą nakładania przeciwnie naładowanych warstw polielektrolitów na stały rdzeń zbudowany z węglanu wapnia. Magnetyczne nanocząstki magnetytu mogą znajdować się w polimerowej powłoce nośnika lub w jego całej objętości. Opiswane nośniki zaprojektowane zostały z myślą o zastosowaniu teranostycznym, polegającym na umożliwianiu obrazowania zmian nowotworowych metodą MRI przy jednoczesnym dostarczeniu leku. Kapsuły wykazują rozmiar w granicy 800 nm i brak toksyczności, natomiast badania przeprowadzone na myszach z wszczepionym rakiem piersi w sposób jednoznaczny potwierdzają możliwość dokładnego obrazowania i kontrolowanego podawania substancji aktywnych. Podobne badania prowadzone dla kapsuł opartych na stałych rdzeniach z węglanu wapnia stanowią stosunkowo popularne podejście w ciągu ostatnich kilku lat.<sup>118,119</sup> Luo *et al.*<sup>120</sup> prezentują kapsuły, których powłokę stanowi wielowarstwowa polielektrolitowa otoczka z nanocząstkami tlenku żelaza, natomiast stały rdzeń to sól sodowa siarczanu dekstranu kompleksowana lekiem w postaci doksycykliny. Nośniki te są zdolne do kontrolowanego i stopniowego uwalniania enkapsulowanej substancji poprzez zastosowanie zmiennego pola magnetycznego o niskiej częstotliwości. Ze względu na termodynamiczną niestabilność zdecydowanie mniejszym zainteresowaniem cieszą się kapsuły oparte na ciekłych rdzeniach. Szczepanowicz *et al.*<sup>121</sup> opracowali i zdefiniowali kapsuły o rozmiarach rzędu 150 nm oparte na olejowych rdzeniach, których powłoka utworzona jest z przeciwnie naładowanych warstw biokompatybilnych polielektrolitów w postaci kwasu poli-L-glutaminowego i poli-L-lizyny oraz nanocząstek tlenku żelaza  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Bieżąca literatura naukowa w sposób

dokładny opisuje stabilne i dobrze zdefiniowane nanokapsuły oparte na ciekłych olejowych rdzeniach stabilizowanych za pomocą biopolimerów szczepionych. Prezentowane są również sterowane magnetycznie systemy przeznaczone do celowanego i kontrolowanego dostarczania substancji aktywnych. Połączenie tych rozwiązań stanowiłoby innowacyjne podejście w dziedzinie współczesnej medycyny.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 1. Zakres przeprowadzonych prac

Przeprowadzone prace obejmowały trzy zasadnicze etapy przedstawione na Rysunku 23: Pierwszą część stanowił szereg syntez prowadzący do otrzymania związków oraz nanocząstek magnetycznych umożliwiających utworzenie nośników w postaci sterowalnych magnetycznie biopolimerowych kapsuł opartych na ciekłych olejowych rdzeniach. W tym celu, na drodze reakcji modyfikacji naturalnego biopolimeru w postaci chitozanu otrzymano dwie pochodne: hydrofobowo modyfikowaną kationową pochodną oraz anionową pochodną chitozanu. Nanocząstki magnetyczne, odpowiedzialne za magnetyczny charakter kapsuł, otrzymano metodą termicznej dekompozycji organometalicznego prekursora. W następnym etapie wykonana została optymalizacja procesu tworzenia dwóch typów kapsuł, o dodatnim oraz ujemnym ładunku powierzchniowym. Ostatni etap stanowiły badania komórkowe mające na celu określenie możliwości zastosowania układów w charakterze sterowalnych nośników substancji hydrofobowych z funkcją celowanego i kontrolowanego magnetycznie uwalniania enkapsulowanej substancji.



**Rysunek 23** Schemat przedstawiający etapy przeprowadzonych prac.

## 2. Wykorzystane odczynniki, metody badań i aparatura

### 2.1. Odczynniki

W czasie realizacji badań wykorzystano:

- chitozan (masa molowa: 50-190 kDa, Sigma-Aldrich),
- chlorek glicydylotrimetyloamoniowy (GTMAC,  $\geq 90\%$ , Sigma-Aldrich),
- aldehyd N-dodecylowy (92%, Sigma-Aldrich),
- cyjanoborowodorek sodu ( $\text{NaCNBH}_3$ , 95%, Sigma-Aldrich),
- karboksymetylochitozan (CMC, deacetylation degree 90%, AK Scientific),
- kompleks trójtlenku siarki-trimetyloaminy (TMST, 99%, Sigma-Aldrich),
- wodorowęglan sodu ( $\text{NaHCO}_3$ , cz.d.a., Sigma-Aldrich),
- wodorotlenek sodu ( $\text{NaOH}$ , cz.d.a., Avantor Performance Materials Poland S.A.),
- chlorek żelaza (III) ( $\text{FeCl}_3$ , bezwodny, Merck),
- oleinianu sodu ( $>97\%$ , TCI),
- oktadekan (90%, Alfa Aesar),
- kwas oleinowy (OA, 99,5%, Alfa Aesar),
- perylen (Pe, gold label, 99,9%, Sigma-Aldrich),
- Czerwień Nilu (NR, for microscopy, Sigma-Aldrich),
- n-oktadekan (cz.d.a., Polyscience Corp.),
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high-glucose, Sigma-Aldrich),
- Fetal Bovine Serum (FBS, HyClone),
- Penicylina-Streptomycyna roztwór (Symbios),
- trypsyna (HyClone),
- mieszanina soli do sporządzania buforu fosforanowego (PBS, tabletki, Sigma-Aldrich),
- dimetylosulfotlenek (DMSO,  $\geq 99,7\%$ , Sigma-Aldrich),
- XTT (cell proliferation kit II, Sigma-Aldrich),

- formalina (roztwór wodny 36,5-38%, Sigma-Aldrich),
- Hoechst (Sigma-Aldrich),
- jodek propidyny (PI, Sigma-Aldrich),
- kwas octowy (99,5%, Chempur),
- chlorek sodu (NaCl, cz.d.a., Lachner),
- etanol (96%, Chempur),
- aceton (cz.d.a., Chempur),
- metanol (cz.d.a., Chempur),
- heksan (cz.d.a., Chempur),
- celulozowe tuby dializacyjne (14 000 g/mol cut-off, Sigma Aldrich),
- gaz obojętny - argon,
- wszystkie badania komórkowe przeprowadzone zostały względem linii komórkowej raka sutka pochodzącej z tkanki gruczołu sutkowego mysiego szczepu BALB/c (linia 4T1, ATCC CRL-2539),
- wszystkie wodne roztwory zostały przygotowane z wykorzystaniem wody dejonizowanej.

## **2.2. Metody badań i aparatura**

### **2.2.1. Miareczkowanie konduktometryczne oraz pomiary pH**

Określenie stopnia podstawienia pochodnej chitozanu czwartorzędowymi grupami amoniowymi przeprowadzono w oparciu o miareczkowanie konduktometryczne azotanem(V) srebra. Pomiary wykonano wykorzystując wielofunkcyjny aparat pomiarowym CPC - 505 Conbest z platynową elektrodą wskaźnikową do miareczkowania konduktometrycznego i elektrodą szklaną typu EPS-1 wykorzystaną do pomiarów pH roztworów sporządzanych w czasie prowadzenia badań.

### **2.2.2. Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego ( $^1\text{H}$ NMR)**

Pomiary widm zsyntezowanej pochodnej chitozanu modyfikowanej kationowo i hydrofobowo wykonane zostały przy użyciu spektrometru Avance III HD 400 MHz firmy Burker wyposażonego w sondy gradientowe, pracujące w trybie normalnej i odwróconej detekcji. Badania przeprowadzono w Laboratorium Spektroskopii NMR w Jagiellońskim Centrum Innowacji.

### **2.2.3. Analiza elementarna**

Analizy spalieniowe zsyntezowanej anionowej pochodnej chitozanu przeprowadzone zostały za pomocą analizatora Vario Micro Cube CHNS Analyzer firmy Elementar. Każda próbka została poddana badaniu trzykrotnie. Pomiary wykonano w Pracowni Analiz Elementarnych Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

### **2.2.4. Fourierowska spektroskopia w podczerwieni**

Widma anionowej pochodnej chitozanu i wysuszonych próżniowo nanocząstek magnetycznych zarejestrowano przy użyciu spektrometru ALPHA FT-IR firmy Bruker, pracującego w trybie osłabionego całkowitego odbicia (ATR) z przystawką diamentową. Dla każdej próbki wykonywano co najmniej 128 skanów z rozdzielczością  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.2.5. Skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa**

Do obrazowania nanocząstek magnetycznych zastosowano mikroskop Nova NanoSEM 450 (FEI, the Netherlands) działający w trybie skaningowego transmisyjnego mikroskopu elektronowego z wiązką o energii 30 keV. Badania przeprowadzono na Wydziale Inżynierii Metali i Informatyki Przemysłowej Akademii Górniczo-Hutniczej.

Na podstawie otrzymanych mikrofotografii, za pomocą programu Fiji-ImageJ określony został średni rozmiar nanocząstek magnetycznych.

### **2.2.6. Jednoczesna analiza termiczna (STA)**

Jednoczesna analiza termiczna obejmująca analizę termogravimeryczną i skaningową kalorymetrię różnicową wysuszonych próżniowo nanocząstek magnetycznych wykonana została urządzeniem STA 449F3 firmy Netzsch na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH.

### **2.2.7. Dyfraktometria rentgenowska**

Dyfraktogramy wysuszonych próżniowo nanocząstek magnetycznych otrzymano w pomiarze przeprowadzonym w temperaturze pokojowej za pomocą promieniowania Cu-K $\alpha$  na dyfraktometrze rentgenowskim Siemens D5000 wyposażonym w grafitowy monochromator wiązki ugiętej.

### **2.2.8. Spektrometria Mössbauera**

Pomiary nanocząstek magnetycznych przeprowadzono w trybie transmisyjnym na spektrometrze Mössbauera dla izotopu  $^{57}\text{Fe}$ , pracującym przy stałym przyspieszeniu. Zastosowano źródło 50 mCi  $^{57}\text{Co/Rh}$ . Otrzymano widma mierzone w temperaturze pokojowej, temperaturze ciekłego azotu i temperaturze ciekłego helu.



### **2.2.9. Magnetometria z wibrującą próbką**

Właściwości magnetyczne wysuszonych próżniowo nanocząstek i kapsuł kationowych zawieszonych w 0,15 M roztworze chlorku sodu zmierzono za pomocą magnetometru z wibrującą próbką znajdującego się w zestawie Quantum Design Physical Property Measurement System z magnesem nadprzewodzącym 9T. Pomiary magnetyzacji wykonano w funkcji przyłożonego pola magnetycznego w wybranych temperaturach w zakresie 4-300 K. Pomiar podatności magnetycznej wykonano w warunkach grzania w zewnętrznym polu równym 100 Oe uprzednio schłodzonej próbki (krzywa ZFC), a następnie jej chłodzenia w warunkach takiego samego zewnętrznego pola (krzywa FC).

### **2.2.10. Pomiary średnic hydrodynamicznych oraz potencjału dzeta**

Pomiary średnic hydrodynamicznych kapsuł w oparciu o zjawisko dynamicznego rozpraszania światła oraz pomiary wartości potencjałów powierzchniowych/elektrokinetycznych (potencjał dzeta) wykonano przy użyciu urządzenia Malvern Nano ZS AP Instruments z wykorzystaniem lasera o długości fali równej 633 nm, przy kącie detekcji 173° i w temperaturze 22°C. Otrzymane wartości uzyskano ze średniej z trzech serii pomiarowych składających się z co najmniej 10 powtórzeń. Niepewności przedstawiono jako odchylenia standardowe.

### **2.2.11. Transmisyjna mikroskopia elektronowa w warunkach kriogenicznych**

Obrazowanie kapsuł o dodatnim ładunku powierzchniowym zawierających enkapsulowane nanocząstki magnetyczne przeprowadzono z użyciem transmisyjnego kriomikroskopu elektronowego TECNAI F20 TWIN. Pomiary przeprowadzone zostały w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze.

### 2.2.12. Fluorescencyjna mikroskopia konfokalna

Obrazowanie kapsuł oraz komórek nowotworowych linii 4T1 po przeprowadzonych eksperymentach z polem magnetycznym wykonano za pomocą odwróconego mikroskopu konfokalnego Nikon Ti-E wyposażonego w immersyjny obiektyw Plan Apo 100x/1.4 Oil DIC oraz system konfokalny Nikon A1. Do wzbudzenia wykorzystywano lasery o długości fali odpowiedniej dla zastosowanego barwnika fluorescencyjnego, a do zbierania obrazów detektor światła przechodzącego oraz odpowiednie filtry przedstawione w Tabeli 2:.

**Tabela 2** Długości fali wzbudzenia oraz rodzaje filtrów w zależności od zastosowanego barwnika fluorescencyjnego przy obrazowaniu próbek mikroskopem konfokalnym.

Barwnik	Długość fali lasera wzbudzającego	Filtr
Perylen	405 nm	DAPI (425-475 nm)
Czerwień Nilu	561 nm	TRITC (570-620 nm)
Hoechst	405 nm	DAPI (425-475 nm)
Jodek propidyny	561 nm	TRITC (570-620 nm)

### 2.2.13. Spektrofotometria do pomiarów płytek mikrotitracyjnych

Pomiar absorpcji po przeprowadzonym teście przeżywalności komórkowej XTT wykonano przy użyciu spektrofotometrycznego czytnika płytek Epoch 2 firmy BioTek Instruments. Pomiar wykonano dla długości fali równej 460 nm i 700 nm.

### 2.2.14. Źródło stałego pola magnetycznego

Źródło stałego pola magnetycznego stanowił magnes neodymowy. Odległość pomiędzy próbką a magnesem wynosiła 1 cm co odpowiadało indukcji magnetycznej o wartości 143 mT.

### 2.2.15. Generator zmiennego pola magnetycznego

Zmienne pole magnetyczne o częstotliwości 50 Hz było wytwarzane przy pomocy układu transformatora ze szczeliną, w której umieszczano próbkę. Eksperyment przeprowadzano przy wartościach indukcji pola 0 – 220 mT RMS (- 310 ÷ +310 mT). Próbki poddawano działaniu pola przez 5 minut przy parametrach zaprezentowanych w Tabeli 3:.

**Tabela 3** Wartości indukcji magnetycznej zastosowanych przy eksperymentach ze zmiennym polem magnetycznym.

<b>Pole</b>	<b>Wartość indukcji [mT]</b>
<b>Słabe</b>	22
<b>Średnie</b>	67
<b>Mocne</b>	220

### 2.2.16. Inna używana aparatura

Na etapie syntezy wykorzystano wirówkę laboratoryjną MPW-351R. Roztwory zsyntezowanych pochodnych chitozanu poddano suszeniu przy wykorzystaniu liofilizatora Alpha 1-2 LD Plus (Christ). W procesie otrzymywania kapsuł wykorzystywano wytrząsarkę Vortex Genius 3 (IKA) oraz łąźnię ultradźwiękową Sonic-6 o mocy 540 W (Polsonic). W badaniach komórkowych wykorzystywano mikroskop optyczny Nikon Eclipse TS 100.

### **3. Przeprowadzone syntezy i inne procedury**

#### **3.1. Modyfikacje chitozanu**

Pierwszy etap badań stanowiło przeprowadzenie szeregu modyfikacji chitozanu umożliwiających, w kolejnych etapach pracy, utworzenie nośnika w postaci biopolimerowych kapsuł opartych na ciekłych olejowych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi. Przeprowadzona została dwuetapowa modyfikacja pochodnej chitozanu mająca na celu przyłączenie grup kationowych i hydrofobowego łańcucha do struktury związku oraz anionowa modyfikacja pochodnej chitozanu.

##### **3.1.1. Modyfikacja chitozanu grupą kationową**

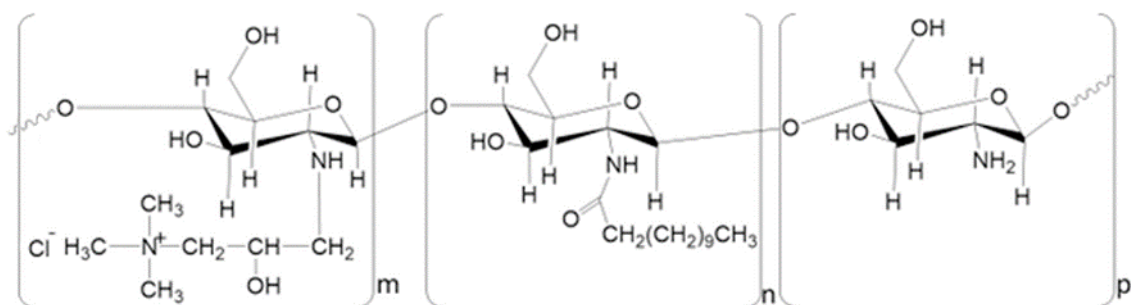
W celu uzyskania kationowej pochodnej wykonana została reakcja redukcyjnego alkilowania oparta na modyfikacji chitozanu przy zastosowaniu chlorku glicydylotrimetyloamoniowego (GTMAC) prowadząca do otrzymania chlorku N-[(2-hydrokso-3-trimetyloamino)propylo]chitozanu. Synteza pochodnej chitozanu została wykonana na podstawie zmodyfikowanej procedury przedstawionej przez Karewicz et al.<sup>122</sup> Przeprowadzona reakcja polegała na zmieszaniu 17 mL chlorku glicydylotrimetyloamoniowego z 160 mL 2% roztworu chitozanu rozpuszczonego w 1% kwasie octowym. Następnie roztwór poddano mieszaniu przez 48 godzin w temperaturze 70°C. Otrzymany produkt strącono w lodowatej mieszaninie acetonu i metanolu w stosunku objętościowym 1:1. Osad odwirowano (10°C, 10 000 rpm, 10 minut) i przemyto acetonem, czynność powtórzono 3-krotnie. W kolejnym etapie osad rozpuszczono w niewielkiej ilości wody dejonizowanej i poddano czterodniowej dializie do wody. Otrzymany związek poddano liofilizacji.

Stopień podstawienia chitozanu chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym wyznaczono przy wykorzystaniu miareczkowania konduktometrycznego azotanem(V) srebra.

### 3.1.2. Hydrofobowa modyfikacja kationowej pochodnej chitozanu

Hydrofobowa modyfikacja kationowej pochodnej chitozanu polegała na dodatkowym przyłączeniu łańcuchów n-dodecylovych poprzez reakcję opisaną wcześniej w literaturze.<sup>123</sup> W celu uzyskania pożądanej pochodnej, przedstawionej na Rysunku 24:, rozpuszczono 1 g chlorku N-[(2-hydrokso-3-trimetyloamino)propylo]chitozanu w roztworze metanolu i 1% wodnego roztworu kwasu octowego w stosunku objętościowym 1:1. Następnie do mieszaniny dodano 0,3 mmol aldehydu N-dodecylovego oraz 20 mmol cyjanoborowodoru sodu rozpuszczonego w 20 mL metanolu. Otrzymany roztwór poddano mieszanemu w temperaturze 20°C przez 36 godzin i strącono poprzez dodanie mieszaniny metanolu i eteru dietylowego w stosunku objętościowym 1:1. Powstały osad przepłukano kilkakrotnie metanolem, rozpuszczono w wodzie dejonizowanej i poddano czterodniowej dializie do mieszaniny wody i metanolu o stosunku objętościowym 3:1. Otrzymany produkt poddano liofilizacji.

Stopień podstawienia hydrofobowymi grupami n-dodecylovymi określony został na podstawie pomiarów NMR.

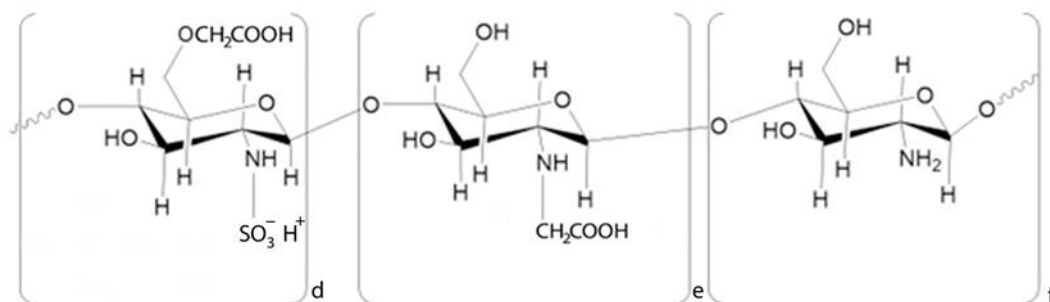


**Rysunek 24** Schemat pochodnej chitozanu modyfikowanej kationowo - chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym oraz hydrofobowo- grupami n-dodecylovymi.

### 3.1.3. Modyfikacja chitozanu grupą anionową

Zgodnie z procedurą opisaną wcześniej przez Bulwan *et al.*<sup>123</sup> przeprowadzona została anionowa modyfikacja chitozanu poprzez przyłączenie grup sulfaminowych.

W tym celu, 1 g karboksymetylochitozanu (CMC) dodano do roztworu wody dejonizowanej z rozpuszczonym wcześniej 2,5 g kompleksu trójtlenku siarki z trimetyloaminą (TMST), 1,3 g wodorowęglanu sodu i wodorotlenku sodu w ilości potrzebnej do osiągnięcia pH roztworu równego 8. Reakcja prowadzona była w warunkach nieustannego mieszania przy temperaturze 55°C przez 24 godziny. Następnie otrzymany produkt dializowano do wody przez 72 godziny i poddano liofilizacji. Rysunek 25 przedstawia schemat zsyntezowanej pochodnej.



**Rysunek 25** Schemat pochodnej chitozanu zmodyfikowanej anionowo grupami sulfaminowymi.

Odpowiednie naszczenie grup sulfaminowymi zweryfikowano przy zastosowaniu fourierowskiej spektroskopii w podczerwieni, natomiast stopień podstawienia określony został na podstawie analizy elementarnej.

#### **3.1.4. Wyznaczenie stopnia podstawienia chitozanu grupą glicydylotrimetyloamoniową**

Stopień podstawienia polisacharydu czwartorzędową grupą aminową odpowiadającą za kationowy charakter całego związku wyznaczony został za pomocą miareczkowania konduktometrycznego azotanem(V) srebra ( $\text{AgNO}_3$ ). Wykorzystano strąceniową reakcję jonów srebra z jonami chlorkowymi znajdującymi się w naszczepionych grupach glicydylotrimetyloamoniowych.<sup>124</sup>

W celu wykonania pomiaru sporządzono 3 roztwory zawierające 10 mg otrzymanej pochodnej chitozanu (CChit) rozpuszczone w 10 mL wody dejonizowanej. Następnie przeprowadzono miareczkowanie 0,017 M roztworem azotanu(V) srebra wykonując pomiary przewodnictwa w funkcji dodanego roztworu. Procentowy stopień

podstawienia grupami kationowymi ( $DS_{GTMAC}$ ) wyznaczony został na podstawie wzoru:

$$DS_{GTMAC} = \frac{1,7 \cdot 10^{-5} \cdot V_{AgNO_3}}{\left( \frac{W_w - [1,7 \cdot 10^{-5} \cdot V_{AgNO_3} \cdot m_{GTMAC}]}{(m_G \cdot DDA) + m_{AG}(1 - DDA)} \right)} \cdot 100\% \quad \text{Równanie 4}$$

gdzie:

$1,7 \cdot 10^{-5}$  – liczba moli  $AgNO_3$  w 1 mL roztworu,

$V_{AgNO_3}$  – objętość 0,017 M roztworu  $AgNO_3$ , która odpowiada punktowi o najniższym przewodnictwie (punkt końcowy miareczkowania) [mL],

$W_w$  – masa kationowo modyfikowanego chitozanu rozpuszczonego w 100 mL wody dejonizowanej [g],

$m_{GTMAC}$  – masa molowa chlorku glicydylotrimetyloamoniowego (151 g/mol),

$m_G$  – masa molowa glukozaminy (161 g/mol),

$m_{AG}$  – masa molowa zacetylowanej glukozaminy (203 g/mol),

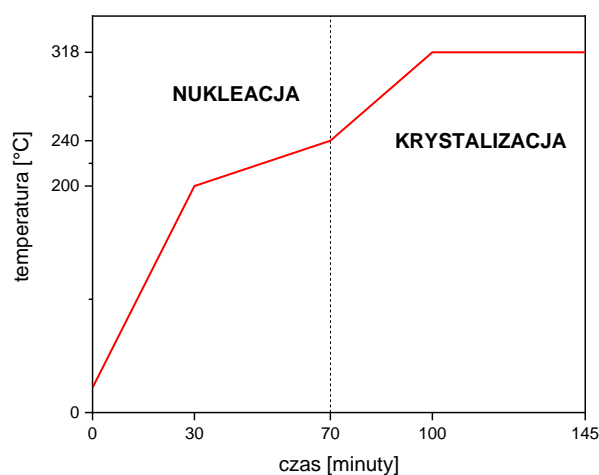
DDA – wyznaczony na podstawie analizy elementarnej stopień deacetylacji chitozanu (0,83).

### **3.2. Wysokotemperaturowa synteza nanocząstek tlenków żelaza z powłoką hydrofobową**

Syntezę oleinianu żelaza (III) wykonano w oparciu o procedurę przedstawioną wcześniej przez Leszczyńskiego *et al.*<sup>125</sup> W celu uzyskania organometalicznego prekursora zmieszano 30 mL wody dejonizowanej, 40 mL etanolu, 70 mL heksanu, 3,25 g bezwodnego chlorku żelaza (III) i 18,25 g oleinianu sodu. Powstały roztwór ogrzano do 60°C i utrzymywano w warunkach nieustannego mieszania przez 5 godzin. Następnie odseparowano ciemną część hydrofobową, przepłukano wodą dejonizowaną i podgrzano do 40°C w celu odparowania resztek heksanu.

Synteza prowadząca bezpośrednio do uzyskania nanocząstek została przeprowadzona na podstawie procedury opisanej wcześniej przez Park *et al.*<sup>126</sup> Początkowo zmieszano 42 mL oktadekanu, 1,1 mL kwasu oleinowego i 7 g otrzymanego wcześniej oleinianu żelaza (III). Cała reakcja prowadzona była w warunkach gazu obojętnego, przy nieustannym mieszaniu i w reżimie

temperaturowym przedstawionym na schemacie poniżej (Rysunek 26). Otrzymany produkt ostudzono do temperatury pokojowej, przemyto kilkakrotnie etanolem, a nieprzereagowane substraty usunięto poprzez sonikację w heksanie (tryb ciągły, 5 minut) i odwirowanie (5 000 rpm, 5 minut). Uzyskane nanocząstki wysuszono próżniowo.



**Rysunek 26** Warunki temperaturowe w funkcji czasu, panujące podczas reakcji termicznej dekompozycji oleinianu żelaza (III).

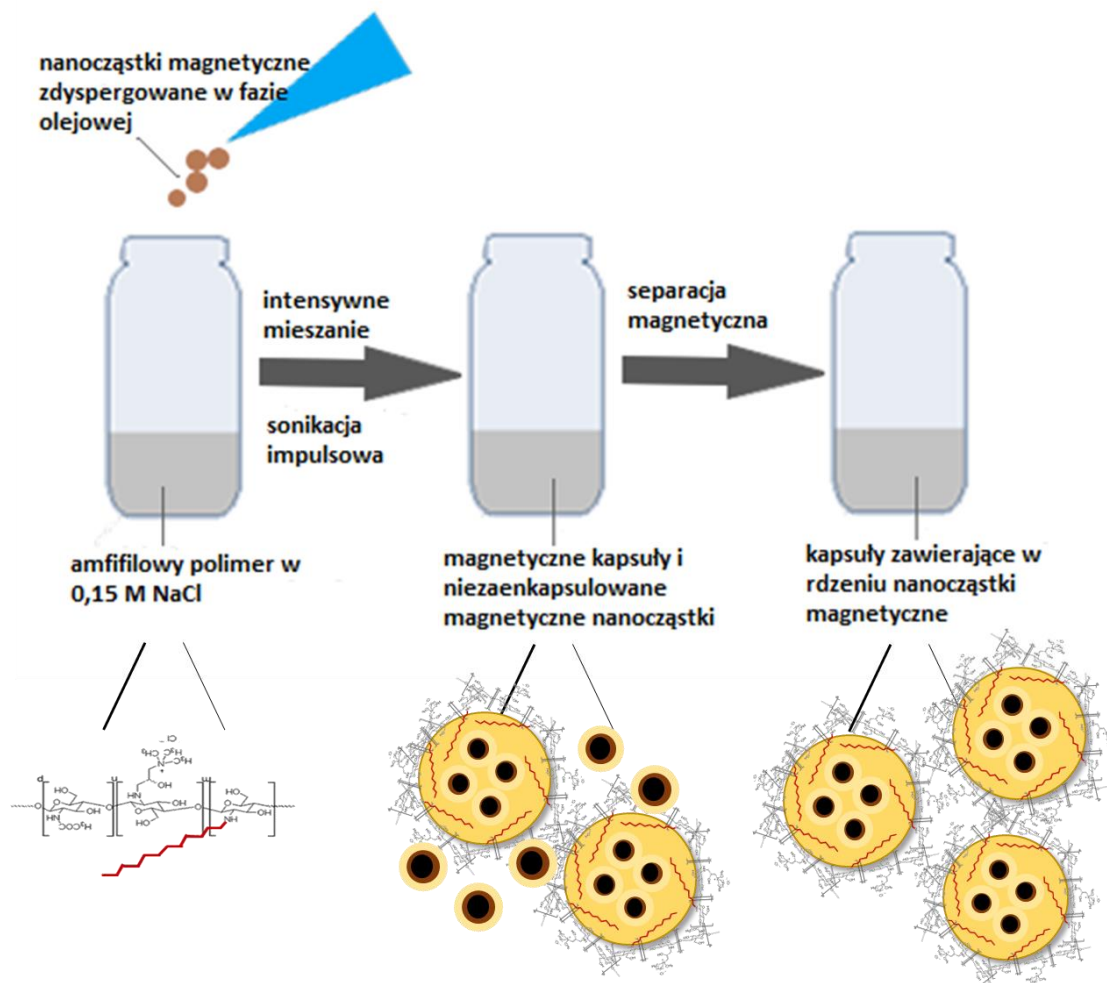
Otrzymane nanocząstki poddano szczegółowej charakteryzacji fizykochemicznej poprzez pomiary magnetometryczne, dyfraktometrię rentgenowską, fourierowską spektroskopię w podczerwieni, spektroskopię Mössbauera oraz obrazowanie STEM.

### **3.3. Tworzenie kationowych kapsuł opartych na ciekłych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi**

Procedura preparatyki kapsuł o ciekłych olejowych rdzeniach w oparciu o zjawisko samoorganizacji amfifilowych polimerów szczepionych została wcześniej opisana przez Szafraniec *et al.*<sup>127,128</sup> W związku z dodatkową enkapsulacją nanocząstek magnetycznych wspomniana wyżej procedura została zmodyfikowana. Schemat procedury przedstawia Rysunek 27. Wobec tego, 10  $\mu$ L kwasu oleinowego ze zdyspergowanymi nanocząstkami magnetycznymi o stężeniu 100 mg/mL dodano do 1 mL 0,15 M roztworu chlorku sodu (NaCl) z 1 mg rozpuszczonego modyfikowanego



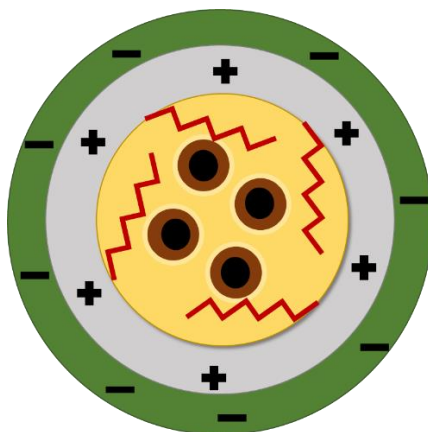
chitozanu CChitC12. Otrzymany rozwór poddano intensywnemu mieszaniu w wytrząsarce, a następnie sonikacji impulsowej (w trybie 1 s pracy, 2 s przerwy, temperatura pokojowa) w celu dokładnego odłożenia warstwy polimeru na powierzchni olejowych rdzeni kapsuł. Niezencapsulowane nanocząstki magnetyczne usunięto poprzez separację magnetyczną. Powstała w ten sposób emulsja wykazywała szarobiałe zabarwienie.



**Rysunek 27** Schemat ilustrujący procedurę preparatyki kationowych kapsuł opartych na olejowych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi.

### **3.4. Tworzenie anionowych kapsuł opartych na ciekłych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi**

Drugi typ badanych kapsuł stanowiły układy posiadający ujemny ładunek powierzchniowy (Rysunek 28). Anionowe kapsuły przygotowane zostały w oparciu o technikę nakładania przeciwnie naładowanych warstw. W celu utworzenia takich nośników do 0,4 mL dyspersji kapsuł kationowych dodano 0,6 mL roztworu chitozanu anionowego (AChit) rozpuszczonego w 0,0015 M roztworze chlorku sodu o stężeniu 1 g/L. Otrzymany roztwór poddano 10 minutowemu intensywnemu mieszaniu na wytrząsarce.



**Rysunek 28** Schemat anionowej kapsuły opartej na olejowym rdzeniu z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi.

### **3.5. Tworzenie kapsuł opartych na ciekłych fluorescencyjnych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi**

Na potrzeby obrazowania za pomocą mikroskopu konfokalnego niezbędna była fluorescencyjna modyfikacja badanych kapsuł. Procedura tworzenia zarówno dla kapsuł kationowych, jak i anionowych została poszerzona o jeden etap polegający na dodaniu odpowiedniego barwnika fluorescencyjnego do olejowej zawiesiny nanocząstek magnetycznych stanowiących później rdzeń nośnika. W przypadku kapsuł wzbogacony o barwnik w postaci perylenu, do olejowego roztworu dodano 1 mg barwnika na 1 mL mieszaniny oleju zawierającego zdyspergowane

nanocząstki magnetyczne. Analogiczne rozwiązanie zastosowano dla barwnika Czerwień Nilu z różnicą wartości stężenia wynoszącą 5 mg/mL. Oba barwniki to substancje rozpuszczalne w środowisku hydrofobowym. Otrzymane roztwory kapsuł przechowywano w buteleczkach z ciemnego szkła chroniącego właściwości fluorescencyjne nośników.

### **3.6. Tworzenie stężonych zawiesin kationowych kapsuł opartych na ciekłych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi**

W celu sprawdzenia właściwości magnetycznych kapsuł zaplanowany został pomiar magnetometrią z wibrującą próbką. W związku z ograniczeniami aparaturowymi niezbędne było sporządzenie dyspersji kapsuł zawierającej zwiększone stężenie nanocząstek magnetycznych, a co się z tym wiąże - zwiększoną ilość nośnika zawieszzonego w roztworze. Preparatykę próbki przeprowadzono według procedury analogicznej do procedury tworzenia kationowych kapsuł z wykorzystaniem 30  $\mu$ L kwasu oleinowego ze zdyspergowanymi nanocząstkami magnetycznymi o stężeniu 100 g/L oraz 1 mL pochodnej chitozanu (CChitC12) o stężeniu 10 g/L 0,15 M roztworu NaCl.

### **3.7. Hodowla komórek nowotworowych linii 4T1**

Badania komórkowe prowadzone zostały z wykorzystaniem linii 4T1 będącej komórkami nowotworowymi pochodzącymi z tkanki mysiego gruczołu sutkowego. Hodowla prowadzona była w warunkach sterylnych w 37°C i w obecności 5% CO<sub>2</sub>.

Hodowlę komórkową prowadzono przy wykorzystaniu pożywki stanowiącej medium suplementowane antybiotykiem w postaci roztworu penicyliny i streptomycyny (1%) oraz bydlęcej surowicy płodowej (5%). Wszystkie reagenty wykorzystywane podczas badań komórkowych ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C.

W pierwszym etapie rozmrożono komórki do hodowli, przeniesiono zawiesinę komórkową do próbki wirówkowej i dodano 5 mL pożywki, aby rozcieńczyć dimetylosulfotlenek (DMSO). Następnie komórki poddano wirowaniu (1000 rpm, 5 min), zlane roztwór z palety komórkowej i zawieszono w 1 mL pożywki. Tak przygotowane komórki wysiewano na szalkę, do której wcześniej dodano 10 mL

pożywki. Namnażanie komórek oraz ich stan w trakcie hodowli kontrolowano za pomocą mikroskopu optycznego, a pożywkę wymieniano co 2 dni.

W celu wykonania pasażu przeprowadzono trypsynizację. Szalkę z namnożonymi komórkami przepłukano roztworem PBS; czynność powtórzono dwukrotnie. Kolejno dodano 0,8 mL roztworu trypsyny, który odciągnięto i ponownie dodano 0,8 mL trypsyny. Tak przygotowaną szalkę umieszczono w inkubatorze, a po upływie 3 minut dokładnie obstukano i ponownie włożono do inkubatora. Po kolejnych 3 minutach szalkę ponownie obstukano, kontrolując pod mikroskopem stopień oderwania się komórek od podłoża. Odklejone komórki przeniesiono z szalki do probówki typu falcon dodając wcześniej 3 mL pożywki w celu dezaktywacji działania trypsyny. Otrzymaną zawiesinę komórek odwirowano (1000 rpm, 5 minut), odwirowany płyn odlano, a osadzone komórki zawieszono w 1 mL pożywki. W ten sposób otrzymywano zawiesinę komórkową, która była wykorzystywana w kolejnych eksperymentach.

### **3.8. Test cytotoksyczności kapsuł względem komórek nowotworowych linii 4T1 (test XTT)**

W celu określenia cytotoksyczności kapsuł kationowych i anionowych względem linii 4T1 przeprowadzono test XTT. Test ten umożliwia określenie aktywności metabolicznej mitochondriów komórkowych w oparciu o spektrofotometryczny odczyt reakcji redukcji soli tetrazolowych XTT w formazan dzięki działaniu dehydrogenazy mitochondrialnej.<sup>129</sup>

Przed przystąpieniem do bezpośredniego określenia toksyczności kapsuł względem wybranej linii komórkowej przygotowano dzień wcześniej dwie 24-dołkowe płytki zawierające komórki linii 4T1 oraz odpowiednie stężenia dyspersji kapsuł kationowych (płytką 1) i kapsuł anionowych (płytką 2). Preparaty sporządzono poprzez dodanie do każdego dołka 0,9 mL pożywki i następane dodanie 100  $\mu$ L zawiesiny z komórkami (procedura opisana w podrozdziale 3.7). Zawartość każdego dołka dokładnie przemieszano poprzez przepipetowanie i kilkukrotne potrząśnięcie płytką. Wysiane płytki umieszczono w inkubatorze na 4 godziny. Kolejny etap stanowiło dodanie czynnika w postaci kapsuł. W tym celu odsysaczem odciągnięto płyn z każdego dołka płytki i dodano po 1 mL pożywki. Następnie do każdego dołka dodano 0,1 mL czynnika stanowiącego kapsuły rozcieńczone w 0,15 M NaCl (dla kapsuł kationowych) lub 0,0015M NaCl (dla kapsuł anionowych) otrzymując stężenia przedstawione na Rysunku 29: oraz samego roztworu 0,15 M NaCl (dla

kapsuł kationowych) lub 0,0015 M NaCl (dla kapsuł anionowych), a otrzymane roztwory przemieszano w dołkach przez przepipetowanie. Przygotowane płytki z preparatami komórkowymi umieszczono w inkubatorze na 24 godziny.

1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL NaCl (kontrola)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL NaCl (kontrola)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL NaCl (kontrola)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL kapsuł (10%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL kapsuł (10%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL kapsuł (10%)
1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (8%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (8%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (8%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (6%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (6%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (6%)
1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (4%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (4%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (4%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (2%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (2%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (2%)
1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (1%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (1%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL roztworu kapsuł (1%)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL NaCl (kontrola)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL NaCl (kontrola)	1 mL zawiesiny komórek + 0,1 mL NaCl (kontrola)

**Rysunek 29** Schemat wypełnienia płytki 24-dołkowej przygotowanej w celu określenia toksyczności kapsuł względem komórek linii 4T1.

Przed przystąpieniem do eksperymentu przygotowano odczynniki niezbędne do przeprowadzenia testu XTT. Zgodnie z instrukcją producenta ogrzano do 37°C, a następnie zmieszano 5 mL odczynnika znakującego i 0,1 mL reagenta sprzęgającego. Przed dodaniem roztworu wyciągnięto przygotowane dzień wcześniej płytki z inkubatora i odpipetowano znajdujący się w nich płyn, dodając 0,2 mL nowej pożywki, a następnie 0,1 mL roztworu XTT do każdego dołka. Zawartości płytek delikatnie zamieszano i umieszczono płytki w inkubatorze. Po upływie 1 godziny przystąpiono do spektrofotometrycznego pomiaru absorpcji.

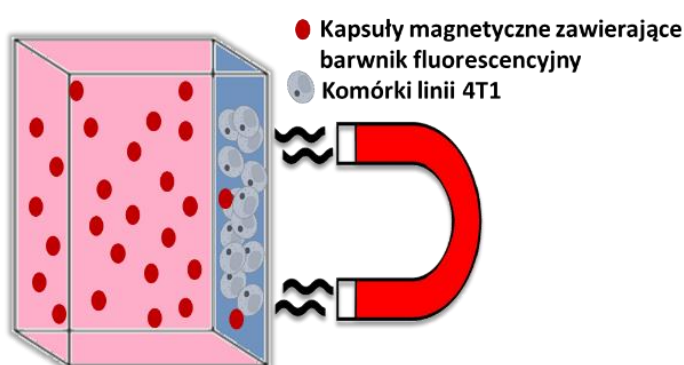
### 3.9. Sterowanie kapsuł do wnętrza komórek nowotworowych stałym polem magnetycznym

Możliwość magnetycznego sterowania kapsułami zawierającymi nanocząstki magnetyczne zweryfikowano przeprowadzając eksperyment z zastosowaniem stałego pola magnetycznego przyłożonego do kuwety wypełnionej kapsułami zawieszonymi w pożywce oraz szkiełkiem mikroskopowym zawierającym na powierzchni żywe komórki. W celu wykluczenia wpływu sił grawitacyjnych na przenikanie kapsuł do wnętrza komórek, szkiełko z hodowlą komórkową umieszczone zostało w pozycji wertykalnej.

Przed przystąpieniem do głównego eksperymentu, niezbędne było utworzenie hodowli na szkiełkach, w tym celu wykorzystano odpowiednio wycięte i sterylne mikroskopowe szkiełka nakrywkowe, które umieszczono w 6-dołkowych płytkach komórkowych. Procedura postępowania była analogiczna jak w opisanym w podrozdziale 3.7 wysiewaniu komórek na płytkach. Następnie w sterylnych kuwetach umieszczono na bocznej ścianie szkiełko z hodowlą komórkową i wiano 1 mL medium i 0,1 mL 2% dyspersji kapsuł w 0,15 M NaCl (dla kapsuł kationowych) i 0,0015 M NaCl (dla kapsuł anionowych).

Tak przygotowane kuwety poddano działaniu zewnętrznego stałego pola magnetycznego (odpowiednio przez 5 min i 15 min) zgodnie ze schematem przedstawionym na Rysunku 30:.. Wykonano również eksperymenty mające na celu sprawdzenie samoistnego wnikania kapsuł do wnętrza komórek oraz wpływu zewnętrznego stałego pola magnetycznego na stan komórek.

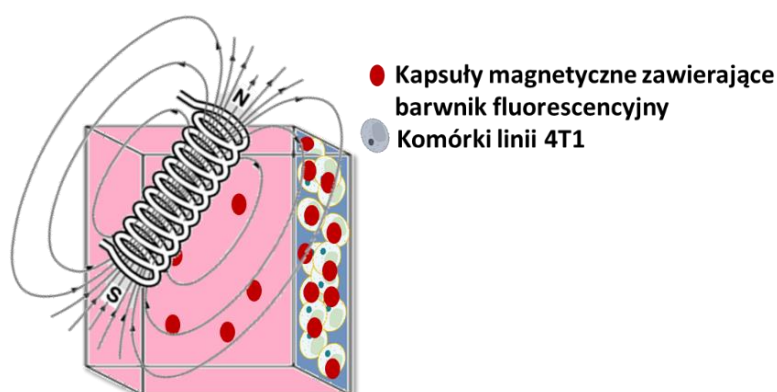
Po zakończonym eksperymencie komórki znajdujące się na szkiełku utrwalono, co umożliwiło ich późniejsze zobrazowanie za pomocą mikroskopu konfokalnego. W celu utrwalenia, szkiełka z komórkami przeniesiono do 6-dołkowej płytki i dwukrotnie przepłukano 2 mL roztworu PBS. Następnie do każdego dołka dodano 2 mL 10% roztworu formaliny w PBS. Po upływie 10 minut roztwór odciągnięto, szkiełka przepłukano roztworem PBS i nałożono na mikroskopowe szkiełko podstawowe, zabezpieczając brzegi lakierem.



**Rysunek 30** Schemat eksperymentu przeciągania komórek za pomocą stałego pola magnetycznego.

### 3.10. Uwalnianie enkapsulowanej substancji z kapsuł wewnątrz komórek nowotworowych za pomocą zmiennego pola magnetycznego

Weryfikację możliwości uwolnienia enkapsulowanej w nośniku substancji sprawdzono poprzez zastosowanie zmiennego pola magnetycznego. Użycie zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego wykonano jako następny etap względem eksperymentu opisanego w podrozdziale 3.9. Opisany wyżej układ po poddaniu 15 minutowemu działaniu stałego pola magnetycznego, przeniesiono na 5 minut do układu wytwarzającego zmienne pole magnetyczne o różnym natężeniu (indukcji). Wykonano również eksperymenty mające na celu wykluczenia szkodliwego dla komórek działania zmiennego pola, poprzez przeprowadzenie tzw. ślepych prób na komórkach bez kontaktu z kapsułami. Schemat procedury przeprowadzania eksperymentów przedstawia Rysunek 31.



**Rysunek 31** Schemat eksperymentu uwolnienia substancji enkapsulowanej wewnątrz komórek za pomocą zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego.

Po zakończonym eksperymencie szkiełka z komórkami utrwalono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.9.

### **3.11. Weryfikacja przeżywalności komórek po przeprowadzeniu eksperymentów z zewnętrznym polem magnetycznym**

Przygotowano dwa roztwory, 10 mg Hoechstu rozpuszczonego w 1 mL wody dejonizowanej i rozcieńczonego roztworem PBS w stosunku objętościowym 1:2000 oraz 1 mg jodku propidyny rozpuszczonego w 1 mL wody dejonizowanej i rozcieńczonego w roztworze PBS w stosunku objętościowym 1:3000. Następnie, utrwalone po eksperymencie z zewnętrznym polem magnetycznym, znajdujące się na szkiełku komórki, poddano 5-minutowemu działaniu odpowiedniego barwnika, przepłukano 3-krotnie roztworem PBS, umieszczono na mikroskopowym szkiełku podstawowym i zabezpieczono lakierem. Tak otrzymane preparaty poddano obrazowaniu mikroskopem konfokalnym.



## 4. Wyniki badań i ich dyskusja

### 4.1. Modyfikowany chitozan

Przeprowadzone modyfikacje dotyczyły chitozanu, będącego polisacharydem naturalnego pochodzenia, wykazującym brak toksyczności, biodegradowalność oraz biokompatybilność. Właściwości te są niezwykle istotne przy rozważaniu potencjalnego medycznego zastosowania kapsuł zawierających w swojej strukturze pochodne tego związku. Przeprowadzone zostały trzy modyfikacje prowadzące do otrzymania chitozanu o właściwościach kationowych, kationowych i hydrofobowych oraz anionowych.

Zarówno odpowiednie modyfikacje jonowe, jak i naszczenie bocznych grup hydrofobowych stanowią bardzo istotny aspekt wpływający bezpośrednio na stabilność i rozmiar nośnika oraz jego zachowanie w warunkach *in vivo*.

#### 4.1.1. Charakterystyka kationowej pochodnej chitozanu

Wartość stopnia podstawienia chitozanu grupami glicydylotrimetyloamoniowymi wyznaczono w oparciu o przeprowadzone miareczkowanie konduktometryczne. Uzyskane wartości po podstawieniu do Równanie 4 pozwoliły obliczyć **stopień podstawienia CChit grupami GTMAC równy 63%**.

#### 4.1.2. Charakterystyka kationowej pochodnej chitozanu modyfikowanej hydrofobowo

Analiza otrzymanego związku została przeprowadzona w oparciu o widmo otrzymane spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego. Pojawiający się na widmie (Rysunek 32) sygnał w rejonie  $\delta=1,20-1,30$  ppm pochodzi od wodorów grupy  $-CH_2$  obecnych w łańcuchach dodecyłowych, natomiast sygnał dla  $\delta=0,80-0,90$  ppm odpowiada wodorom w grupie  $-CH_3$  stanowiących zakończenie tych łańcuchów. Sygnały te potwierdzają przyłączenie się hydrofobowych grup *n*-dodecyłowych do łańcucha pochodnej chitozanu. Sygnał przy  $\delta=4,79$  ppm pochodzi od rozpuszczalnika  $D_2O$ , w którym związek został rozpuszczony na potrzeby pomiaru. Natomiast intensywny sygnał dla  $\delta=3,22$  ppm należy do

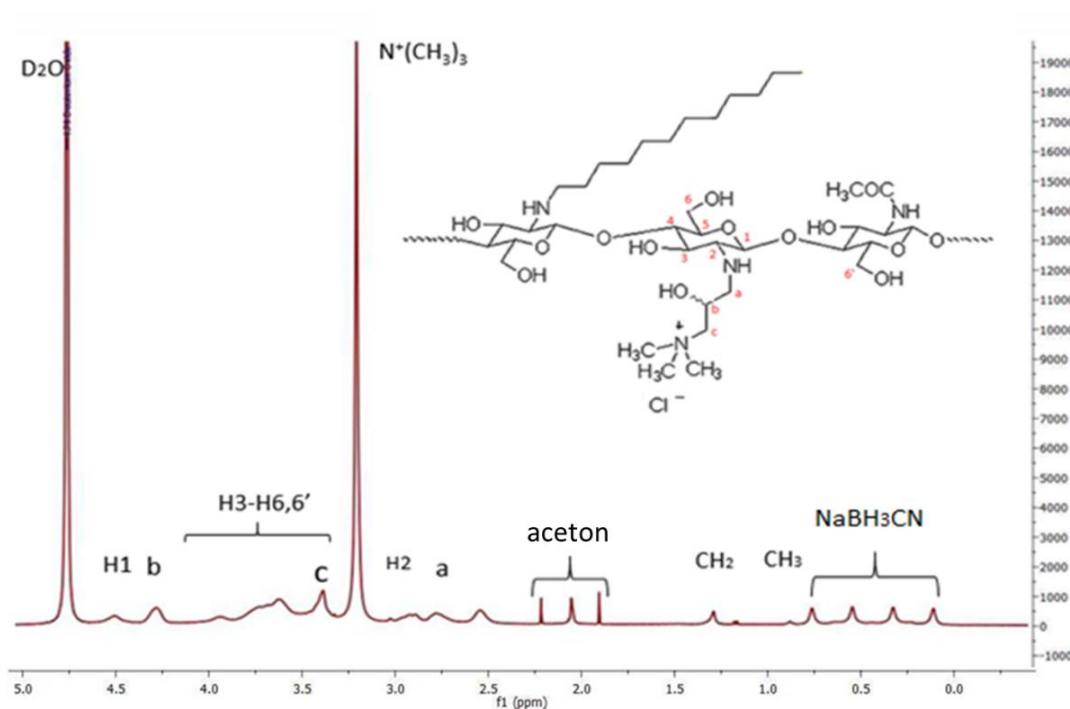
wodorów grupy  $-CH_3$  przyłączonej wcześniej kationowej czwartorzędowej grupy aminowej. Sygnał przy  $\delta=2,80-2,95$  ppm pochodzi od wodorów glukozaminy, podobnie jak  $\delta=3,40-4,55$  ppm pochodzącego od protonów przyłączonych do pierścienia w reszcie glikozylowej. Pojawiający się przy  $\delta=2,00$  ppm sygnał należy do pozostałości rozpuszczalnika po kationowej modyfikacji chitozanu, natomiast w rejonie  $\delta=0,00-0,80$  ppm widoczna jest pozostałość po wykorzystanym w czasie syntezy reduktorze  $NaBH_3CN$ .<sup>130</sup>

Na podstawie stosunku intensywności sygnałów pochodzących od pięciu wodorów w pierścieniu glukozaminy, dołączonego łańcucha alkilowego oraz zależności: <sup>124</sup>

$$DS = \frac{\frac{I_{CH_2}}{10}}{\frac{I_{H_3-H_6}}{5}} \cdot 100\%$$

Równanie 5

obliczono **stopień podstawienia chitozanu CChitC12 grupami n-dodecyłowymi równy 3%.**

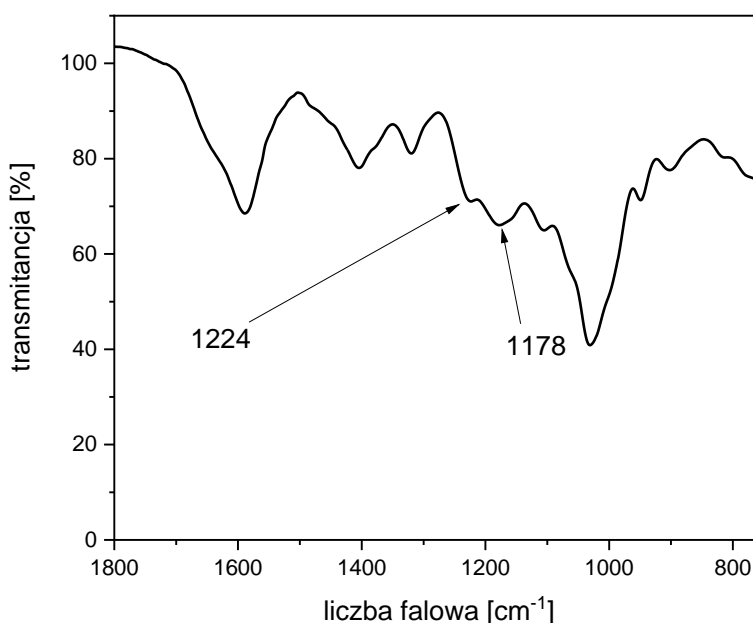


**Rysunek 32** Widmo <sup>1</sup>HNMR chitozanu modyfikowanego kationowo GTMAC oraz hydrofobowymi łańcuchami n-dodecyłowymi.

### 4.1.3. Charakterystyka anionowej pochodnej chitozanu

Stopień podstawienia anionową grupą sulfonową TMST wyznaczono na podstawie wyników pochodzących z analizy elementarnej. Przeprowadzone badanie wskazało, że zawartość azotu stanowiła 4,64%, węgla 29,36%, wodoru 5,29% i siarki 5,23% badanego materiału. Otrzymane zawartości procentowe siarki i azotu podzielono przez ich masy molowe, a następnie obliczono stosunek procentowy siarki do azotu otrzymując tym samym wartość **stopnia podstawienia chitozanu AChit równą 53%**.

Przeprowadzona modyfikacja została również potwierdzona pomiarem przy wykorzystaniu fourierowskiej spektroskopii w podczerwieni. Otrzymane widmo (Rysunek 33) poprzez obecność pasm dla  $1224\text{ cm}^{-1}$  oraz  $1178\text{ cm}^{-1}$  pochodzących od wiązania  $\text{O}=\text{S}=\text{O}$  występującego w grupie sulfonowej potwierdza **poprawne przyłączenie się grupy anionowej**.<sup>124</sup>



**Rysunek 33** Widmo FT-IR pochodnej chitozanu AChit z naszczepionymi grupami sulfonowymi.

#### 4.1.4. Podsumowanie

Przeprowadzone zostały modyfikacje pochodnej chitozanu prowadzące do otrzymania związków niezbędnych do utworzenia struktur w postaci kapsuł opartych na ciekłych olejowych rdzeniach. Kationowa modyfikacja chitozanu miała na celu zapewnienie kapsułom dodatniego ładunku powierzchniowego oraz umożliwienie naniesienia, na ich zewnętrzną powłokę, dodatkowej przeciwnie naładowanej warstwy polimeru. Natomiast dalsza, hydrofobowa modyfikacja otrzymanej wcześniej kationowej pochodnej chitozanu warunkowała stabilizację olejowych rdzeni kapsuł, wewnątrz których możliwa była enkapsulacja nanocząstek magnetycznych oraz związków hydrofobowych. Produkt końcowy przeprowadzonych syntez stanowił związek kationowy, którego łańcuch główny wykazuje właściwości hydrofilowe, natomiast grupy boczne są hydrofobowe. Synteza chitozanu o właściwościach anionowych była niezbędna do otrzymania produktu, który dzięki swojemu ładunkowi umożliwiało nałożenie dodatkowej warstwy na dodatniej pochodnej chitozanu stabilizującej rdzeń kapsuły, nadając jej tym samym ujemny ładunek powierzchniowy. Zastosowanie tego rozwiązania, metody nakładania przeciwnie naładowanych warstw, możliwe było dzięki obecności ładunku dodatniego w strukturze związku wykorzystywanego do stabilizacji olejowych rdzeni kapsuł.

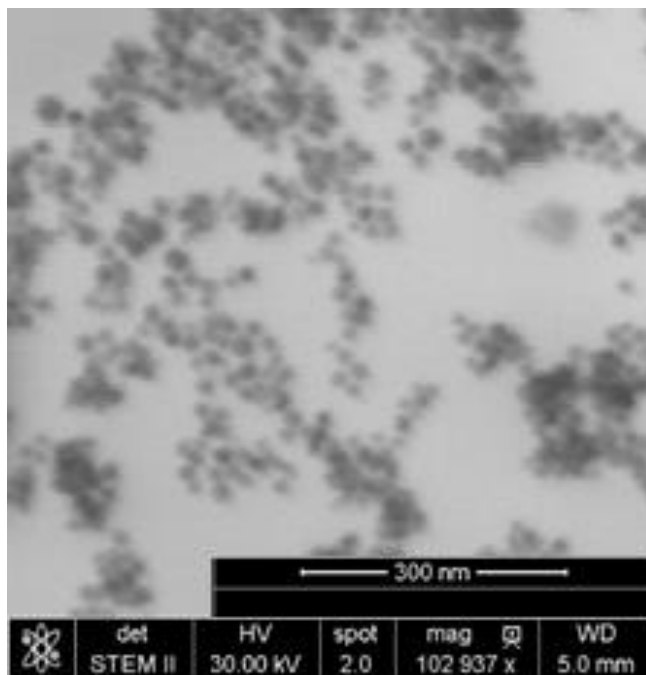
Charakterystyka otrzymanych związków wskazuje na ich silny jonowy charakter umożliwiający zastosowanie techniki LbL, co pozwoliło na kontrolę ładunku powierzchniowego całego nośnika. Odpowiedni stopień podstawienia zarówno grupami hydrofobowymi, jak i grupami jonowym determinuje nie tylko rozmiar i stabilność nośnika, ale również jego zachowanie w warunkach *in vivo*.

## 4.2. Nanocząstki magnetyczne

Nanocząstki magnetyczne umieszczane w strukturze kapsuły mają za zadanie nadanie właściwości magnetycznych całemu nośnikowi. Otrzymane zostały na drodze dwuetapowej syntezy polegającej na termicznej dekompozycji zsyntezowanego wcześniej organometalicznego prekursora w obecności kwasu oleinowego. Zastosowanie tej metody pozwala na otrzymanie nanocząstek o wąskim rozkładzie rozmiaru, składających się z tlenków żelaza i wykazujących silne właściwości magnetyczne. Obecność hydrofobowej substancji podczas prowadzenia syntezy ma zapewnić odpowiednie pokrycie struktur, umożliwiające ich umieszczenie w olejowym rdzeniu kapsuły.

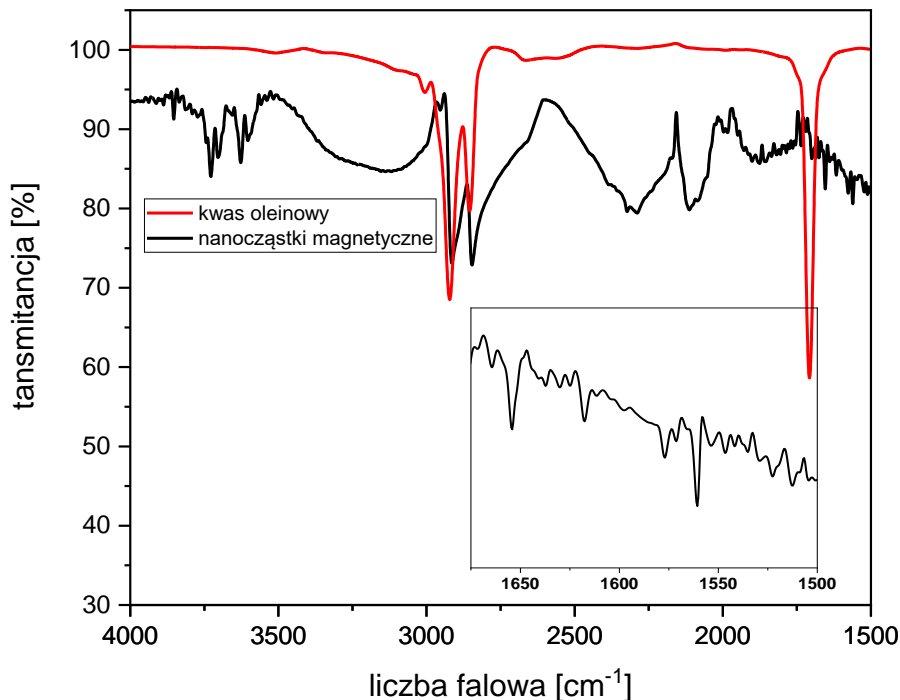
### 4.2.1. Charakterystyka otrzymanych nanocząstek magnetycznych

Obrazowanie przeprowadzone skaningową elektronową mikroskopią transmisyjną (Rysunek 34) pokazało **sferyczny kształt** pojedynczych nanocząstek, a szczegółowa analiza otrzymanego zdjęcia ukazała ich **średni rozmiar równy 15 nm**, przy wąskim rozkładzie tej wielkości.



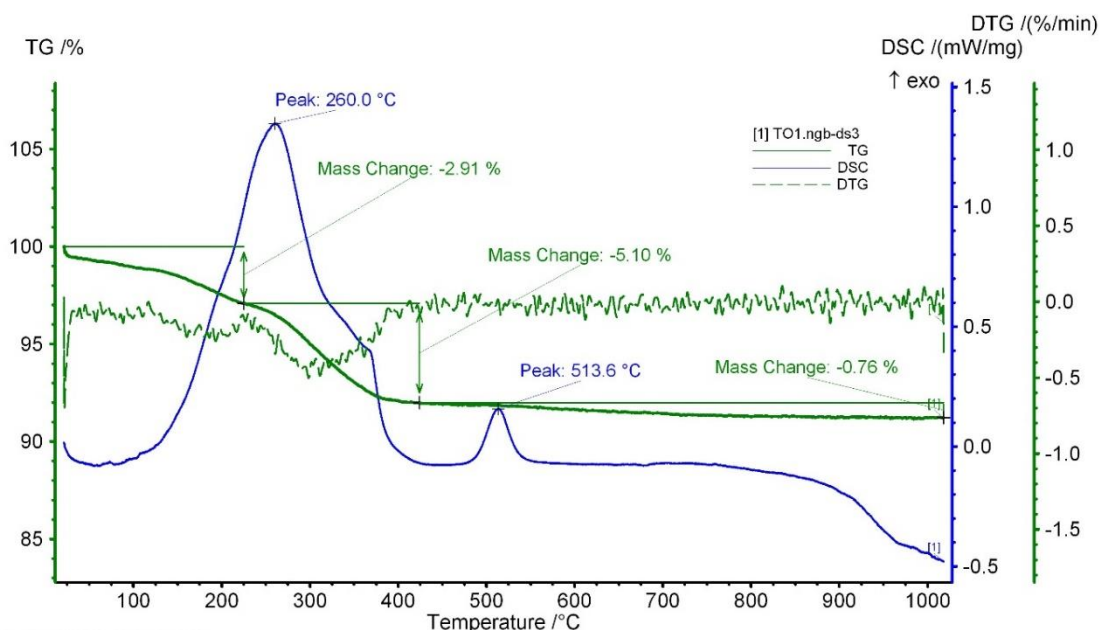
**Rysunek 34** Zdjęcie STEM nanocząstek otrzymanych metodą termicznej dekompozycji organometalicznego prekursora.

Dobór metody syntezy nanocząstek magnetycznych był ściśle uwarunkowany możliwością otrzymania struktur posiadających odpowiednie pokrycie umożliwiające umieszczenie ich w hydrofobowym wnętrzu kapsuły. W celu określenia poprawnego odłożenia się warstwy kwasu oleinowego na powierzchni nanocząstek wykonano pomiary spektroskopią FT-IR oraz analizę termiczną TGA-DSC. Otrzymane widmo nanocząstek porównano z widmem pochodzącym z pomiaru kwasu oleinowego wykorzystanego podczas syntezy (Rysunek 35). Dla kwasu oleinowego sygnał pojawiający się przy  $3000\text{ cm}^{-1}$  to drgania rozciągające wiązania C-H w grupie  $\text{-C=C-H}$ , pasma pojawiające się przy  $2922\text{ cm}^{-1}$  oraz  $2853\text{ cm}^{-1}$  odpowiadają asymetrycznym i symetrycznym drganiom rozciągającym grupy  $\text{-CH}_2$ , natomiast intensywne pasmo przy  $1710\text{ cm}^{-1}$  można przypisać drganiom w wiązaniu  $\text{C=O}$ . W widmie zmierzonym dla nanocząstek magnetycznych zaobserwować można zanik pasma pochodzącego od wiązania  $\text{C=O}$ , natomiast pojawiają się dwa nowe wiązania dla fali liczby falowej równej  $1560\text{ cm}^{-1}$  i  $1645\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające asymetrycznym i symetrycznym drganiom rozciągającym w grupie  $\text{-COO}^-$ . Różnica w odległości położenia tych pasm wskazuje na **połączenie typu chelatowego pomiędzy grupą  $\text{-COO}^-$  pochodzącą od kwasu oleinowego, a jonami żelaza.**<sup>131,132,133</sup>



**Rysunek 35** Widmo FT-IR nanocząstek magnetycznych i kwasu oleinowego; wstawka obrazuje pojawienie się nowych pasm potwierdzającym powstanie połączenia typu chelatowego między nanocząstkami, a kwasem oleinowym.

Krzywa otrzymana z analizy termicznej TGA-DSC (Rysunek 36) wskazuje na ubytek masy próbki równy **8%** występujący w zakresie do 400°C, z towarzyszącym egzotermicznym maksimum, które odpowiada za proces desorpcji kwasu oleinowego.



**Rysunek 36** Krzywa TGA-DSC dla nanocząstek magnetycznych.

Badanie struktury krystalicznej otrzymanych nanocząstek przeprowadzono w oparciu o pomiar rentgenowską dyfraktometrią proszkową. Otrzymany dyfraktogram porównano z dyfraktogramem mikrokrystalicznego magnetytu i wustytu (Rysunek 37). Linie przypisane do fazy magnetytu (np. dla  $2\theta \approx 30^\circ$ ) nie wykazują przesunięcia względem dyfraktogramu mikrokrystalicznego magnetytu. Natomiast w przypadku wustytu, zaobserwować można przesunięcie maksimum w kierunku wyższych kątów względem linii wzorcowych. Przesunięcie to sugeruje zmniejszenie stałej sieci krystalicznej, przypuszczalnie na skutek występujących w strukturze nanocząstki naprężeń ściskających pojawiających się w strukturze typu rdzeń-powłoka. Biorąc pod uwagę fakt, że wustyt ( $\text{FeO}$ ) w warunkach atmosferycznych i nawet w lekko podwyższonej temperaturze ulega szybkiemu utlenianiu do fazy magnetytu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemitu ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) i hematytu ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) lub dwu-etapowemu procesowi dysproporcjonowania prowadzącemu do otrzymania hematytu i magnetytu, można wnioskować, że **rdzeń nanocząstek stanowi wustyt, natomiast powłoka tworzona jest z fazy magnetytowej lub**

**maghemitowej.** Występujące naprężenia w strukturze nanocząstki mogą prowadzić do wzrostu anizotropii magnetycznej.<sup>134,135,136,137,138</sup>

Do wyznaczenia średniego rozmiaru krystalitów ( $d$ ) wykorzystano przedstawione poniżej równanie Scherrera:<sup>139</sup>

$$d \cong \frac{K\lambda}{(W(2\theta) \cdot \cos(\theta))} \quad \text{Równanie 6}$$

gdzie:

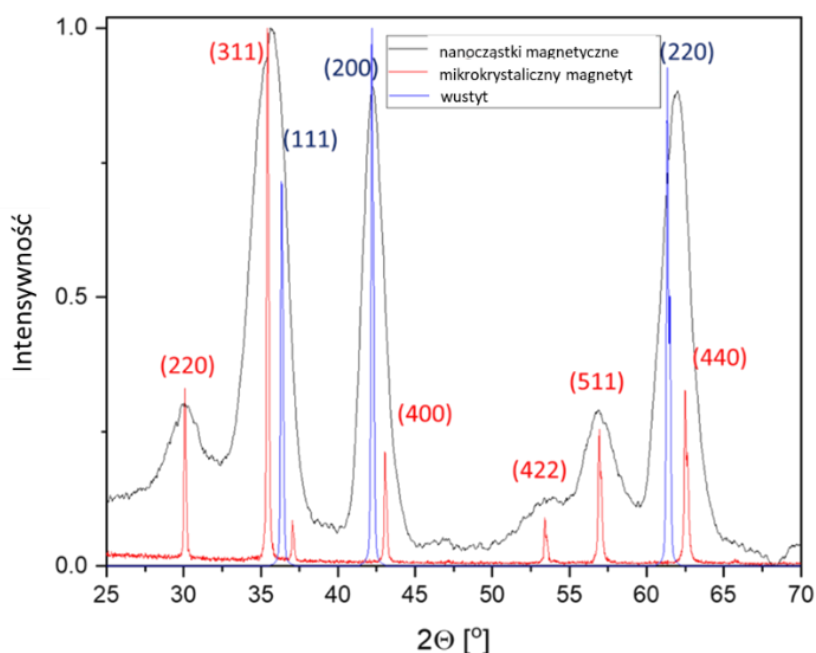
$K$  – współczynnik kształtu (przyjęto  $K=1$ ),

$\lambda$  – długość fali promieniowania rentgenowskiego ( $\text{CuK}\alpha=0,154 \text{ nm}$ ),

$W(2\theta)$  – szerokość linii w połowie maksymalnej intensywności,

$\theta$  – kąt Bragga.

Na podstawie równania obliczono, że średni rozmiar krystalitów fazy magnetytowej/maghemitowej wynosi **4,4 nm**, natomiast fazy wustytowej **6 nm**. Uwzględniając budowę nanocząstki (rdzeń-powłoka) oraz wykorzystując wyznaczone rozmiary krystalitów można określić średni rozmiar nanocząstek magnetycznych równy około **14,8 nm**. Przeprowadzone dopasowanie faz do otrzymanego dyfraktogramu wskazało na **22%** udziału fazy wustytu i **77%** udziału żelaza magnetytu/maghemitu.

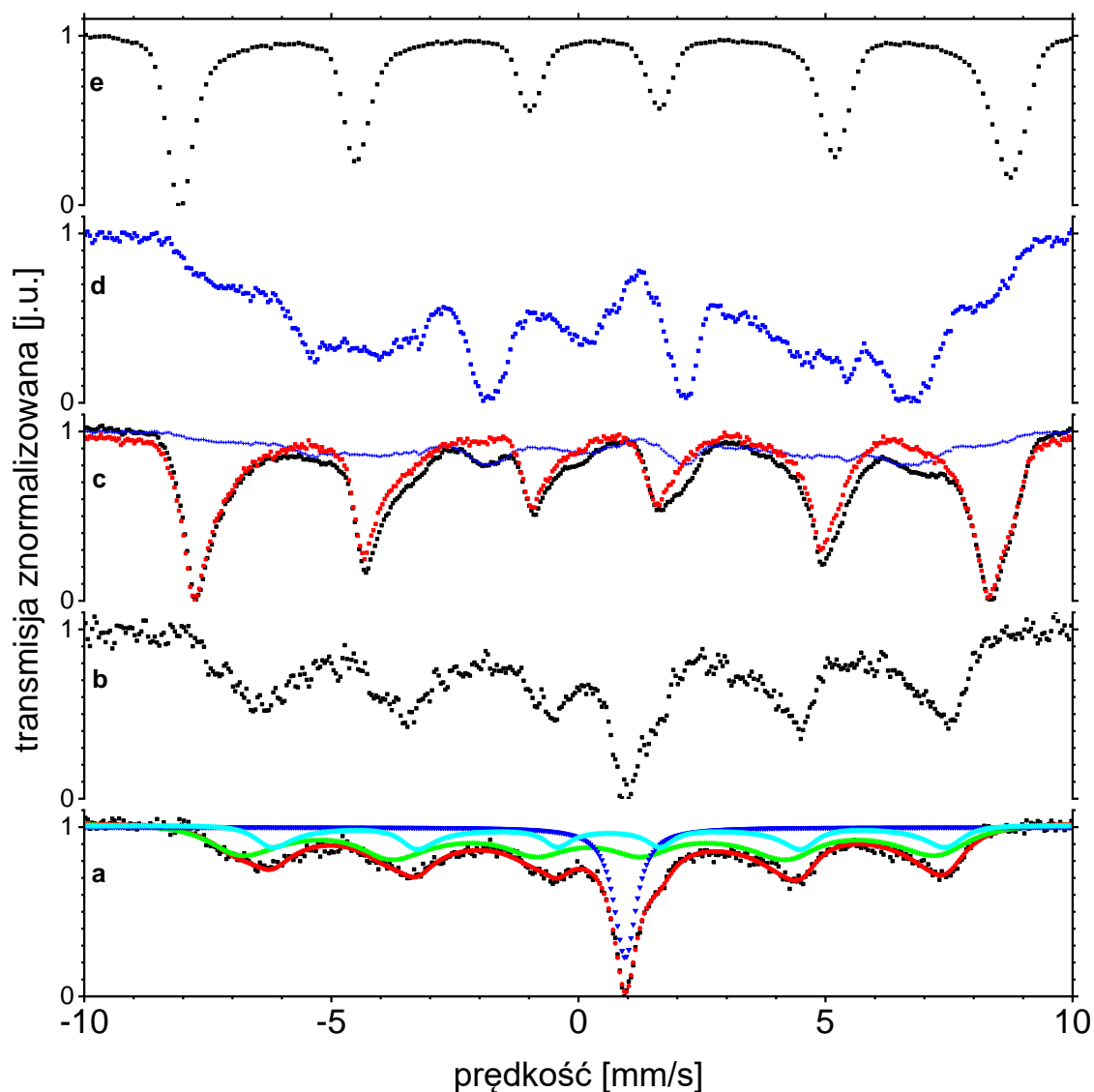


**Rysunek 37** Dyfraktogram rentgenowski (XRD) nanocząstek magnetycznych, mikrokryształicznego magnetytu i wustytu.



Przeprowadzone zostały również badania nanocząstek magnetycznych za pomocą spektroskopii Mössbauera. Pomiary wykonano w różnych warunkach temperaturowych (temperatura pokojowa, temperatura ciekłego azotu i temperatura ciekłego helu). Otrzymane widma zostały zestawione z widmami mikrokrystalicznego wustytu i mikrokrystalicznego maghemitu (Rysunek 38). Zmierzone w temperaturze pokojowej widmo poprzez obecność poszerzonego sekstetu wskazuje na obecność fazy uporządkowanej magnetycznie, natomiast singlet o przesunięciu izomerycznym równym ok 1 mm/s sugeruje występowanie drugiej fazy - paramagnetycznej. Przedstawione widmo to widmo relaksacyjne, wskazuje na to silniejsze poszerzenie do wewnętrznej strony i mniejsze amplitudy zewnętrznych linii niż teoretyczne 3:2:1 do 1:2:3, co oznacza że **w temperaturze pokojowej nanocząstki wykazują właściwości superparamagnetyczne**. Widmo relaksacyjne powstaje w sytuacji, gdy częstotliwość fluktuacji wektora magnetyzacji nanocząstek między osiami łatwego magnesowania jest większa niż odwrotność czasu życia poziomu mossbauerowskiego, czyli 7 MHz ( $^{57}\text{Fe}$ ). Przeprowadzone dopasowanie otrzymanego widma zgodnie z modelem Blume'a i Tjon'a<sup>140</sup> pozwoliło na otrzymanie parametrów zaprezentowanych w Tabeli 4:. Wartość wyznaczonego przesunięcia izomerycznego wskazuje, że fazę reprezentowaną przez singlet stanowi **wustyt**. Natomiast w przypadku widma zmierzonego w temperaturze ciekłego azotu widoczny jest brak singletu pochodzącego od fazy paramagnetycznej oraz pojawienie się dodatkowych linii składowej rozszczepionej magnetycznie, świadczącej o obecności dodatkowej fazy uporządkowanej magnetycznie. Obserwowane linie są znacznie węższe, a stosunki intensywności są bliższe teoretycznym 3:2:1 do 1:2:3, co oznacza brak możliwości pokonania bariery energetycznej przez wektor magnetyzacji - nanocząstki nie wykazują właściwości superparamagnetycznych w tej temperaturze. Po odjęciu od otrzymanego widma 22% udziału pochodzącego od fazy wustytu stwierdzono, że **drugą obecną w badanej próbce fazą tlenku żelaza stanowi maghemit** – utleniona forma magnetytu.

Wyznaczona na podstawie widma relaksacyjnego, częstotliwość fluktuacji równa 52 MHz wskazuje na stosunkowo wysoką temperaturę blokowania występującą w nanocząstkach. Natomiast, wysoka wartość współczynnika asymetrii ( $\rho=0,95$ ), który odpowiada względnemu czasowi przebywania momentu magnetycznego nanocząstki wzdłuż kierunku łatwego magnesowania wskazuje na wysoką anizotropię magnetokrystaliczną otrzymanych układów.<sup>26,141,142,143,144</sup>



**Rysunek 38** Widmo moessbauerowskie nanocząstek magnetycznych (czarne punkty odpowiadają pomiaru punktom pomiarowym): a) pomiar wykonany w temperaturze pokojowej z dopasowanym sekstetem pochodzącym od wustytu (niebieska linia), sekstetami pochodzącymi od maghemitu (błękitna i zielona linia) oraz sumaryczne dopasowanie (linia czerwona); b) pomiar w temperaturze pokojowej nanocząstek magnetycznych po 8 miesiącach od ich zsyntezowania; c) pomiar w temperaturze ciekłego azotu z uwzględnieniem udziału wustytu (niebieskie punkty) i bez uwzględnienia fazy wustytu (czerwone punkty); d) widmo mikrokrystalicznego wustytu zmierzone w temperaturze ciekłego azotu; e) widmo mikrokrystalicznego maghemitu zmierzone w temperaturze ciekłego azotu.

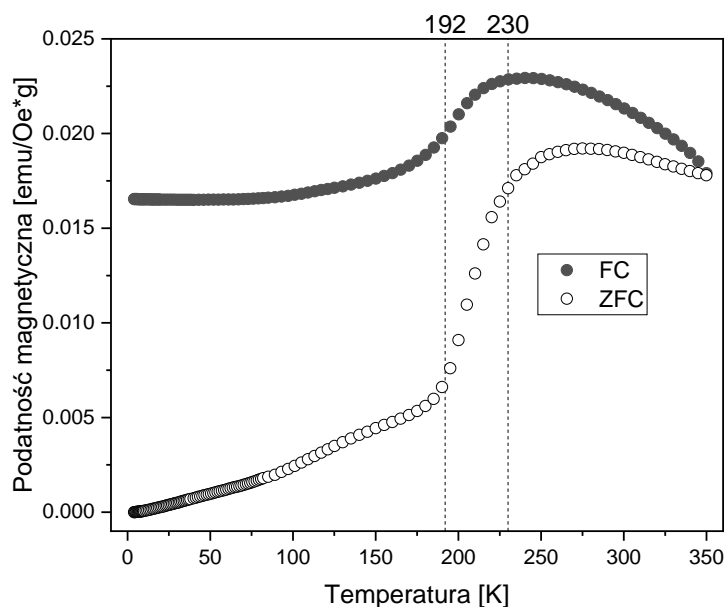
**Tabela 4** Parametry otrzymane z dopasowania widm moessbauerowskich nanocząstek magnetycznych oraz zestawienie danych literaturowych dla maghemitu i wustytu.

Temperatura pomiaru	Przesunięcie izomeryczne* [mm/s]	Pole nadsubtelne [T]	$\chi^2$	Częstotliwość [MHz]	$\rho$	Intensywność [%]
<b>Nanocząstki magnetyczne</b>						
Temperatura pokojowa (293 K)	0,21(1) 0,73(1) 1,05(1)	44,7(2) 43,2(2) 0	1,1	52(4)	0,95(1)	55(3) 23(1) 22(2)
Temperatura ciekłego azotu (77 K)	0,30(3) 0,84(2) 0,99(2)	49,5(1) 48,6(3) -	0,22	przyjęta statyczna	-	61(1) 17(3) 22(2)
<b>Maghemit<sup>134</sup></b>						
Temperatura pokojowa (293 K)	0,23 0,35	50,0 50,0				
Temperatura ciekłego helu (4.2 K)	0,40 0,48	52,0 53,0				
<b>Wusty<sup>134</sup></b>						
Temperatura pokojowa (293 K)	0,95 0,90					

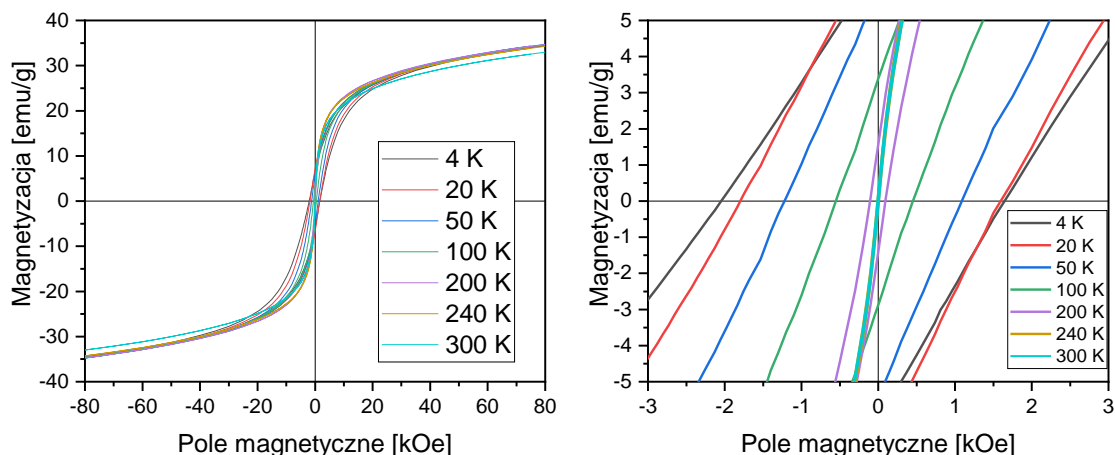
\*względem  $\alpha$ -Fe

Nanocząstki magnetyczne zostały zbadane także przy wykorzystaniu magnetometrii z wibrującą próbką. Przeprowadzono pomiary, których wyniki są przedstawione w postaci temperaturowej zależności podatności magnetycznej zmierzonej w niewielkim stałym polu o natężeniu równym 100 Oe w postaci krzywych ZFC i FC (Rysunek 39) oraz krzywych magnesowania w funkcji przyłożonego pola magnetycznego dla temperatur w zakresie od 4 do 300 K (Rysunek 40). Na podstawie miejsca w którym wartość podatności magnetycznej znacząco wzrasta zidentyfikowano temperaturę **230 K** jako temperaturę zaniku uporządkowania antyferromagnetycznego wustytu i przejście do stanu paramagnetycznego, czyli **temperaturę Neela**. Tablicowa wartość tej temperatury dla wustytu to około 192 K, jednakże obecność otoczek maghemitowych

sprzęgających się magnetycznie z wustytowym rdzeniem może powodować jej podwyższenie. Maksimum krzywej ZFC pozwala na wyznaczenie **średniej temperatury blokowania**, czyli temperatury powyżej której nanocząstki magnetyczne wykazują właściwości superparamagnetyczne- wyznaczona na podstawie zmierzonej zależności jej wartość równa jest **275 K**. Kształt krzywych magnesowania powyżej wyznaczonej temperatury Neela wskazuje na brak histerezy, co potwierdza **superparamagnetyczny** stan nanocząstek. Podczas pomiaru, magnetyzacja nie osiągnęła nasycenia nawet przy polu o indukcji 8 Tesli, co jest związane z obecnością wustytu w strukturze nanocząstek. Ponadto obecność obojętnego magnetycznie kwasu oleinowego na powierzchni nanocząstki prowadzi do efektów powierzchniowych skutkujących obniżeniem magnetyzacji oraz wzmocnieniem anizotropii magnetycznej.<sup>136, 137,145,146</sup>



**Rysunek 39** Podatność magnetyczna nanocząstek magnetycznych w funkcji temperatury mierzona w polu 100 Oe. Zaznaczona na wykresie wartość 192 K to literaturowa wartość temperatury Neela wustytu, natomiast temperatura 230 K odpowiada rzeczywistej temperaturze tego przejścia dla badanych układów.



**Rysunek 40** Krzywe magnesowania nanocząstek magnetycznych w funkcji przyłożonego pola mierzone w zakresie temperatur 4-300 K.

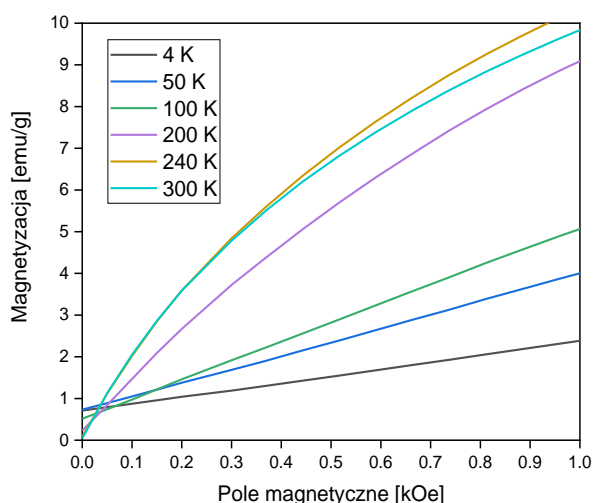
Wyznaczone wartości pól koercji oraz remanencji zostały przedstawione w Tabeli 5:. Poniżej temperatury Neela nanocząstki wykazują poziome przesunięcie pętli histerezy będące konsekwencją sprzężenia wymiennego wstępującego na granicy antyferromagnetycznego wustytowego rdzenia i ferrimagnetycznej maghemitowej otoczki, powodującego pojawienie się **magnetycznej anizotropii jednokierunkowej**. Efekt ten, określany jako **polaryzacja wymienna** (*ang. exchange bias*), spowodowany jest obecnością fazy antyferromagnetycznej, która jest znacznie trudniejsza do przemagnesowania i zależy od wielkości rdzenia, grubości zewnętrznej otoczki i kształtu nanocząstki.<sup>136,137,139</sup>

**Tabela 5** Wartości pola koercji i remanencji wyznaczone z krzywych magnetizacji nanocząstek magnetycznych.

	4 K	20 K	50 K	100 K	200 K	240 K	300 K
<b>Pole koercji</b>	-2,05	-1,80	-1,22	-0,55	-0,11	-0,01	-0,00
<b>(+-) [kOe]</b>	1,64	1,59	1,08	0,45	0,09	0,01	0,00
<b>Remanencja</b>	6,4	7,1	5,7	3,1	1,5	0,2	0,0
<b>[emu/g cm<sup>3</sup>]</b>							

Krzywe pierwotnego magnesowania zmierzone w zakresie temperatur od 4 K do 300 K przedstawiono na Rysunku 41:. Uzyskane dane wskazują na znaczący wzrost magnetizacji przy niewielkich wartościach pola magnetycznego (krzywa wypukła) dla temperatur bezpośrednio poniżej temperatury blokady: 240 K i 200 K,

co sugeruje **mechanizm odwracania namagnesowania analogiczny do zarodkowania domen odwrotnych** (*ang.* nucleation), a nie przyszpilania ścian domenowych (*ang.* pinning), wskazując na niewielką ilość defektów występujących w materiale.<sup>147,148,149</sup> W temperaturze 100 K i niższych, krzywa pierwotnego magnesowania rośnie z polem wielokrotnie wolniej i prawie liniowo, co jest spowodowane oddziaływaniem otoczki maghemitowej z rdzeniem wustytowym, który w tych temperaturach jest uporządkowany antyferromagnetycznie.



**Rysunek 41** Krzywe pierwotnego magnesowania nanocząstek magnetycznych w funkcji przyłożonego pola mierzone w zakresie temperatur od 4-300 K.

#### 4.2.2. Podsumowanie

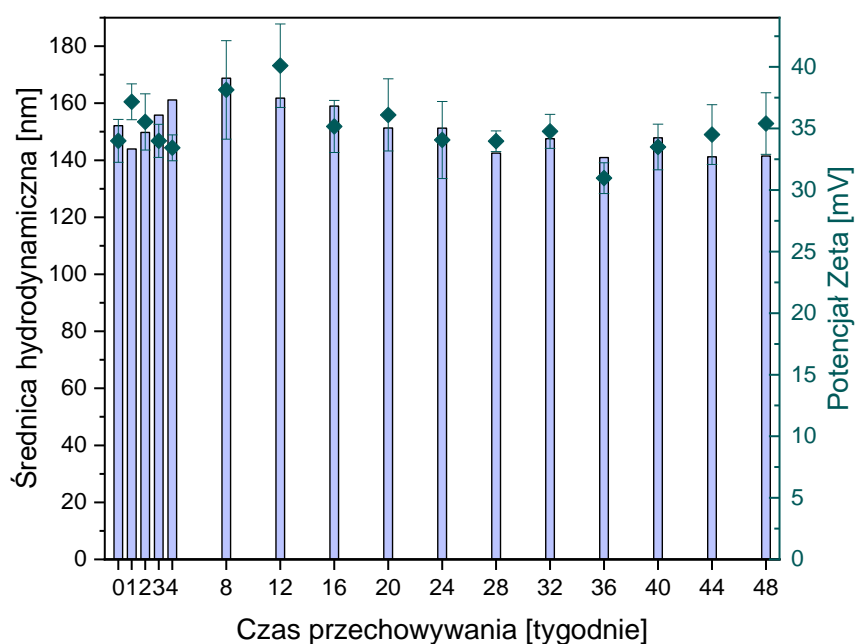
Otrzymane w wysokotemperaturowej syntezie nanocząstki magnetyczne wykazują odpowiedni rozmiar i hydrofobowe pokrycie umożliwiające umieszczenie ich wewnątrz olejowych rdzeni kapsuł. Zsyntezowane struktury zbudowane są z dwóch faz tlenku żelaza wykazując jednocześnie budowę typu rdzeń-otoczka, nanometryczny rozmiar i sferyczny kształt. Nanocząstki w temperaturze pokojowej posiadają właściwości superparamagnetyczne, które po umieszczeniu nanostruktur wewnątrz kapsuły będą umożliwiały (w obecności odpowiedniego zewnętrznego pola magnetycznego) sterowanie całym nośnikiem, naruszenie struktury nośnika lub jego całkowite zniszczenie, pozwalając na uwolnienie enkapsulowanej substancji.

### 4.3. Kapsuły

Biopolimerowe kapsuły oparte na ciekłych olejowych rdzeniach z enkapsulowanymi superparamagnetycznymi nanocząstkami tlenków żelaza oraz możliwość ich sterowania za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego stanowi główny przedmiot badań niniejszej pracy. Kapsuły otrzymane zostały w procesie emulsyfikacji, a do ich utworzenia wykorzystano przedstawione wcześniej hydrofobowo i kationowo modyfikowaną pochodną chitozanu, anionową pochodną chitozanu oraz nanocząstki magnetyczne otrzymane metodą termicznej dekompozycji organometalicznego prekursora.

#### 4.3.1. Charakterystyka otrzymanych kapsuł

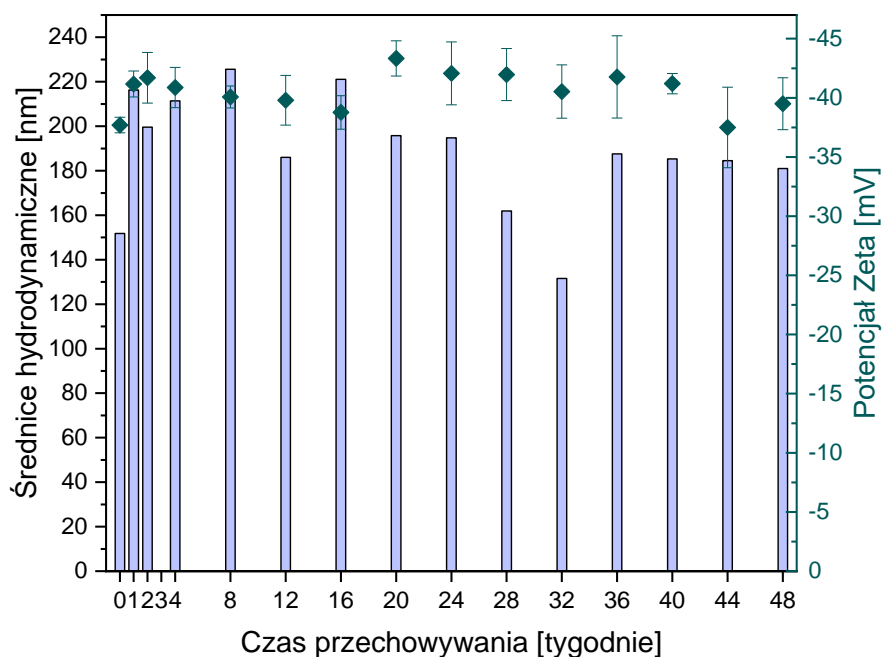
W celu określenia wielkości średnic hydrodynamicznych oraz wartości potencjału dzeta przeprowadzono pomiary przy wykorzystaniu techniki dynamicznego rozpraszania światła. Metoda DLS polega na pomiarze ruchów Browna poprzez analizę zmian natężenia światła wiązki laserowej wywołanych rozproszeniami, natomiast pomiar wartości potencjałów powierzchniowych oparty jest na określeniu ruchliwości cząstek w polu elektrycznym przy wykorzystaniu laserowego wibrometru. W celu dokładnego określenia stabilności kapsuł na przestrzeni czasu pomiary prowadzono przez 48 tygodni, w tym czasie badane próbki przechowywane były w temperaturze 4°C. Rozmiar średnic hydrodynamicznych oraz wartości potencjału dzeta kapsuł o dodatnim ładunku powierzchniowym utrzymywały się na jednakowym poziomie przez cały okres prowadzenia badań (Rysunek 42). **Średnia wartość średnic hydrodynamicznych** dla tych układów nie przekroczyła **170 nm**, nie była też mniejsza niż **140 nm**, przy współczynniku polidispersji mniejszym niż **0,3**, świadczącym o stosunkowo wąskim rozkładzie rozmiarów. Natomiast **wartość potencjału dzeta** przez cały okres pomiarów mieściła się w zakresie **30-40 mV**.



**Rysunek 42** Wartości średnic hydrodynamicznych oraz wartości potencjałów dzeta magnetycznych kapsuł kationowych mierzone na przestrzeni 48 tygodni.

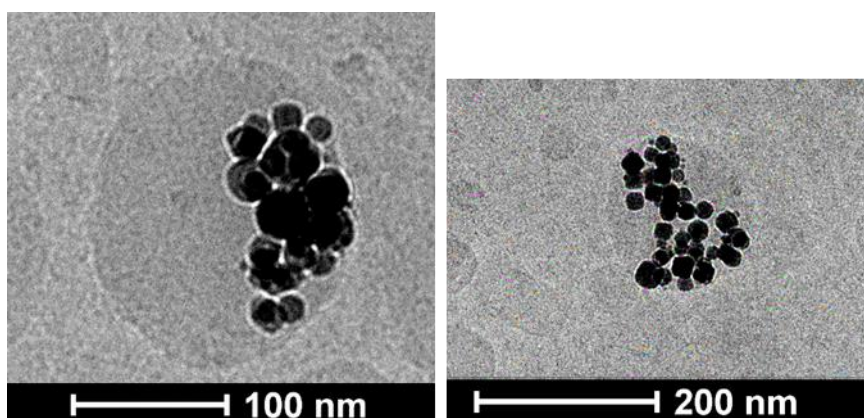
Analogiczne pomiary wykonano dla kapsuł kationowych pokrytych dodatkową powłoką anionowego chitozanu (Rysunek 43). Zmierzone **średnie wartości średnic hydrodynamicznych** mieściły się w przedziale **140 - 230 nm**, przy współczynniku polidispersji mniejszym niż **0,4**. Szerszy rozkład rozmiarów może być związany z tworzeniem się niewielkiej ilości agregatów lub też niejednorodnym pokryciem kapsuł przez AChit. Wartości **potencjału dzeta** oscylują w granicach **-35 do -45 mV**. Zarówno większe średnie wartości średnic hydrodynamicznych w porównaniu z kapsułami kationowymi, jak i ujemna wartość potencjałów dzeta świadczą o poprawnym odłożeniu się warstwy anionowego chitozanu na powierzchni badanych nośników.





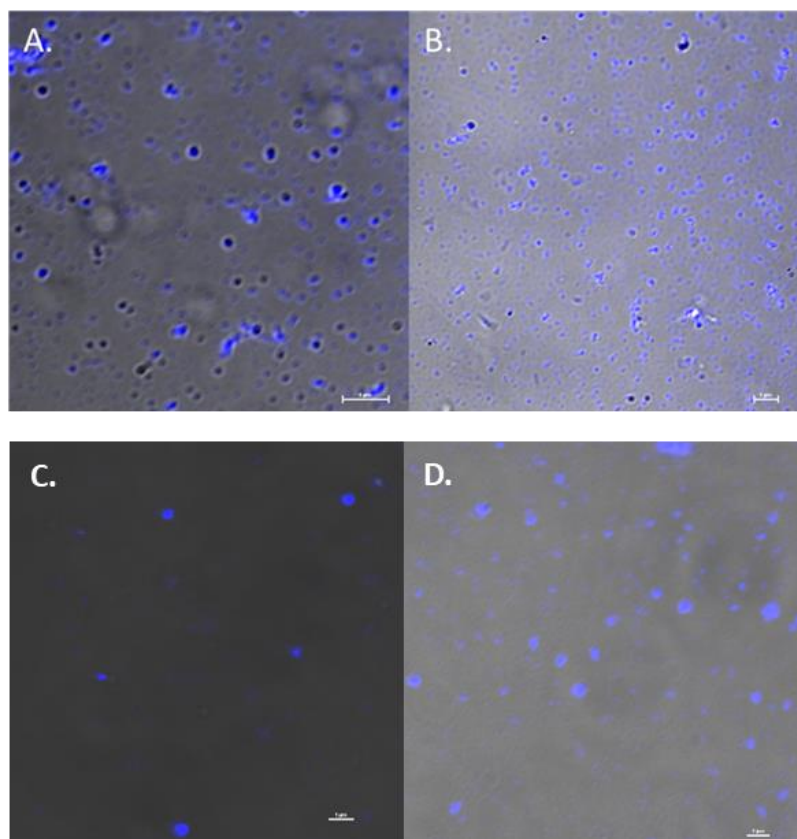
**Rysunek 43** Wartości średnic hydrodynamicznych oraz wartości potencjałów dzeta magnetycznych kapsuł anionowych mierzone na przestrzeni 48 tygodni.

Magnetyczne kapsuły kationowe zobrazowane zostały za pomocą kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (Rysunek 44). Otrzymane obrazy potwierdzają **obecność nanocząstek magnetycznych we wnętrzu nośnika**, zaobserwować można również jego sferyczny kształt o rozmiarze zgodnym z pomiarami DLS.



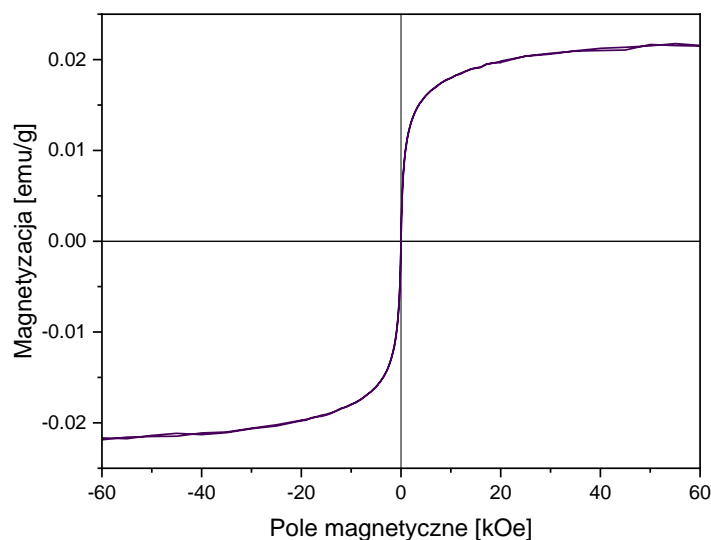
**Rysunek 44** Zdjęcie cryo-TEM magnetycznych kapsuł kationowych opartych na olejowych rdzeniach.

Przy wykorzystaniu mikroskopii konfokalnej przeprowadzono obrazowanie kapsuł zawierających dodatkowo w olejowym rdzeniu hydrofobowy barwnik fluorescencyjny w postaci perylenu (Rysunek 45). Na przedstawionych zdjęciach widoczne jest niebieskie światło fluorescencyjne znakowanych olejowych rdzeni kapsuł. Uzyskane zdjęcia potwierdzają **możliwość umieszczenia hydrofobowych substancji wewnątrz magnetycznych rdzeni kapsuł**, ponadto zdjęcia wykonane dwa tygodnie po przygotowaniu kapsuł potwierdzają możliwość dłuższej enkapsulacji substancji rozpuszczalnych w środowisku hydrofobowym.



**Rysunek 45** Zdjęcia magnetycznych kapsuł wykonane mikroskopem konfokalnym: A) kapsuły kationowe (zdjęcie wykonane w dniu zrobienia kapsuł); B) kapsuły kationowe (zdjęcie wykonane po 2 tygodniach przechowywania kapsuł); C) kapsuły anionowe (zdjęcie wykonane w dniu zrobienia kapsuł); D) kapsuły anionowe (zdjęcie wykonane po 2 tygodniach przechowywania kapsuł). Skala 1  $\mu\text{m}$ .

W celu określenia odpowiedzi magnetycznej badanych układów wykonano pomiar VSM. Ze względu na ograniczoną czułość pomiarową, zbadano odpowiednio bardziej stężoną zawiesinę kapsuł kationowych. Kształt otrzymanej krzywej potwierdza **magnetyczny charakter nośników** (Rysunek 46).



**Rysunek 46** Krzywa magnesowania magnetycznych kapsuł kationowych w funkcji przyłożonego pola w temperaturze 300 K.

#### 4.3.2. Podsumowanie

Przedstawione w pracy nośniki w postaci biopolimerowych kapsuł tworzą w oparciu o zjawisko samoorganizacji amfifilowego polimeru. Związek ten rozpuszczony w roztworze wodnym, w obecności dodatkowo zdyspergowanych kropli oleju, układa się na ich powierzchni hydrofilowym łańcuchem głównym, natomiast boczne grupy hydrofobowe wnikają do wnętrza kropli z wytworzeniem zamkniętych domen. Wewnątrz powstałych struktur możliwa była solubilizacja micelarna substancji trudno rozpuszczalnych w wodzie, natomiast kapsuły znajdowały się w wodnym roztworze chlorku sodu. Magnetyczne właściwości zostały nadane nośnikom poprzez dodatkowe umieszczenie, w olejowym rdzeniu kapsuł, nanocząstek magnetycznych posiadających hydrofobowe pokrycie. Ponadto obecność dodatniego ładunku w strukturze związku wykorzystanego do stabilizacji rdzeni umożliwiła, za pomocą techniki LbL, tworzenie kapsuł również o ujemnym ładunku powierzchniowym. Szczególną uwagę zwrócono na proces optymalizacji procesu tworzenia kapsuł, tak aby badane układy wykazywały dużą stabilność

i odpowiedni rozmiar przy jednocześnie możliwe jak największym stężeniu nanocząstek magnetycznych znajdujących się w olejowym rdzeniu.

Otrzymane zostały dwa rodzaje biopolimerowych kapsuł opartych na ciekłych olejowych rdzeniach zawierających nanocząstki magnetyczne. Pierwszy typ to powstałe na drodze procesu emulsyfikacji kapsuły posiadające dodatni ładunek powierzchniowy, natomiast drugi typ to kationowe kapsuły pokryte dodatkowo anionową powłoką zapewniającą ujemny ładunek całej strukturze. Badane nośniki wykazywały odpowiedni potencjał powierzchniowy, nanometryczny rozmiar oraz wysoką stabilność na przestrzeni 48 tygodni przechowywania. Ponadto potwierdzona została obecność nanocząstek magnetycznych we wnętrzu nośnika oraz możliwość enkapsulacji hydrofobowych związków w olejowym rdzeniu kapsuł. Utworzone struktury wykazywały właściwości magnetyczne, co stanowi fundamentalny aspekt w kontekście potencjału aplikacyjnego badanego nośnika.

#### **4.4. Badania komórkowe**

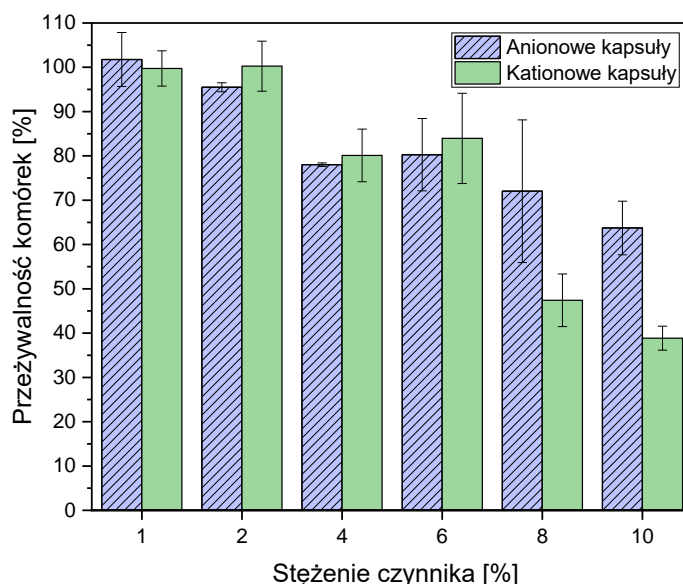
Ze względu na dedykowane biomedyczne zastosowanie biopolimerowych kapsuł magnetycznych przeprowadzone zostały badania określające cytotoksyczność nośnika względem komórek nowotworowych linii 4T1. Wykonano również eksperymenty mające na celu sprawdzenie możliwości sterowania układem za pomocą zewnętrznego stałego pola magnetycznego oraz zweryfikowanie zdolności do uwolnienia enkapsulowanej substancji w miejscu docelowym poprzez zastosowanie odpowiedniego zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego. Zastosowanie odpowiednich barwników fluorescencyjnych po przeprowadzonych eksperymentach umożliwiło, za pomocą obrazowania mikroskopem konfokalnym, określenie stanu komórek po zastosowaniu stałego i zmiennego pola magnetycznego w kontakcie z kapsułami magnetycznymi. Wykorzystane zostały dwa barwniki, Hoechst i jodek propidyny. Hoechst, dzięki zdolności do łączenia się z helisą DNA wybarwia jądra komórkowe, chromosomy lub mitochondria komórkowe. Barwnik ten ma zdolność przenikania przez uszkodzone oraz nieuszkodzone błony komórkowe, umożliwiając tym samym obrazowanie również żywych komórek. Natomiast jodek propidyny to barwnik, który również wykazuje zdolność do łączenia się z DNA komórki, jednak przenika on do jej wnętrza jedynie dzięki uszkodzeniom w błonie. Wykorzystanie tego faktu umożliwiło określenie komórek z naruszoną integralnością błony komórkowej, która prowadzi do śmierci komórki.

Otrzymane wyniki stanowią bardzo istotną informację w zakresie możliwości zastosowania kapsuł w charakterze nośnika zdolnego do celowanego i kontrolowanego magnetycznie transportu oraz uwolnienia enkapsulowanej substancji we wnętrzu komórki.

##### **4.4.1. Badania cytotoksyczności kapsuł względem komórek nowotworowych**

Wykonany został test przeżywalności komórek w kontakcie z czynnikiem w postaci anionowych lub kationowych kapsuł o różnych stężeniach. Przeprowadzony test XTT pozwala na spektrofotometryczne określenie aktywności metabolicznej mitochondriów komórkowych świadczącej o ich stanie. Przedstawione na wykresie uzyskane wyniki (Rysunek 47) jednoznacznie pokazują zależność między spadającym stężeniem czynnika, a idącym za tym wzrostem przeżywalności

komórek. Na podstawie uzyskanych wartości można wnioskować, że kapsuły posiadające ujemny ładunek powierzchniowy wykazują mniejszą toksyczność względem komórek. Jednakże zarówno w przypadku kapsuł anionowych jak i kationowych można przyjąć, że stężenie **czynnika równe 2% nie wywołuje negatywnej odpowiedzi w badanych komórkach.**

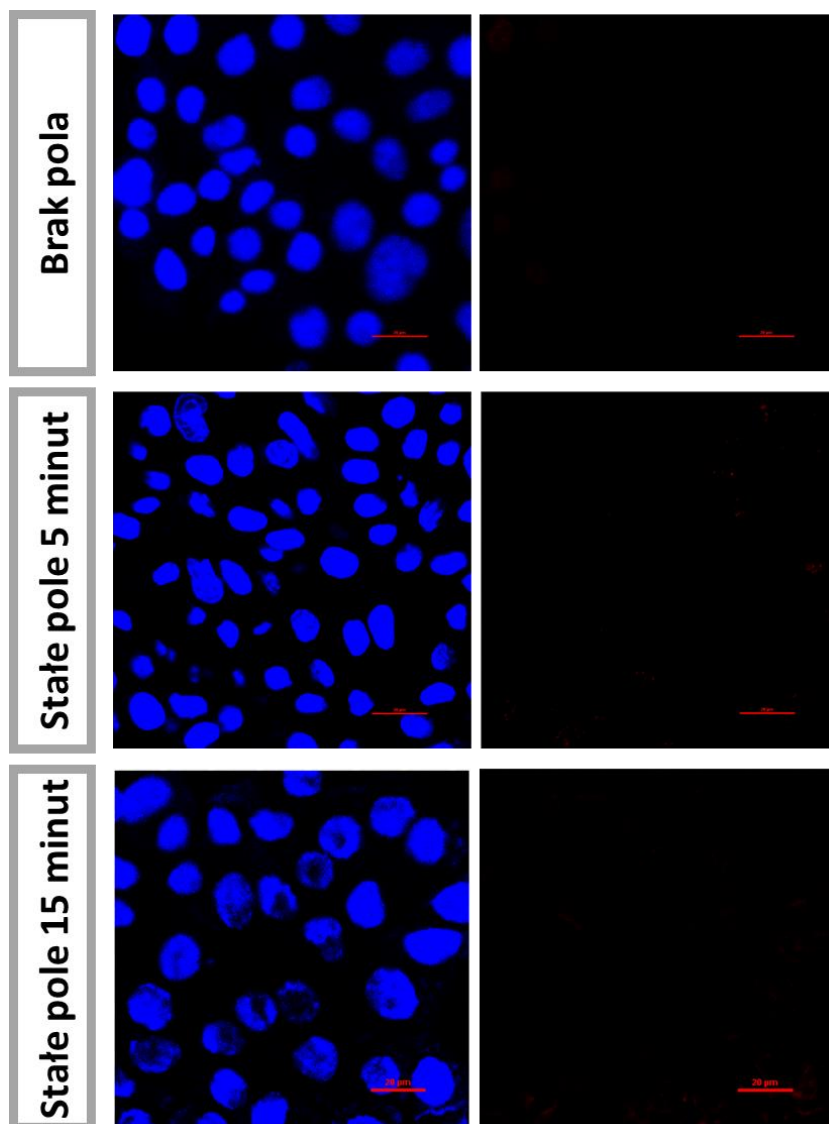


**Rysunek 47** Przeżywalność komórek linii 4T1 (określona na podstawie testu XTT) w kontakcie z kationowymi lub anionowymi kapsułami magnetycznymi o różnym stężeniu.

#### 4.4.2. Sterowanie kapsułami zewnętrznym stałym polem magnetycznym

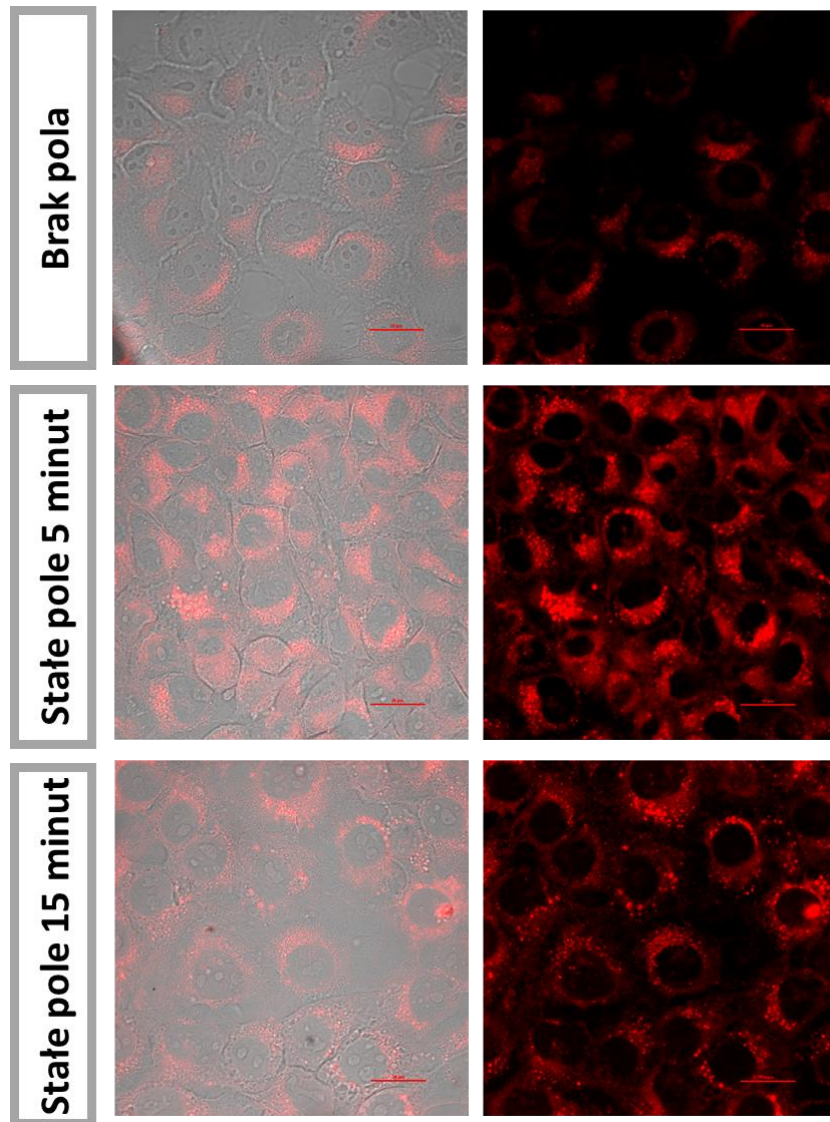
Przy wykorzystaniu stałego pola magnetycznego pochodzącego z magnesu neodymowego przeprowadzono eksperyment mający na celu sterowanie kapsułami do wnętrza komórek nowotworowych. Skuteczność wnikania do komórek weryfikowano za pomocą mikroskopu konfokalnego.

W pierwszym etapie badań sprawdzony został wpływ zewnętrznego stałego pola magnetycznego na komórki nowotworowe linii 4T1 bez obecności nośnika. Zebrane zdjęcia (Rysunek 48) definitywnie **wykluczają negatywny wpływ stałego pola magnetycznego**, świadczy o tym brak sygnału fluorescencyjnego komórek wybarwionych jodkiem propidyny, który przenika jedynie przez uszkodzone błony komórkowe.



**Rysunek 48** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) po wyjęciu z inkubatora oraz poddanych 5 i 15 minutowemu działaniu stałego pola magnetycznego. Skala: 20  $\mu\text{m}$ .

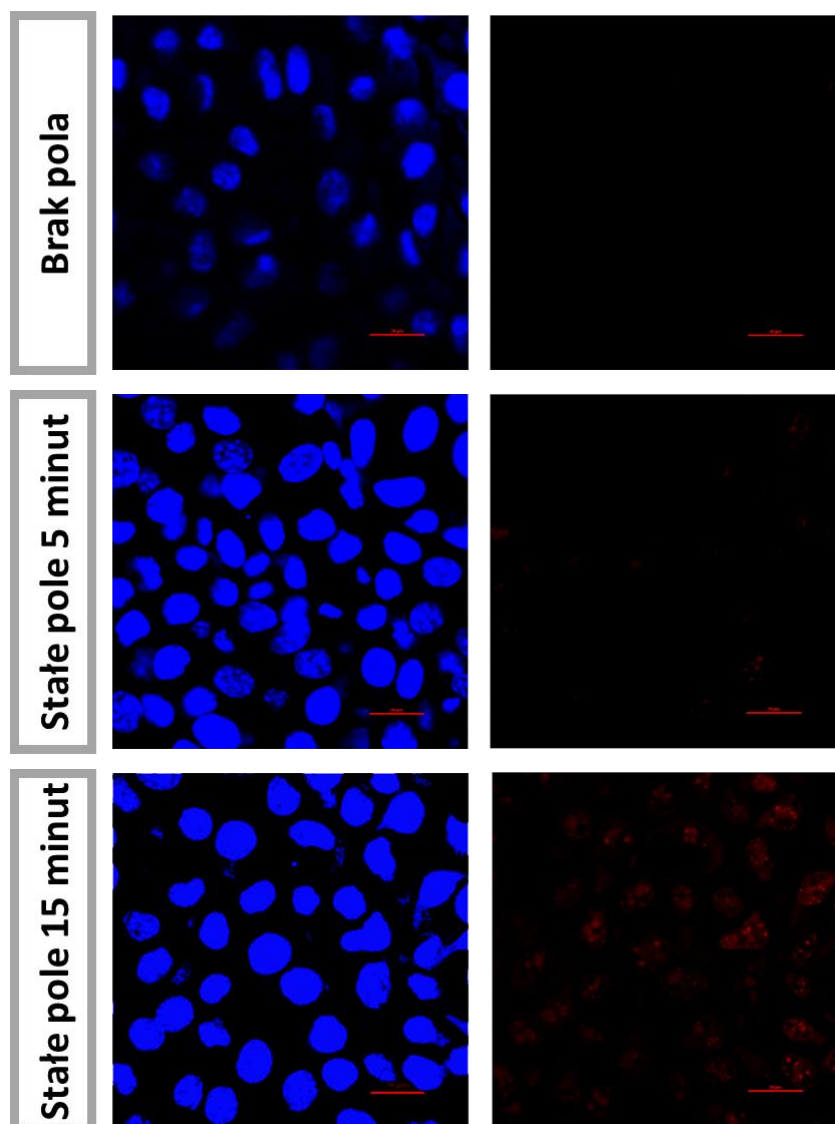
Następnie przeprowadzono badania weryfikujące możliwość sterowania kationowymi kapsułami za pomocą zewnętrznego stałego pola magnetycznego do wnętrza komórek nowotworowych. Przedstawione zdjęcia (Rysunek 49) wskazują na **niewielką tendencję do samoistnego wnikania kapsuł kationowych**, natomiast **zastosowanie zewnętrznego stałego pola magnetycznego zwiększa efektywność badanego zjawiska**, a przede wszystkim przyczynia się do nagromadzenia kapsuł w okolicy komórek nowotworowych.



**Rysunek 49** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek podanych eksperymentowi wprowadzenia znakowanych fluorescencyjnie, magnetycznych kapsuł kationowych za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego. Kolumna lewa: światło przechodzące i filtr TRITC, kolumna prawa: filtr TRITC. Skala: 20  $\mu\text{m}$ .

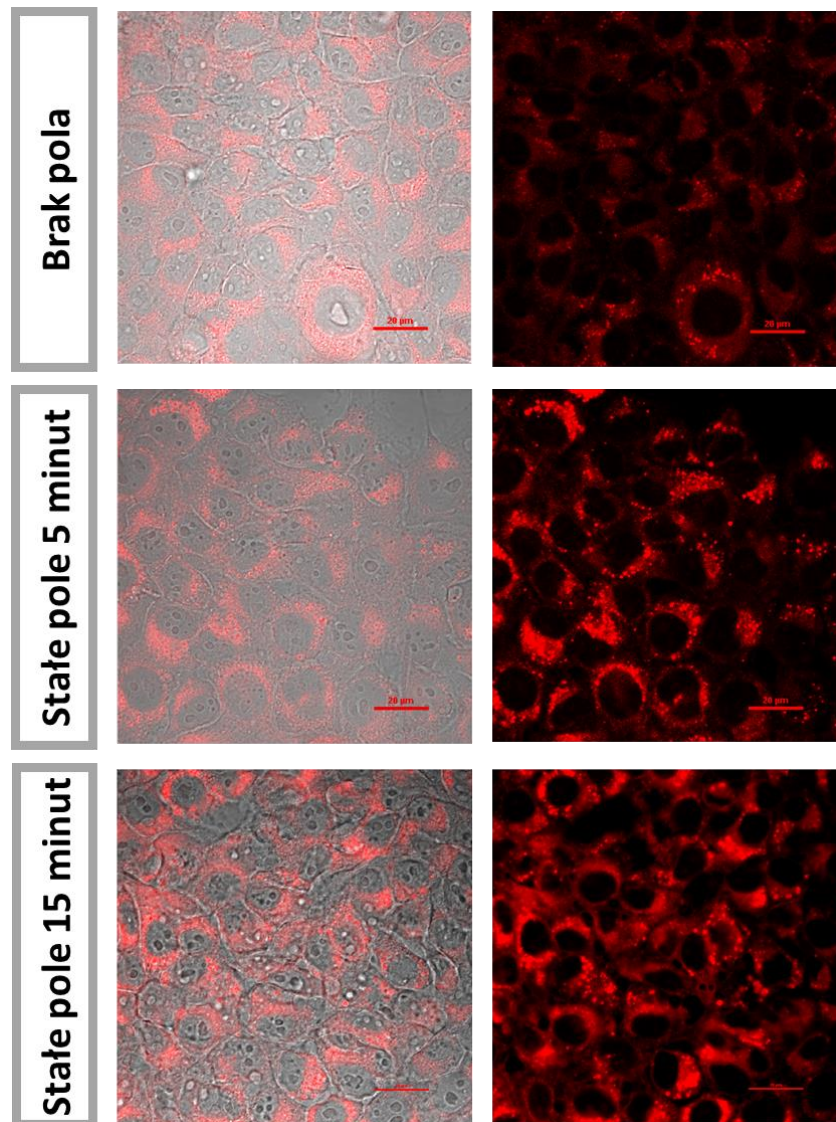


Skuteczność procesu wnikania kapsuł kationowych, wspomaganego stałym zewnętrznym polem magnetycznym została sprawdzona poprzez fluorescencyjne barwienie komórek po przeprowadzonym eksperymencie. Otrzymane zdjęcia (Rysunek 50) potwierdzają, że **15 minutowa ekspozycja na działanie stałego pola** magnetycznego w obecności magnetycznych kapsuł kationowych w znaczący sposób **przyczynia się do naruszenia integralności błony komórkowej**.



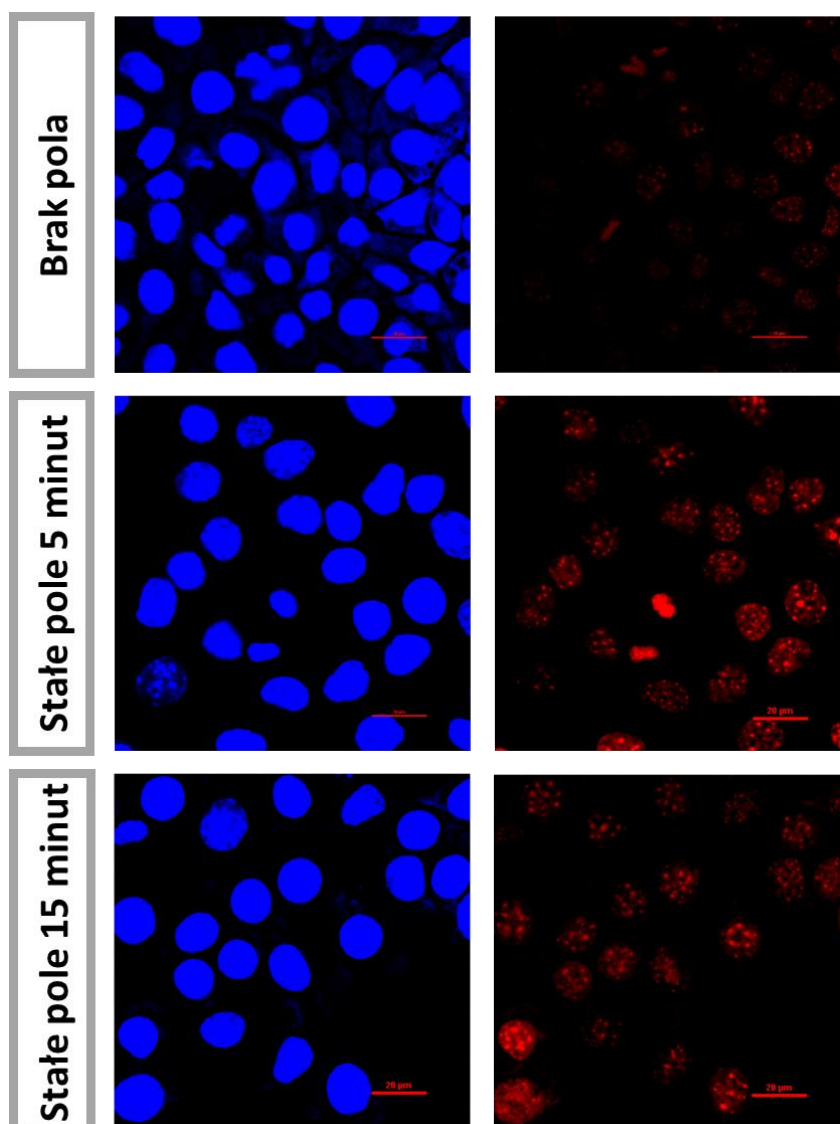
**Rysunek 50** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) po poddaniu eksperymentowi wprowadzenia magnetycznych kapsuł kationowych za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego. Skala: 20  $\mu\text{m}$ .

Analogiczny eksperyment, sterowania nośnika za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego przeprowadzono dla kapsuł anionowych. Otrzymane obrazy (Rysunek 51) wskazują na **możliwość samoistnego wnikania kapsuł o ujemnym ładunku powierzchniowym** do wnętrza komórek na drodze endocytozy, jednak **zastosowanie zewnętrznego stałego pola magnetycznego zwiększa efektywność tego procesu.**



**Rysunek 51** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek podanych eksperymentowi wprowadzenia znakowanych fluorescencyjnie, magnetycznych kapsuł anionowych za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego Kolumna lewa: światło przechodzące i filtr TRITC, kolumna prawa: filtr TRITC. Skala: 20 µm

Przeprowadzone znakowanie fluorescencyjne komórek poddanych działaniu stałego zewnętrznego pola magnetycznego w obecności kapsuł anionowych oraz bez udziału zewnętrznego pola przedstawione zostało na Rysunku 52: Otrzymane obrazy potwierdzają zwiększoną tendencję do samoistnego wnikania kapsuł anionowych do wnętrza komórek. Widoczne intensywne czerwone świecenie **po zastosowaniu zewnętrznego stałego pola magnetycznego** świadczy o znaczącym naruszeniu integralności błony komórkowej, potwierdzającym **skuteczne wprowadzenie nośnika do komórek nowotworowych**.

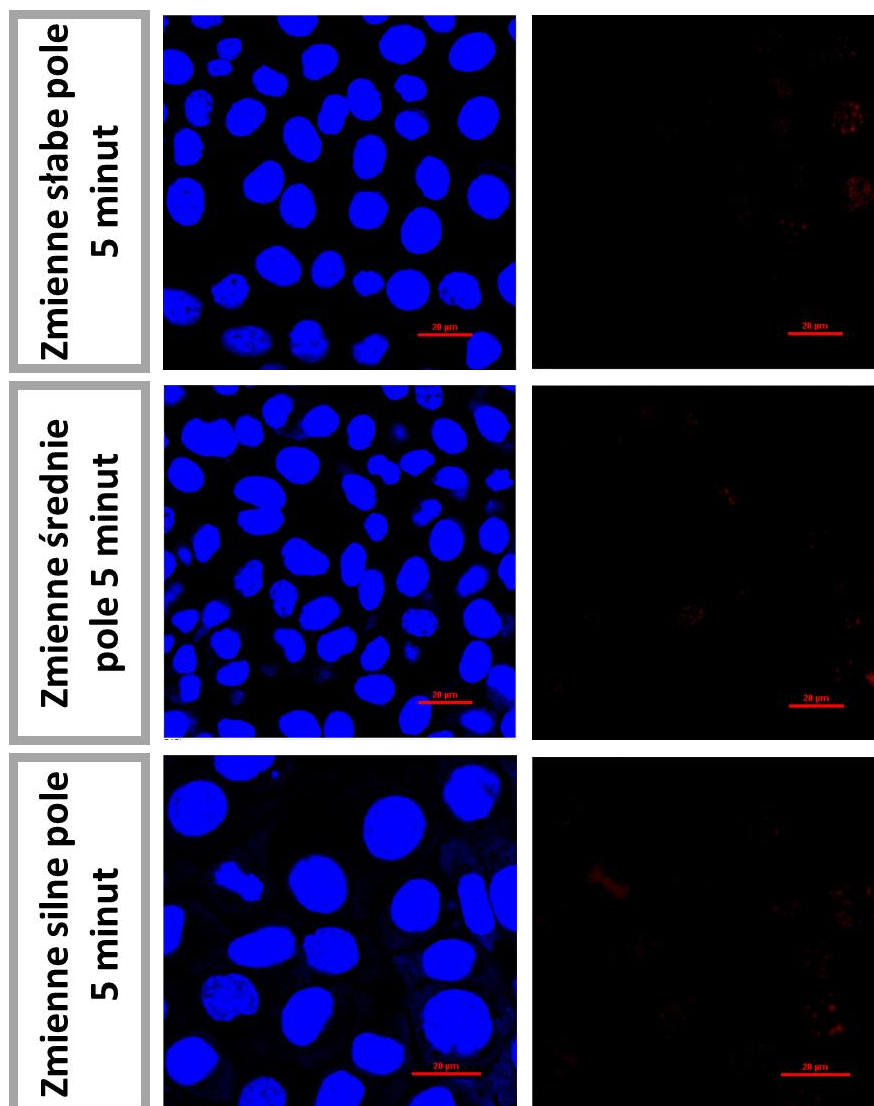


**Rysunek 52** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) po poddaniu eksperymentowi wprowadzenia magnetycznych kapsuł anionowych za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego. Skala: 20  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4.3. Uwalnianie enkapsulowanej substancji zmiennym polem magnetycznym**

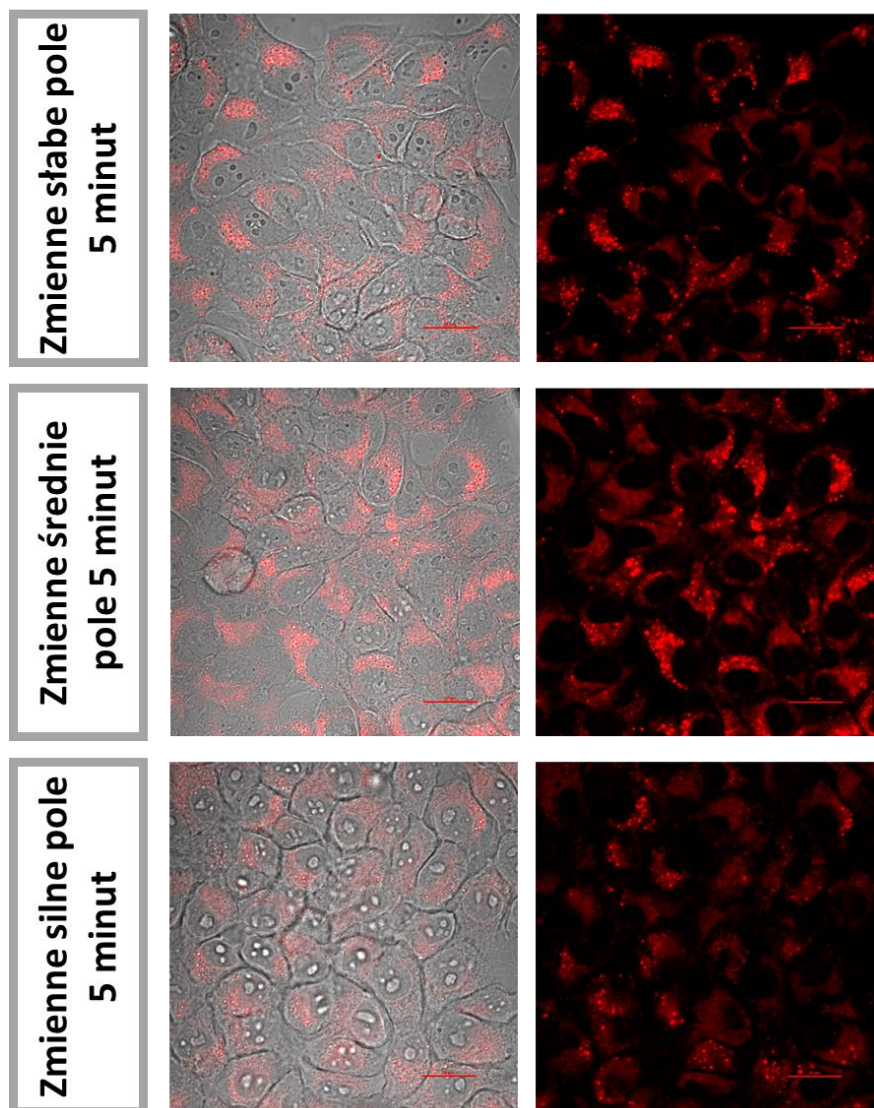
Kolejnym etapem prowadzonych badań było kontrolowane uwolnienie substancji enkapsulowanej w nośniku, za pomocą zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego o odpowiednim natężeniu. Badane układy poddano wcześniejszemu 15 minutowemu działaniu stałego pola magnetycznego w celu wprowadzenia nośnika do wnętrza komórek oraz nagromadzenia kapsuł w ich obrębie.

Wyniki eksperymentu prowadzącego do zweryfikowania wpływu zmiennego pola magnetycznego na komórki nowotworowe przedstawiają zdjęcia z mikroskopu konfokalnego (Rysunek 53). Otrzymane obrazy potwierdzają **zachowaną ciągłość błony komórkowej po ekspozycji komórek na zewnętrzne zmienne pole magnetyczne**, na co wskazuje brak świecenia fluorescencyjnego komórek barwionych jodkiem propidyny.



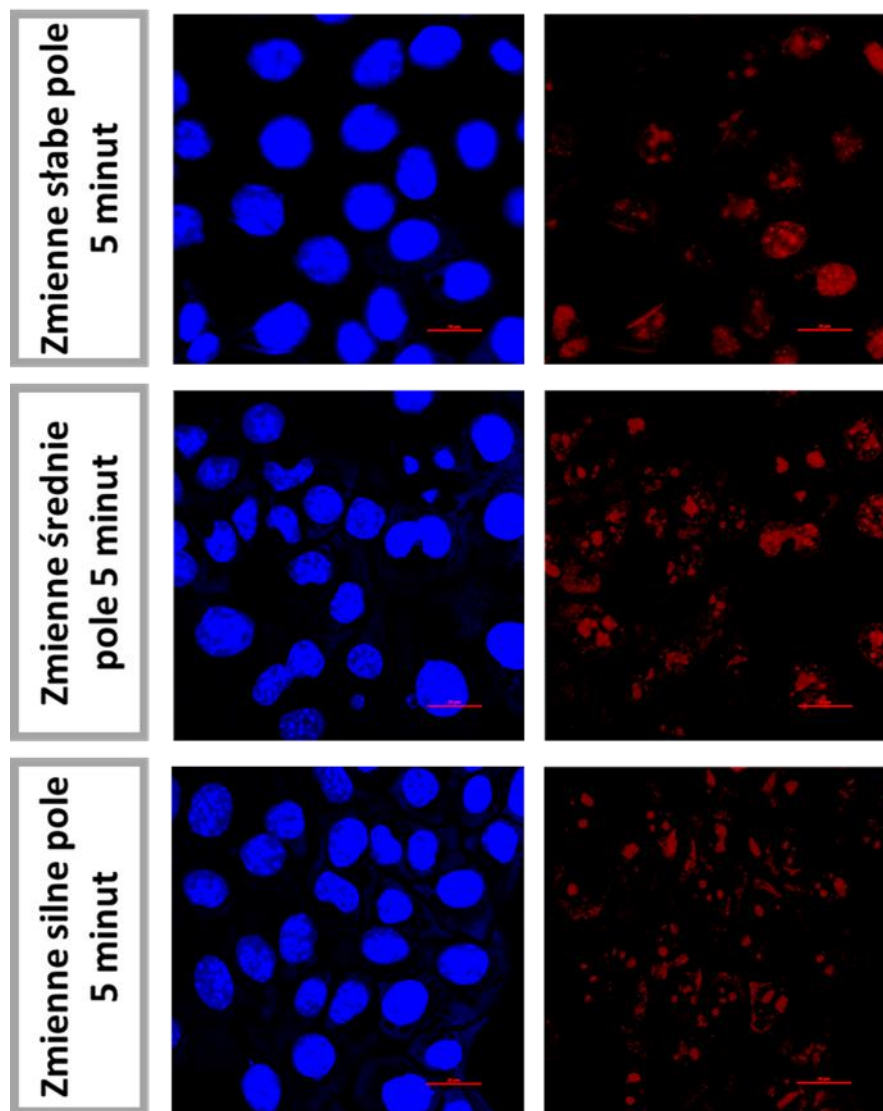
**Rysunek 53** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) poddanych 15 minutowemu działaniu stałego pola magnetycznego, a następnie działaniu zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego. Skala: 20 µm.

Wyniki eksperymentu polegającego na 15 minutowej ekspozycji układu kationowych kapsuł znakowanych fluorescencyjnie i komórek nowotworowych na zewnętrzne stałe pole magnetyczne oraz 5 minutowemu działaniu zmiennego pola magnetycznego o różnych parametrach przedstawiono na Rysunku 54:.. Otrzymane obrazy pokazują, że w przypadku **kapsuł kationowych zastosowanie silnego zmiennego pola magnetycznego** przyczynia się do znacząco większej efektywności przechodzenia kapsuł przez błonę komórkową, jednak **nie prowadzi do uwolnienia enkapsulowanej substancji we wnętrzu komórki.**



**Rysunek 54** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek podanych eksperymentowi wprowadzenia i uwolnienia substancji enkapsulowanej w znakowanych fluorescencyjnie, magnetycznych kapsułach kationowych za pomocą 15 minutowego działania stałego zewnętrznego pola magnetycznego, a następnie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego. Kolumna lewa: światło przechodzące i filtr TRITC, kolumna prawa: filtr TRITC. Skala: 20  $\mu\text{m}$ .

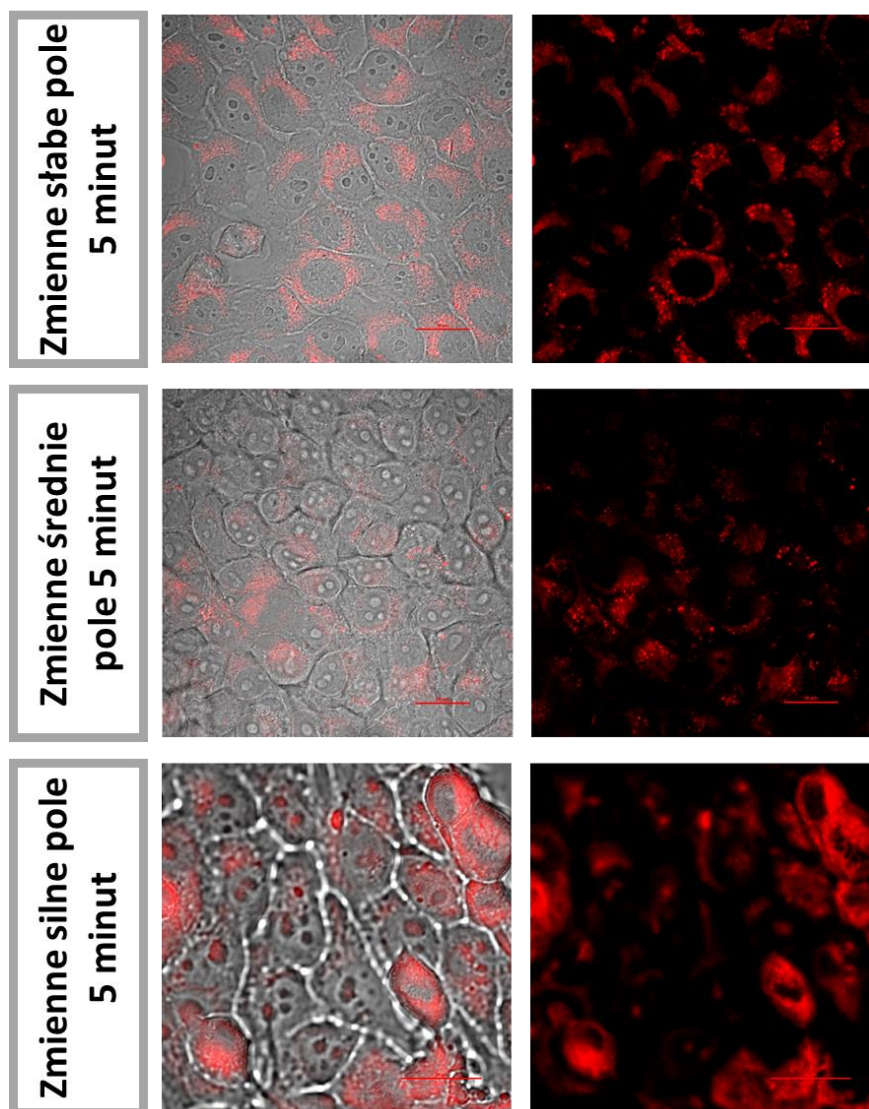
Naruszenie integralności błony komórkowej potwierdzają zdjęcia komórek barwionych fluorescencyjnie po przeprowadzonym eksperymencie polegającym na ekspozycji na stałe zewnętrzne pole magnetyczne i zmienne pole magnetyczne komórek w obecności **kapsuł kationowych** (Rysunek 55). Otrzymane obrazy świadczą o **możliwości wprowadzenia kapsuł do wnętrza komórek z naruszeniem błony komórkowej**, co przyczyni się do ich śmierci.



**Rysunek 55** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRITC) po poddaniu eksperymentowi wprowadzenia i uwolnienia substancji enkapsulowanej w magnetycznych kapsułach kationowych za pomocą 15 minutowego działania stałego zewnętrznego pola magnetycznego, a następnie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego. Skala: 20 µm.

Weryfikację możliwości celowanego i kontrolowanego magnetycznie uwolnienia enkapsulowanej substancji we wnętrzu komórek przeprowadzono również dla kapsuł o ujemnym ładunku powierzchniowym. Przedstawione obrazy (Rysunek 56) wykonane zostały po 15 minutowym działaniu stałego pola magnetycznego i 5 minutowym działaniu odpowiedniego **zmiennego pola magnetycznego na komórki znajdujące się w otoczeniu kapsuł anionowych** zawierających barwnik fluorescencyjny. Wyniki otrzymane dla próbki poddanej działaniu silnego

zmiennego pola magnetycznego w sposób jednoznaczny potwierdzają **możliwość uwolnienia enkapsulowanej substancji we wnętrzu komórek nowotworowych.**

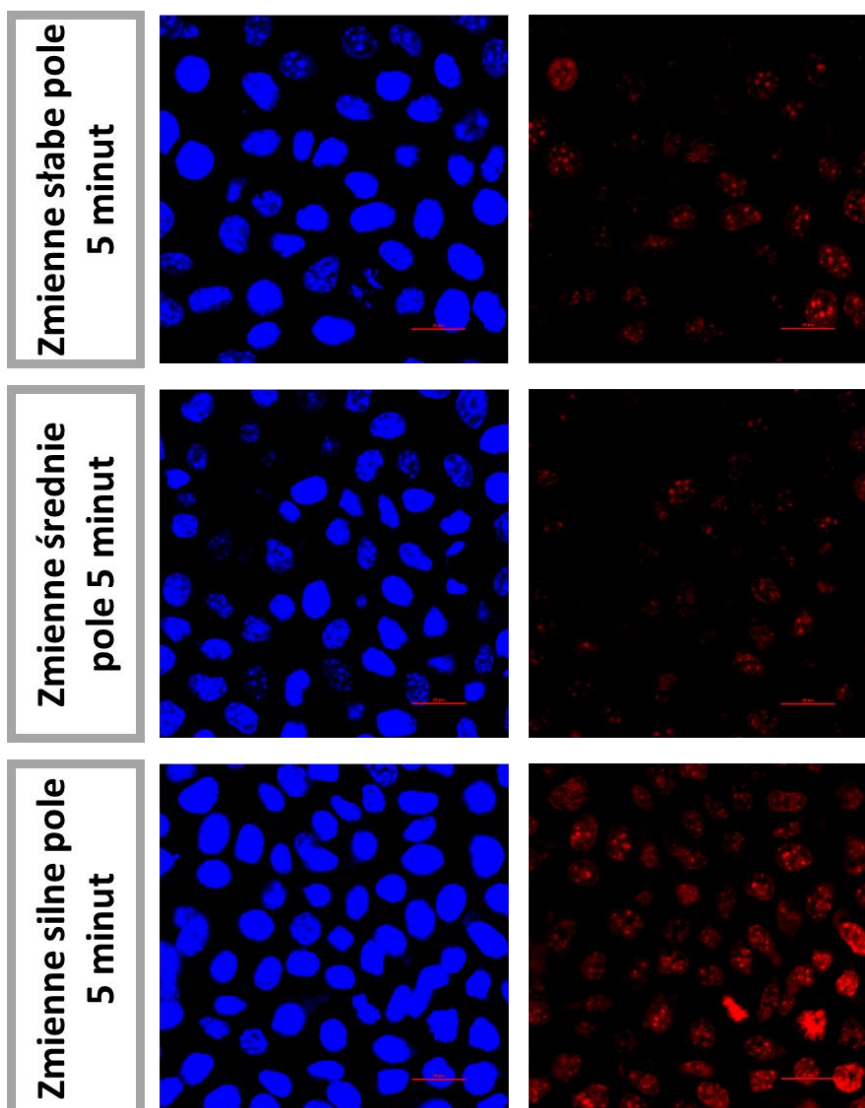


**Rysunek 56** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek podanych eksperymentowi wprowadzenia i uwolnienia substancji enkapsulowanej w znakowanej fluorescencyjnie, magnetycznych kapsułach anionowych za pomocą 15 minutowego działania stałego zewnętrznego pola magnetycznego, a następnie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego. Kolumna lewa: światło przechodzące i filtr TRITC, kolumna prawa: filtr TRITC. Skala: 20  $\mu\text{m}$ .

Wyniki weryfikacji stanu błony komórkowej po eksperymencie mającym na celu sterowane magnetycznie wprowadzenie i uwolnienie substancji znajdującej się we



wnętrzu anionowej kapsuły przedstawia Rysunek 57. Intensywne czerwone świecenie fluorescencyjne potwierdza **znaczące uszkodzenie błony komórkowej**, zwłaszcza w przypadku zastosowania zmiennego silnego pola magnetycznego. Uszkodzenia te dotyczą wszystkich uchwyconych na zdjęciu komórek poddanych eksperymentowi z wykorzystaniem mocnego zmiennego pola magnetycznego i definitywnie **prowadzą do śmierci tych komórek nowotworowych**.



**Rysunek 57** Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) po poddaniu eksperymentowi wprowadzenia i uwolnienia substancji enkapsulowanej w magnetycznych kapsułach anionowych za pomocą 15 minutowego działania stałego zewnętrznego pola magnetycznego, a następnie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego. Skala: 20  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4.4. Podsumowanie**

Przeprowadzone eksperymenty miały na celu określenie potencjału aplikacyjnego biopolimerowych kapsuł magnetycznych opartych na ciekłych olejowych rdzeniach. Wykonany test przeżywalności komórek nowotworowych linii 4T1 w kontakcie z kationowymi oraz anionowymi nośnikami wskazuje, przy odpowiednim stężeniu kapsuł, na brak cytotoksyczności względem badanych komórek. Przed przystąpieniem do zasadniczej części eksperymentów wykonano badania wykluczające negatywny wpływ zewnętrznego stałego i zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego na komórki. W przypadku kapsuł kationowych otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, że zastosowanie zewnętrznego stałego pola magnetycznego wspomaga proces wnikania nośnika do wnętrza komórki poprzez jego nagromadzenie, natomiast zastosowanie zmiennego pola magnetycznego poprawia efektywność wnikania prowadzącego do uszkodzeń błony komórkowej. W przypadku kapsuł posiadających ujemny ładunek powierzchniowy zaobserwowana została samoistna tendencja do wnikania nośnika do wnętrza komórek, jednakże zastosowanie stałego zewnętrznego pola magnetycznego znacząco zwiększa efektywność tego procesu. Ponadto zastosowanie odpowiedniego zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego do kapsuł poddanych wcześniejszemu procesowi wspomaganego magnetycznie wprowadzenia do komórki doprowadziło do uwolnienia enkapsulowanego barwnika w jej wnętrzu.

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

**Celem niniejszej pracy było otrzymanie i scharakteryzowanie nośnika hydrofobowych substancji aktywnych w postaci biopolimerowych kapsuł zdolnych do celowanego i magnetycznie kontrolowanego transportu oraz uwolnienia enkapsulowanej substancji, w aspekcie potencjalnych aplikacji biomedycznych.** Przeprowadzone badania podzielić można na trzy zasadnicze etapy. Etap pierwszy obejmujący syntezę związków i struktur niezbędnych do utworzenia nośnika, etap drugi polegający na otrzymaniu dwóch typów kapsuł oraz etap trzeci stanowiący weryfikację możliwości magnetycznego sterowania badanym układem oraz jego zdolność do magnetycznie kontrolowanego uwolnienia enkapsulowanej substancji wewnątrz komórek nowotworowych.

Pierwsza część badań prowadziła do **otrzymania chitozanu modyfikowanego jednocześnie kationowo grupami glicydylotrimetyloamoniowymi i hydrofobowo łańcuchami dodecyłowymi, anionowej pochodnej chitozanu modyfikowanej grupami sulfonowymi oraz SPION pokrytych hydrofobową warstwą kwasu oleinowego.** Zsyntezowane pochodne chitozanu zostały przebadane w celu określenia stopnia podstawienia odpowiednimi grupami. Przeprowadzona została również kompleksowa analiza fizykochemiczna otrzymanych nanocząstek magnetycznych.

Kolejny etap polegał na **optymalizacji procedury tworzenia biopolimerowego nośnika w postaci kapsuł opartych na ciekłych olejowych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi.** Do stabilizacji olejowych rdzeni wykorzystana została zsyntezowana wcześniej kationowo i hydrofobowo modyfikowana pochodna chitozanu, natomiast właściwości magnetyczne uzyskane zostały poprzez umieszczenie w olejowym rdzeniu nośnika magnetycznych nanocząstek tlenków żelaza pokrytych substancją hydrofobową. Następnie, dzięki obecności dodatniego ładunku na powierzchni kapsuł, zastosowana została metoda nakładania przeciwnie naładowanych warstw. W ten sposób poprzez nałożenie na powierzchnię kapsuły anionowej pochodnej chitozanu otrzymano drugi typ nośnika posiadający ujemny ładunek powierzchniowy. Optymalizację procesu tworzenia kapsuł przeprowadzono dążąc do uzyskania struktur posiadających w swoim rdzeniu jak największe stężenie nanocząstek przy odpowiednich rozmiarach nośnika oraz możliwie dużej stabilności i silnie ujemnym lub dodatnim ładunku powierzchniowym. Otrzymane kapsuły poddane zostały dokładnej charakteryzacji mającej na celu określenie budowy, rozmiaru, stabilności, możliwości enkapsulacji związków hydrofobowych oraz właściwości magnetycznych.

Ostatni etap badań, mający na celu weryfikację potencjału aplikacyjnego badanych kapsuł w kontekście magnetycznie sterowalnych nośników przeznaczonych do celowanego i kontrolowanego transportu oraz uwolnienia enkapsulowanej substancji sprawdzono w badaniach komórkowych. Przeprowadzony został test cytotoksyczności nośnika względem wybranej linii komórkowej, a na podstawie otrzymanego wyniku wybrano odpowiednie stężenie niewywołujące negatywnej odpowiedzi komórkowej. Następnie, zarówno dla kapsuł o dodatnim, jak i kapsuł o ujemnym ładunku powierzchniowym, przeprowadzono eksperyment mający na celu wprowadzenie nośnika do wnętrza komórek nowotworowych za pomocą zewnętrznego stałego pola magnetycznego. **Otrzymane wyniki w sposób jednoznaczny wskazują na polepszenie efektywności wnikania kapsuł poprzez zastosowanie pola magnetycznego, przejawiające się nagromadzeniem nośnika w obrębie komórki oraz skuteczniejszym pokonaniem bariery, którą stanowi błona komórkowa.** Przeprowadzono także eksperyment w którym zastosowano zmienne pole o różnych parametrach. **W przypadku kapsuł kationowych zastosowanie zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego doprowadziło do skuteczniejszego wniknięcia nośnika do wnętrza komórki, natomiast zastosowanie takiego pola w eksperymencie z kapsułami anionowymi skutkowało uwolnieniem enkapsulowanej substancji wewnątrz komórek nowotworowych.** Upřednio upewniono się, czy stałe i zmienne zewnętrzne pola magnetyczne nie mają negatywnego wpływu na stan komórek. Wyniki eksperymentów interpretowane były w oparciu o zdjęcia pochodzące z mikroskopu konfokalnego preparatów komórkowych utrwalonych po przeprowadzonych badaniach oraz o zdjęcia komórek barwionych dodatkowo w celu uwidocznienia uszkodzeń w błonie komórkowej prowadzących do ich śmierci.

**Ukazanie możliwości magnetycznie kontrolowanego wprowadzenia nośnika oraz uwolnienia enkapsulowanej substancji jest bardzo obiecujące w kontekście terapii celowanych.** Ze względu na biomedyczny charakter potencjalnych aplikacji opisywane kapsuły wymagają kontynuacji badań w warunkach klinicznych, między innymi w testach na zwierzętach.

## BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>1</sup> Morgi, V. *et al.* Nanotechnology in Medicine: From Inception to Market Domination. *J. Drug Deliv.* 2090-3014 (2012)
- <sup>2</sup> Esser-Kahn, A.P. *et al.* Triggered Release from Polymer Capsules. *Macromolecules.* **44**, 5539-5553 (2011)
- <sup>3</sup> Rabek, J.F. Współczesna wiedza o polimerach. *Wydawnictwo Naukowe PWN SA*, (2008)
- <sup>4</sup> Florjańczyk, Z., Penczka, S. Chemia polimerów tom 1. *Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej*, (2001)
- <sup>5</sup> Pielichowski, J., Puszyński, A. Chemia polimerów. *TEZA Wydawnictwo Naukowo-Techniczne*, (2004)
- <sup>6</sup> Paschalis, A., Björn, L. Amphiphilic Block Copolymers. Self-Assembly and Applications. *Elsevier* (2000)
- <sup>7</sup> Puoci, F. Advanced Polymers in Medicine. *Springer*, (2015)
- <sup>8</sup> Yadav, P. *et al.* Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **9**, 21-25 (2015)
- <sup>9</sup> Van de Velde, K., Kiekens, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing* **21**, 433-442 (2002)
- <sup>10</sup> Xiong, X. B., Binkhathlan, Z., Molavi, O., Lavasanifar, A. Amphiphilic block copolymers: Preparation and application in nanodrug and gene delivery. *Acta Biomaterialia* **8**, 2017-2033 (2012)
- <sup>11</sup> Zhao, D. *et al.* Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. *Polymers* **10**, 462 (2018)
- <sup>12</sup> Ramya, R., Jayachandran, V., Se Kwon, K., Sudha, P.N. Biomedical Applications of Chitosan: An Overview. *J. Biomater. Tissue Eng.* **2**, 100-111 (2012)
- <sup>13</sup> Niaounakis, M. Biopolymers: Applications and Trends. *Elsevier*, (2015)
- <sup>14</sup> Bayda, S. *et al.* The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, **25**, 112 (2020)
- <sup>15</sup> Ali Mansoori, G., Fauzi Soelaiman, T.A. Nanotechnology – An Introduction for the Standards Community. *JAI*, **2** (2005)
- <sup>16</sup> Vert, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* **84**, 377-410 (2012)
- <sup>17</sup> Kuterbach, D.A., Walcott, B., Reeder, R.J., Frankel, R.B. Iron-Containing Cells in the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Science* (1982)
- <sup>18</sup> Das, R.K. *et al.* Biological synthesis of metallic nanoparticles: plants, animals and microbial aspects. *Nanotechnol. Environ. Eng.* **2** (2017)
- <sup>19</sup> Strambeanu, N., Demetrovici, L., Dragos, D., Lungu, M. Nanoparticles: Definition, classification and general physical properties. *Springer*, 3-8 (2015)
- <sup>20</sup> Wu, K. *et al.* Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. *Nanotechnology* **30** (2019)
- <sup>21</sup> Kittel, C. Wstęp do fizyki ciała stałego. *Wydawnictwo Naukowe PWN* (1999)
- <sup>22</sup> Stefanita, C.G. Magnetism Basics and Applications. *Springer* (2012)
- <sup>23</sup> Ibusuki, T., Kojima, S., Kitakami, O., Shimada, Y. Magnetic anisotropy and behaviors of Fe nanoparticles. *IEEE Trans. Magn.* **37**, 4 (2001)
- <sup>24</sup> Kirschvink, J.L. Magnetite Biomineralization and Geomagnetic Sensitivity in Higher Animals: An Update and Recommendations for Future Study. *Bioelectromagnetics* **10**, 239-259 (1989)
- <sup>25</sup> Martinez, A., Garcia-Lobato, M.A., Perry, D.L. Study of the properties of iron oxide nanostructures. *Res.Nanotechnol.Dev.* (2009)
- <sup>26</sup> Cornell, R.M., Schwetmann, U. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. 2nd ed. *WILEY-VCHWeinheim* (2003)
- <sup>27</sup> Autorstwa Rob Lavinsky, iRocks.com – CC-BY-SA-3.0, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=10120846>, (dostęp 14 lipca 2021)

- <sup>28</sup> Autorstwa Rob Lavinsky, iRocks.com – CC-BY-SA-3.0, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=10139390>, (dostęp 14 lipca 2021)
- <sup>29</sup> Autorstwa Ra`ike – Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=20801015>, (dostęp 14 lipca 2021)
- <sup>30</sup> Domena publiczna, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2777872> (dostęp 14 lipca 2021)
- <sup>31</sup> Lu, A.H., Salabas, E.L., Schuth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 1222-1244 (2007)
- <sup>32</sup> Batlle, X., Labarta, A. Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **35**, 15-42 (2002)
- <sup>33</sup> Frenkel, J., Dorfman, J. Spontaneous and Induced Magnetisation in Ferromagnetic Bodies. *Nature.* **126** (1930)
- <sup>34</sup> Teja, A.S., Koh, P.Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **55**, 22-45 (2009)
- <sup>35</sup> Demortiere, A. et al. Size-dependent properties of magnetic iron oxide nanocrystals. *Nanoscale.* **3**, 225 (2011)
- <sup>36</sup> Thomas, J.A. Immunomagnetic Separation of Microorganisms with Iron Oxide Nanoparticles. *Chemosensors.* **8**, 17 (2020)
- <sup>37</sup> Vidal-Vidal, J., Rivas, J., Lopez-Quintela, M.A. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. *Colloids Surf.* **288**, 44-51 (2006)
- <sup>38</sup> Tombacz, E., Turcu, R., Socoliuc, V., Vekas, L. Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magnetoresponsive nanosystems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 442-453 (2015)
- <sup>39</sup> Samrot, A.V. et al. A review on synthesis, characterization and potential biological application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **4**, 100042 (2021)
- <sup>40</sup> Ali, A. et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **9**, 49-67 (2016)
- <sup>41</sup> Yusoff, A.H.M., Salimi, M.N., Jamlos, M.F. A review: Synthetic strategy control of magnetite nanoparticles production. *Adv. Nano Res.* **6**, 1-19 (2017)
- <sup>42</sup> Husfschmid, R. et al. Synthesis of phase-pure and monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition. *Nanoscale.* **7**, 11142 (2015)
- <sup>43</sup> Sharma, G., Jeevanadam, P. Synthesis of self-assembled prismatic iron oxide nanoparticles by a novel thermal decomposition route. *RSC Advances*, **3**, 189 (2013)
- <sup>44</sup> Kura, H., Takahashi, M., Ogawa, T. Synthesis of Monodisperse Iron Nanoparticles with a High Saturation Using an Fe(CO)<sub>x</sub>-Oleylamine Reacted Precursor. *J. Phys. Chem. C.* **114**, 5835-5838 (2010)
- <sup>45</sup> Lastovina, T.A., Budnyk, A.P., Kubrin, S.P., Soldatov, A.V. Microwave-assisted synthesis of ultra-small iron oxide nanoparticles for biomedicine. *Mendeleev Commun.* **28**, 167-169 (2018)
- <sup>46</sup> Krajewski, M. Magnetic-field-induced synthesis of magnetic wire-like micro- and nanostructures. *Nanoscale.* **9**, 16511-16545 (2017)
- <sup>47</sup> Hou, Y., Xu, Zhichuan, X., Sun, S. Controlled Synthesis and Chemical Conversions of FeO Nanoparticles. *Angew. Chem.* **119**, 6445-6448 (2007)
- <sup>48</sup> Posfai, M. et al. Properties of intracellular magnetite crystals produced by *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1. *EPSL.* **249**, 444-455 (2006)
- <sup>49</sup> Reddy, H., Arias, J.L., Nicolas, J., Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **112**, 5818-5878 (2012)
- <sup>50</sup> Abhilash, Revati, K., Pandey, B.D. Microbial synthesis of iron-based nanomaterials-A review. *Bull. Mater. Sci.* **34**, 191-198 (2011)

- 
- <sup>51</sup> Wei, W. *et al.* Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16** (2015)
- <sup>52</sup> Fratila, R.M. *et al.* Strategies for the Biofunctionalization of Gold and Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **30** (50), 15057-15071 (2014)
- <sup>53</sup> Akbarzadeh, A., Samiei, M., Davaran, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett.* **7**(1), 144 (2012)
- <sup>54</sup> Arruebo, M., Fernandez-Pacheco, R., Ibarra, M.R., Santamaria, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday.* **2**, 3 (2007)
- <sup>55</sup> Malhotra, N. *et al.* Potential Toxicity of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: A Review. *Molecules.* **25**, 3159 (2020)
- <sup>56</sup> Gupta, A.K., Gupta, M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* **26**, 1565-1573 (2005)
- <sup>57</sup> Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *small.* **4** (1), 26-49 (2008)
- <sup>58</sup> Petters, C., Irrsack, E., Koch, K., Dringen, R. Uptake and Metabolism of Iron Oxide Nanoparticles in Brain Cells. *Neurochem Res.* **39** (9), 1648-1660 (2014)
- <sup>59</sup> Feng, Q. *et al.* Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Nature.* **8**, 2082 (2018)
- <sup>60</sup> Mitragotri, S., Lahann, J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat.Mater.* **8** (2009)
- <sup>61</sup> Linkov, I., Satterstrom, F.K., Corey, L.M. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine* **4**, 167-171 (2008)
- <sup>62</sup> Mukherjee, S., Liang, L., Veisoh, O. Recent Advancements of Magnetic Nanomaterials in Cancer Therapy. *Pharmaceutics.* **12**, 147 (2020)
- <sup>63</sup> Wu, K. *et al.* Portable GMR Handheld Platform for the Detection of Influenza A Virus. *ACS Sens.* **2**, 1594-1601 (2017)
- <sup>64</sup> Wu, K., Su, D., Liu, J., Saha, R., Wang, J.P. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. *Nanotechnology* **30**, 502003 (2019)
- <sup>65</sup> Rizzi, G. *et al.* Simultaneous Profiling of DNA Mutation and Methylation by Melting Analysis Using Magnetoresistive Biosensor Array. *ACS Nano.* **11** (9), 8864-8870 (2017)
- <sup>66</sup> Shen, Z., Wu, A., Chen, X. Iron Oxide Nanoparticles-based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Mol. Pharmaceutics.* **14** (5), 1352-1364 (2017)
- <sup>67</sup> Reimer, P., Balzer, T. Ferucarbotan (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur Radiol.* **13**, 1266-1276 (2003)
- <sup>68</sup> Stueber, D.D., Villanova, J., Aponte, I., Xiao, Z., Colvin, V.L. Magnetic Nanoparticles in Biology and Medicine: Past, Present, and Future Trends. *Pharmaceutics.* **13**, 943 (2021)
- <sup>69</sup> Toth, G.B. *et al.* Current and Potential Imaging Applications of Ferumoxytol for Magnetic Resonance Imaging. *Kidney. Int.* **92** (1), 47-66 (2018)
- <sup>70</sup> Siedek, F. *et al.* Comparison of ferumoxytol- and gadolinium chelate-enhanced MRI for assessment of sarcomas in children and adolescents. *Eur. Radiol.* **30**, 1790-1803 (2020)
- <sup>71</sup> Gilchrist, R.K. *et al.* Selective Inductive Heating of Lymph Nodes. *Ann Surg.* **146** (4), 596-606 (1957)
- <sup>72</sup> [https://www.onkonet.pl/n\\_n\\_terapia\\_nanotherm.php](https://www.onkonet.pl/n_n_terapia_nanotherm.php) (dostęp 22.08.2021)
- <sup>73</sup> Rajan, A., Sahu, N.K. Review on magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia for cancer therapy. *J Nanopart Res.* **22** (319) (2020)
- <sup>74</sup> Sohail, A. *et al.* A review on hyperthermia via nanoparticle-mediated therapy. *Bull Cancer.* **104**, 452-461 (2017)
- <sup>75</sup> Hedayatnasab, Z., Abnisa, F., Ashri Wan Daud, W.M. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater. Des.* **123**, 174-196 (2017)

- 
- <sup>76</sup> Rubia-Rodriguez, I. *et al.* Whither Magnetic Hyperthermia? A Tentative Roadmap. *Materials*. **14**, 706 (2021)
- <sup>77</sup> Dobson, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. *Drug. Dev. Res.* **67**, 55-60 (2006)
- <sup>78</sup> Gholami, A. *et al.* Current trends in chemical modifications of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery in cancer chemotherapy. *Drug Metab. Rev.* **51** (1), 205-224 (2020)
- <sup>79</sup> Mirza, S., Ahmad, M.S., Shah, M.I.A., Ateeq, M. Magnetic nanoparticles: drug delivery and bioimaging applications (Chapter 11). *Micro and Nano Technologies*, Elsevier, 189-213 (2020)
- <sup>80</sup> Chomucka, J. *et al.* Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacol. Res.* **62**, 144-149 (2010)
- <sup>81</sup> Norouzi, M. *et al.* Doxorubicin-loaded iron oxide nanoparticles for glioblastoma therapy: a combinational approach for enhanced delivery of nanoparticles. *Sci Rep* **10**, 11292 (2020)
- <sup>82</sup> Hossen, S. *et al.* Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *J. Adv. Res.* **15**, 1-18 (2019)
- <sup>83</sup> Hashida, M. Role of pharmacokinetic consideration for the development of drug delivery systems: A historical overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2020)
- <sup>84</sup> Chanchal, J., Nair, S.K., Kumar K, K., Dineshkumar B. Niosomes as Nano-carrier Based Targeted Drug Delivery System. *J. drug deliv. ther.* **11**, 4-S, 166-170 (2021)
- <sup>85</sup> Mujoriya, R., Bodla, R.B., Dhamande, K., Singh, D., Patle, L. Niosomal Drug Delivery System: The Magic Bullet. *J. Appl. Pharm. Sci.* **1**, 9, 20-23 (2011)
- <sup>86</sup> Liu, Y., Chen, D., Shang, P., Yin, D.Y. A review of magnet systems for targeted drug delivery. *J. Control. Release.* **302**, 90-104 (2019)
- <sup>87</sup> Jain, K.K. The Handbook of Nanomedicine. *New York: Humana Press*, 217-219 (2012)
- <sup>88</sup> Liu, Y., Li, M., Yang, F., Gu, N. Magnetic drug delivery systems. *Sci China Mater.* **60**, 6, 471-486 (2017)
- <sup>89</sup> Zhi, D. *et al.* Targeting strategies for superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer therapy. *Acta Biomater.* **102**, 13-34 (2020)
- <sup>90</sup> El-Boubbou, K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery. *Nanomedicine.* **8**, 929-952 (2018)
- <sup>91</sup> El-Dakdouki, M.H. *et al.* Development of Multifunctional Hyaluronan-Coated Nanoparticles for Imaging and Drug Delivery to Cancer Cells. *Biomacromolecules.* **13**, 1144-1151 (2012)
- <sup>92</sup> Maity, D., Sudame, A., Kandasamy, G. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapeutics. *Nanobiotechnology in Diagnosis, Drug Delivery, and Treatment.* (2020)
- <sup>93</sup> Depalo, N. *et al.* Sorafeib delivery nanoplatfrom based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles magnetically targets hepatocellular carcinoma. *Nano Res.* **10**, 7, 2431-2448 (2016)
- <sup>94</sup> Lu, Y.J. *et al.* Thermosensitive magnetic liposomes for alternating magnetic field-inducible drug delivery in dual targeted brain tumour chemotherapy. *Chem. Eng. J.* **373**, 720-733 (2019)
- <sup>95</sup> Davarpanah, F. *et al.* Magnetic delivery of antitumor carboplatin by using PEGylated-Niosomes. *J.Pharm.Sci.* **26**, 57-64 (2018)
- <sup>96</sup> Mhlanga, N., Ray, S.S., Lemmer, Y.L., Wesley-Smith, J. Polylactide-Based Magnetic Spheres as Efficient Carriers for Anticancer Drug Delivery. *ASC Appl. Mater. Interfaces.* **7**, 40, 22692-22701 (2015)
- <sup>97</sup> Liao, J., Huang, H. Review on magnetic natural polymer constructed hydrogels as vehicles for drug delivery. *Biomacromolecules.* **21**, 7, 2574-2594 (2020)
- <sup>98</sup> Naderi, Z., Azizian, J., Moniri, E., Farhadyar, N. Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Cellulose/ $\beta$ -Cyclodextrin/Chitosan Hydrogels and Investigating the Effect of Magnetic Nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) on a Novel Carrier for a Controlled Release



- 
- of Methotrexate as Drug Delivery. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **30**, 1339-1351 (2020)
- <sup>99</sup> Kapuścińska, A., Olejnik, A., Nowak, I. Nanocapsules as carriers of active substances (Chapter 8). *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics* **10**, Elsevier, 395-417 (2016)
- <sup>100</sup> Shchukin, D.G., Shchukina, E. Capsules with external navigation and triggered release. *Curr Opin Pharmacol.* **18**, 42-46 (2014)
- <sup>101</sup> Esser-Kahn, A.P. et al. Triggered Release form Polymer Capsules. *Macromolecules.* **44**, 5539-5553 (2011)
- <sup>102</sup> Belbekhouche, S. et al. Chitosan based self-assembled nanocapsules as antibacterial agent. *Colloids Surf. B.* **181**, 158-165 (2019)
- <sup>103</sup> Wang, X. et al. Synthesis of Yolk-Shell Polymeric Nanocapsules Encapsulated with Monodispersed Upconversion Nanoparticle for Dual-Responsive Controlled Drug Release. *Macromolecules*, **51**, 24, 10074-10082 (2018)
- <sup>104</sup> Luborsky, F.E., Drummond, B.J., Penta, A.Q. Recent advances in the removal of magnetic foreign bodies from the esophagus, stomach and duodenum with controllable permanent magnets. *Am. J. Roentg. Rad. Ther. Nucl. Med.* **92**, 1021-1025 (1964)
- <sup>105</sup> <https://tezeusz.pl/najnowsze-tajemnice-i-zagadnienia-czarnej-magii-hipnotyzmu-spirytyzmu-i-magnetyzmu-ok-1930-r-873279> (dostęp 25.02.2022)
- <sup>106</sup> <https://www.worthpoint.com/worthopedia/antique-prof-longs-magnetic-comb-1084432847> (dostęp 25.02.2022)
- <sup>107</sup> [https://centerforinquiry.org/blog/magnetic\\_medicines/](https://centerforinquiry.org/blog/magnetic_medicines/) (dostęp 25.02.2022)
- <sup>108</sup> Hafeli, U. The History of Magnetic in Medicine. *Magnetism in Medicine: A Handbook, Second Edidtion.* 3-23 (2007)
- <sup>109</sup> Freeman, M.W., Arrott, A., Watson, J.H.L. Magnetism in Medicine. *Int. J. Appl. Phys.*, **31**, 404 (1960)
- <sup>110</sup> Frei, E.H. Magnetism and Medicine. *Int. J. Appl. Phys.*, **40**, 955 (1969)
- <sup>111</sup> Lubbe, A.S., Alexiou, C., Bergemann, C. Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting. *J. Surg. Res.* **95**, 200-206 (2001)
- <sup>112</sup> Shchukin, D.G., Shchukina, E. Capsules with external navigation and triggered release. *Curr Opin Pharmacol.*, **18**, 42-46 (2014)
- <sup>113</sup> De Geest, B.G. et al. Release mechanisms for polyelectrolyte capsules. *Chem. Soc. Rev.*, **36**, 636-649 (2007)
- <sup>114</sup> Das, S.S. et al. Stimulti-Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery, Imaging and Theragnosis. *Polymers.*, **12**, 1397 (2020)
- <sup>115</sup> Shapiro, B. et al. Open challenges in magneic drug targeting. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* (2014)
- <sup>116</sup> Wilhelm, S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater.* **1**, 16014 (2016)
- <sup>117</sup> Svenskaya, Y. et al. Biodegradable polyelectrolyte/magnetite capsules for Mr imaging and magnetic targeting of tumors. *Nanotheranostics*, **5**(3), 362-377 (2021)
- <sup>118</sup> Mayorova, O.A. et al. Endovascular addressing improves the effectiveness of magnetic targeting of drug carrier. Comparison with the conventional administration method. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* **28**, 102184 (2020)
- <sup>119</sup> Novoselova, M.V. et al. Submicron-Sized Nanocomposite Magnetic-Sensitive Carriers: Controllable Organ Distribution and Biological Effects. *Polymers* **11**, 1082 (2019)
- <sup>120</sup> Luo, D., Poston, R.N., Gould, D.J., Sukhorukov, G.B. Magnetically targetable microcapsules display subtle changes in permeability and drug release in response to a biologically compatible low frequency alternating magnetic field. *Mater. Sci. Eng. C.* **94**, 647-655 (2019)
- <sup>121</sup> Szczepanowicz, K., Piechota, P., Węglarz W.P., Warszyński, P. Polyelectrolyte nanocapsules containing iron oxide nanoparticles as MRI detectable drug delivery system. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **532**, 5, 351-356 (2017)

- 
- <sup>122</sup> Karewicz, A. *et al.* Curcumin-containing liposomes stabilized by thin layers of chitosan derivatives. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **109**, 307-316 (2013)
- <sup>123</sup> Bulwan, M., Zapotoczny, S., Nowakowska, M. Robust "one-component" chitosan-based ultrathin films fabricated using layer-by-layer technique. *Soft Matter* **5**, 4726-4732 (2009)
- <sup>124</sup> Cho, J., Grant, J., Piquette-Miller, M., Allen, C. Synthesis and physicochemical and dynamic mechanical properties of a water-soluble chitosan derivative as a biomaterial. *Biomacromolecules* **7**, 2845-2855 (2006)
- <sup>125</sup> Leszczyński, B. *et al.* The influence of oxidation process on exchange bias in egg-shaped FeO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>core/shell nanoparticles. *J Magn Magn Mater* **416**, 269-274 (2016)
- <sup>126</sup> Park J. *et al.* Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat Mater* **3**, 891-895 (2004)
- <sup>127</sup> Szafraniec, J. *et al.* Chitosan-based nanocapsules of core-shell architecture. *Polimery* **62**, 509-515 (2017)
- <sup>128</sup> Szafraniec, J., Janik, M., Odrobińska, J., Zapotoczny, S. Nanocapsules templated on liquid cores stabilized by graft amphiphilic polyelectrolytes. *Nanoscale* **7**, 5525-5536 (2015)
- <sup>129</sup> Berridge, M., Herst, P., Tan, A. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* **11**, 127-152 (2005)
- <sup>130</sup> Ngimhuang, J. *et al.* Synthesis of a novel polymeric surfactant by reductive N - alkylation of chitosan with 3-O-dodecyl-D-glucose. *Polymer* **45**, 837-841 (2004)
- <sup>131</sup> Premaratne, W., Priyadarshana, W., Gunawardena, S., De Alwis, A. Synthesis of Nanosilica from Paddy Husk Ash and Their Surface Functionalization. *J. Sci. Univ. Kelaniya Sri Lanka* **8**, 33-48 (2013)
- <sup>132</sup> Zhang, L., He, R., Gu, H.C. Oleic Acid Coating on the Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **253**, 2611-2617 (2006)
- <sup>133</sup> Bronstein, L.M. *et al.* Influence of Iron Oleate Complex Structure on Iron Oxide Nanoparticle Formation. *Chem. Mater.* **19**, 3624-3632 (2007)
- <sup>134</sup> Cornell, R.M., Schwetmann, U. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. *2nd ed. WILEY-VCH GmbH&Co. KGaA*, 139-183 (2003)
- <sup>135</sup> Pichon, B.P. *et al.* Microstructural and Magnetic Investigations of Wustite-Spinel Core-Shell Cubic-Shaped Nanoparticles. *Chem. Mater.* **23**, 2886-2900 (2011)
- <sup>136</sup> Estrader, M. *et al.* Origin of the Large Dispersion of Magnetic Properties in Nanostructured Oxides: FeO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as a Case Study. *Nanoscale* **7**, 3002-3015 (2015)
- <sup>137</sup> Hou, Y., Xu, Z., Sun, S. Controlled Synthesis and Chemical Conversions of FeO Nanoparticles. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 6329-6332 (2007)
- <sup>138</sup> Sun, X., Frey Huls, N., Sigdel, A., Sun, S. Tuning Exchange Bias in Core/Shell FeO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Nano Lett.* **12**, 246-251 (2012)
- <sup>139</sup> Scherrer, P. Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen, Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften, Göttingen. 98-100 (1918)
- <sup>140</sup> Blume, M., Tjon, J. A. Mössbauer Spectra in a Fluctuating Environment. *Phys. Rev.* **165**, 446-456 (1968)
- <sup>141</sup> Armstrong, R.J., Morrish, A.H. Mössbauer Study Of Ferric Ions In The Tetrahedral And Octahedral Sites Of A Spinel. *Phys. Lett.* **23**, 414-416 (1966)
- <sup>142</sup> Mørup, S. Mössbauer Effect in Small Iron Particles. *Hyperfine Interact.* **60**, 959-974 (1990)

- 
- <sup>143</sup> Redl, F.X. *et al.* Magnetic, Electronic, and Structural Characterization of Nonstoichiometric Iron Oxides at the Nanoscale. *J.Am.Chem.Soc.* **126**, 14583-14599 (2004)
- <sup>144</sup> Tucek, J., Zboril, R., Petridis, D. Maghemite Nanoparticles by View of Mössbauer Spectroscopy. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 926-947 (2006)
- <sup>145</sup> Bean, C. P., Livingston, J. D. Superparamagnetism. *J. Appl. Phys.* **30**, S120-S129 (1959)
- <sup>146</sup> Khurshid, H. *et al.* Mechanism and Controlled Growth of Shape and Size Variant Core/Shell FeO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Nanoscale* **5**, 7942-7952 (2013)
- <sup>147</sup> Hadjipanayis, G.C., Kim, A. Domain Wall Pinning versus Nucleation of Reversed Domains in R-Fe-B Magnets (Invited). *J. Appl. Phys.* **63**, 3310-3315 (1988)
- <sup>148</sup> Pinkerton, F.E., Van Wingerden, D.J. Magnetization Process in Rapidly Solidified Neodymium-Iron-Boron Permanent Magnet Materials. *J. Appl. Phys.* **60**, (1986)
- <sup>149</sup> Zhang, J. *et al.* Coercivity Mechanism of Nanocomposite Sm-Co/Fe Multilayer Films. *J. Appl. Phys.* **107**, 1-4 (2010)

---

## SPIS RYSUNKÓW

<b>Rysunek 1</b> Schemat ilustrujący podział polimerów ze względu na ich budowę chemiczną. ....	24
<b>Rysunek 2</b> Schemat klasyfikacji biodegradowalnych polimerów pochodzenia naturalnego. ....	25
<b>Rysunek 3</b> Schemat struktury chitozanu. ....	26
<b>Rysunek 4</b> Uporządkowanie momentów magnetycznych w materiale: a) ferromagnetycznym, b) antyferromagnetycznym, c) ferrimagnetycznym. ....	31
<b>Rysunek 5</b> Krzywa magnesowania ferromagnetyka: odcinek A-B – krzywa pierwotnego magnesowania, $M_s$ – magnetyzacja nasycenia, $H_c$ – pole koercji, $M_r$ – remanencja. ....	32
<b>Rysunek 6</b> Zdjęcia tlenków żelaza: a) hematyt, b) magnetyt, c) maghemit, d) wustyt. ....	34
<b>Rysunek 7</b> Zdjęcie TEM nanocząstek tlenku żelaza otrzymanych metodą współstrąceniową. ....	37
<b>Rysunek 8</b> Zdjęcie TEM nanocząstek tlenku żelaza otrzymanych metodą mikroemulsyjną. ....	38
<b>Rysunek 9</b> Zdjęcia TEM nanocząstek magnetycznych syntezowanych metodą termicznej dekompozycji prekursora $Fe(CO)_x$ -oleiloamina przy różnych parametrach reakcji: a) 30°C przez 1 minutę, b) 30°C przez 60 minut, c) 30°C przez 180 minut, d) 70°C przez 60 minut, e) 100°C przez 60 minut, f) 130°C przez 60 minut. Skala 20 nm. ....	39
<b>Rysunek 10</b> Zdjęcia TEM: a) krystalitów magnetytu (zaznaczone strzałką) wewnątrz bakterii <i>D. magneticus</i> , b) utworzonych przez bakterię <i>D. magneticus</i> nanocząstek magnetytu. ....	40
<b>Rysunek 11</b> Schemat ilustrujący różne strategie stabilizacji nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza (kolor niebieski: magnetyczne nanocząstki, kolor czerwony i żółty: materiały wykorzystane do stabilizacji). [opracowane na podstawie <sup>20</sup> ] ....	41
<b>Rysunek 12</b> Schemat ilustrujący zależność pomiędzy rozmiarem cząstek, a dystrybucją w organizmie. [opracowane na podstawie ] ....	42
<b>Rysunek 13</b> a) schemat budowy testu magnetycznego wykorzystującego efekt GMR, wysokie powinowactwo wiązania między biotyną i pokrytymi streptawidyną nanocząstkami tlenku żelaza umieszczonymi w matrycy z dekstranu (MACS) pozwala na krótszy czas oznaczenia; b) biosensor Z-lab. <sup>[64]</sup> ....	44

<b>Rysunek 14</b> Obrazy MRI ogniskowego rozrostu guzkowego wątroby. Obraz otrzymany na podstawie sygnału: a) T1; b) T2; c) T2, z użyciem Resovist® jako środka kontrastującego. <sup>68</sup> .....	46
<b>Rysunek 15</b> Obrazy MRI przersztów do otrzewnej i wątroby (groty strzałek) u pacjenta z desmoplastycznym guzem drobnookrągłokomórkowym przy wykorzystaniu różnych środków kontrastujących i sygnałów relaksacyjnych. a) kontrastowanie gadolinem, obraz zebrany w oparciu o sygnał T1; b) kontrastowanie Ferumoxytolem, obraz zebrany w oparciu o sygnał T1; c) kontrastowanie gadolinem, obraz zebrany w oparciu o sygnał T2; d) kontrastowanie Ferumoxytolem, obraz zebrany w oparciu o sygnał T2. ....	47
<b>Rysunek 16</b> Zależność ilości doksorubicyny pochłoniętej przez komórki glejaka gwiaździstego od systemu podania leku. Kolumna: lewa – doksorubicyna; środkowa – nanocząstki magnetyczne z przyłączoną doksorubicyną; prawa - nanocząstki magnetyczne z przyłączoną doksorubicyną przy zastosowaniu stałego zewnętrznego pola magnetycznego. <sup>81</sup> .....	49
<b>Rysunek 17</b> Schemat nośnika doksorubicyny w postaci superparamagnetycznej nanocząstki tlenku żelaza pokrytej hialuronianem (po lewej); zdjęcie układów wykonane mikroskopem TEM. <sup>91</sup> .....	53
<b>Rysunek 18</b> Schemat nośnika w postaci magnetycznie sterowanej miceli (po lewej); zdjęcie pochodzące z mikroskopu TEM miceli zawierającej wewnątrz nanocząstki superparamagnetyczne i lek sorafenib (po prawej). <sup>93</sup> .....	54
<b>Rysunek 19</b> Zdjęcie z mikroskopu cryo-TEM liposomów zawierających lek przeciwnowotworowy i nanocząstki magnetyczne (skala 50 nm). <sup>94</sup> .....	54
<b>Rysunek 20</b> Schemat magnetycznej kapsuły opartej na ciekłym rdzeniu stabilizowanym amfifilowym polimerem szczepionym. ....	58
<b>Rysunek 21</b> Zdjęcia przedstawiające usuwanie agrafki z brzucha pacjenta za pomocą wprowadzonego do organizmu magnezu. ....	59
<b>Rysunek 22</b> Zdjęcie pierwszej strony książki „Najnowsze tajemnice i zagadnienia Czarnej magji, Hipnotyzmu i Spirytyzmu”, magnetycznego grzebienia Profesora Longa i magnetycznego balsamu .....	60
<b>Rysunek 23</b> Schemat przedstawiający etapy przeprowadzonych prac. ....	68
<b>Rysunek 24</b> Schemat pochodnej chitozanu modyfikowanej kationowo - chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym oraz hydrofobowo- grupami n-dodecyłowymi. ....	77
<b>Rysunek 25</b> Schemat pochodnej chitozanu zmodyfikowanej anionowo grupami sulfaminowymi. ....	78
<b>Rysunek 26</b> Warunki temperaturowe w funkcji czasu, panujące podczas reakcji termicznej dekompozycji oleinianu żelaza (III). ....	80

<b>Rysunek 27</b> Schemat ilustrujący procedurę preparatyki kationowych kapsuł opartych na olejowych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi. ....	81
<b>Rysunek 28</b> Schemat anionowej kapsuły opartej na olejowym rdzeniu z enkapsulowanymi nanocząstkami magnetycznymi. ....	82
<b>Rysunek 29</b> Schemat wypełnienia płytki 24-dołkowej przygotowanej w celu określenia toksyczności kapsuł względem komórek linii 4T1. ....	85
<b>Rysunek 30</b> Schemat eksperymentu przeciągania komórek za pomocą stałego pola magnetycznego. ....	86
<b>Rysunek 31</b> Schemat eksperymentu uwalniania substancji enkapsulowanej wewnątrz komórek za pomocą zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego. ....	87
<b>Rysunek 32</b> Widmo <sup>1</sup> H NMR chitozanu modyfikowanego kationowo GTMAC oraz hydrofobowymi łańcuchami n-dodecyłowymi. ....	90
<b>Rysunek 33</b> Widmo FT-IR pochodnej chitozanu AChit z naszczepionymi grupami sulfonowymi. ....	91
<b>Rysunek 34</b> Zdjęcie STEM nanocząstek otrzymanych metodą termicznej dekompozycji organometalicznego prekursora. ....	93
<b>Rysunek 35</b> Widmo FT-IR nanocząstek magnetycznych i kwasu oleinowego; wstawka obrazuje pojawienie się nowych pasm potwierdzającym powstanie połączenia typu chelatowego między nanocząstkami, a kwasem oleinowym. ....	94
<b>Rysunek 36</b> Krzywa TGA-DSC dla nanocząstek magnetycznych. ....	95
<b>Rysunek 37</b> Dyfraktogram rentgenowski (XRD) nanocząstek magnetycznych, mikrokrystalicznego magnetytu i wustytu. ....	96
<b>Rysunek 38</b> Widmo moessbauerowskie nanocząstek magnetycznych (czarne punkty odpowiadają pomiaru punktom pomiarowym): a) pomiar wykonany w temperaturze pokojowej z dopasowanym sekstetem pochodzącym od wustytu (niebieska linia), sekstetami pochodzącymi od maghemitu (błękitna i zielona linia) oraz sumaryczne dopasowanie (linia czerwona); b) pomiar w temperaturze pokojowej nanocząstek magnetycznych po 8 miesiącach od ich zsyntezowania; c) pomiar w temperaturze ciekłego azotu z uwzględnieniem udziału wustytu (niebieskie punkty) i bez uwzględnienia fazy wustytu (czerwone punkty); d) widmo mikrokrystalicznego wustytu zmierzone w temperaturze ciekłego azotu; e) widmo mikrokrystalicznego maghemitu zmierzone w temperaturze ciekłego azotu. ....	98
<b>Rysunek 39</b> Podatność magnetyczna nanocząstek magnetycznych w funkcji temperatury mierzona w polu 100 Oe. Zaznaczona na wykresie wartość 192 K to literaturowa wartość temperatury Neela wustytu, natomiast temperatura 230 K odpowiada rzeczywistej temperaturze tego przejścia dla badanych układów. ....	100

---

<b>Rysunek 40</b> Krzywe magnesowania nanocząstek magnetycznych w funkcji przyłożonego pola mierzone w zakresie temperatur 4-300 K. ....	101
<b>Rysunek 41</b> Krzywe pierwotnego magnesowania nanocząstek magnetycznych w funkcji przyłożonego pola mierzone w zakresie temperatur od 4-300 K.....	102
<b>Rysunek 42</b> Wartości średnic hydrodynamicznych oraz wartości potencjałów dzeta magnetycznych kapsuł kationowych mierzone na przestrzeni 48 tygodni. ....	104
<b>Rysunek 43</b> Wartości średnic hydrodynamicznych oraz wartości potencjałów dzeta magnetycznych kapsuł anionowych mierzone na przestrzeni 48 tygodni. ....	105
<b>Rysunek 44</b> Zdjęcie cryo-TEM magnetycznych kapsuł kationowych opartych na olejowych rdzeniach.....	105
<b>Rysunek 45</b> Zdjęcia magnetycznych kapsuł wykonane mikroskopem konfokalnym: A) kapsuły kationowe (zdjęcie wykonane w dniu zrobienia kapsuł); B) kapsuły kationowe (zdjęcie wykonane po 2 tygodniach przechowywania kapsuł); C) kapsuły anionowe (zdjęcie wykonane w dniu zrobienia kapsuł); D) kapsuły anionowe (zdjęcie wykonane po 2 tygodniach przechowywania kapsuł). Skala 1 $\mu\text{m}$ .....	106
<b>Rysunek 46</b> Krzywa magnesowania magnetycznych kapsuł kationowych w funkcji przyłożonego pola w temperaturze 300 K. ....	107
<b>Rysunek 47</b> Przeżywalność komórek linii 4T1 (określona na podstawie testu XTT) w kontakcie z kationowymi lub anionowymi kapsułami magnetycznymi o różnym stężeniu. ....	110
<b>Rysunek 48</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) po wyjęciu z inkubatora oraz poddanych 5 i 15 minutowemu działaniu stałego pola magnetycznego. Skala: 20 $\mu\text{m}$ . ....	111
<b>Rysunek 49</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek podanych eksperymentowi wprowadzenia znakowanych fluorescencyjnie, magnetycznych kapsuł kationowych za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego. Kolumna lewa: światło przechodzące i filtr TRITC, kolumna prawa: filtr TRITC. Skala: 20 $\mu\text{m}$ . ....	112
<b>Rysunek 50</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) po poddaniu eksperymentowi wprowadzenia magnetycznych kapsuł kationowych za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego. Skala: 20 $\mu\text{m}$ . ....	113
<b>Rysunek 51</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek podanych eksperymentowi wprowadzenia znakowanych fluorescencyjnie, magnetycznych kapsuł anionowych za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego Kolumna	

---

lewa: światło przechodzące i filtr TRITC, kolumna prawa: filtr TRITC. Skala: 20 $\mu\text{m}$	114
<b>Rysunek 52</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) po poddaniu eksperymentowi wprowadzenia magnetycznych kapsuł anionowych za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego. Skala: 20 $\mu\text{m}$ .	115
<b>Rysunek 53</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) poddanych 15 minutowemu działaniu stałego pola magnetycznego, a następnie działaniu zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego. Skala: 20 $\mu\text{m}$ .	117
<b>Rysunek 54</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek podanych eksperymentowi wprowadzenia i uwolnienia substancji enkapsulowanej w znakowanych fluorescencyjnie, magnetycznych kapsułach kationowych za pomocą 15 minutowego działania stałego zewnętrznego pola magnetycznego, a następnie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego. Kolumna lewa: światło przechodzące i filtr TRITC, kolumna prawa: filtr TRITC. Skala: 20 $\mu\text{m}$ .	118
<b>Rysunek 55</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) po poddaniu eksperymentowi wprowadzenia i uwolnienia substancji enkapsulowanej w magnetycznych kapsułach kationowych za pomocą 15 minutowego działania stałego zewnętrznego pola magnetycznego, a następnie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego. Skala: 20 $\mu\text{m}$ .	119
<b>Rysunek 56</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek podanych eksperymentowi wprowadzenia i uwolnienia substancji enkapsulowanej w znakowanych fluorescencyjnie, magnetycznych kapsułach anionowych za pomocą 15 minutowego działania stałego zewnętrznego pola magnetycznego, a następnie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego. Kolumna lewa: światło przechodzące i filtr TRITC, kolumna prawa: filtr TRITC. Skala: 20 $\mu\text{m}$ .	120
<b>Rysunek 57</b> Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego komórek barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst (kolumna lewa, filtr DAPI) i jodkiem propidyny (kolumna prawa, filtr TRICT) po poddaniu eksperymentowi wprowadzenia i uwolnienia substancji enkapsulowanej w magnetycznych kapsułach anionowych za pomocą 15 minutowego działania stałego zewnętrznego pola magnetycznego, a następnie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego. Skala: 20 $\mu\text{m}$ .	121



---

## SPIS TABEL

<b>Tabela 1</b> Zestawienie układów magnetycznych wykorzystywanych w celowanym i kontrolowanym dostarczaniu substancji biologicznie aktywnych.....	64
<b>Tabela 2</b> Długości fali wzbudzenia oraz rodzaje filtrów w zależności od zastosowanego barwnika fluorescencyjnego przy obrazowaniu próbek mikroskopem konfokalnym. ....	73
<b>Tabela 3</b> Wartości indukcji magnetycznej zastosowanych przy eksperymentach ze zmiennym polem magnetycznym.....	74
<b>Tabela 4</b> Parametry otrzymane z dopasowania widm moessbauerowskich nanocząstek magnetycznych oraz zestawienie danych literaturowych dla maghemitu i wustytu. ....	98
<b>Tabela 5</b> Wartości pola koercji i remanencji wyznaczone z krzywych magnetyzacji nanocząstek magnetycznych. ....	100

---

## DOROBEK NAUKOWY

Prezentowane w niniejszej rozprawie wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie należącym do Listy Filadelfijskiej:

- Gumieniczek-Chłopek, E., Odrobińska, J., Strączek, T., Radziszewska, A., Zapotoczny, S., Kapusta, C. Hydrophobically Coated Superparamagnetic Iron Oxides Nanoparticles Incorporated into Polymer-Based Nanocapsules Dispersed in Water. *Materials* **13**, 1219 (2020)

Badania związane z tematyką sterowalnych magnetycznie kapsuł przedstawione zostały w pracy:

- Odrobińska, J., Gumieniczek-Chłopek, E., Szuwarzyński, M., Radziszewska, A., Fiejdasz, S., Strączek, T., Kapusta, C., Zapotoczny, S. Magnetically navigated core-shell polymer capsules as nanoreactors loadable at the oil/water interface. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 10905–10913 (2019)

Natomiast badania, wykonane w ramach zagranicznej współpracy, związane z magnetyczną charakterystyką nanocząstek zostały opublikowane w artykule:

- Stachowska, J.D., Gamża, M.B., Mellor, C., Gibbons, E.N., Krysmann, M.J., Kellarakis, A., Gumieniczek-Chłopek, E., Strączek, T., Kapusta, C., Szwajca, A. Carbon Dots/Iron Oxide Nanoparticles with Tuneable Composition and Properties. *Nanomaterials* **12**, 674 (2022)



Dzięki stażowi naukowemu, który miał miejsce w The Institute of Nanoscience of Aragon od 8-30.07.2019 poszerzona została wiedza z tematyki charakterystyki układów magnetycznych wykorzystana w prezentowanej pracy.

---

Wyniki przedstawione w rozprawie prezentowane były w formie plakatów na 5 konferencjach krajowych i 4 konferencjach międzynarodowych oraz w formie referatu na jednej konferencji krajowej:

- **KRK InnoTech Summit 2017**, 26.10.2017 Kraków (Biopolimerowe kapsuły zawierające nanocząstki superparamagnetyczne jako funkcjonalne nośniki substancji aktywnych),
- **3rd Grandmaster Early-Career Workshop in Physics**, 19-23.02.2018 Wiedeń (Biopolymer Capsules with Magnetic Properties),
- **4th International Conference on Biomedical Polymers&Polymeric Biomaterials**, 15-18.07.2018 Kraków (Polysaccharides-based Capsules Loaded with Magnetic Nanoparticles),
- **NanoBio Conference 2018**, 24-28.09.2018 Heraklion (Polysaccharides-based Capsules Loaded with Magnetic Nanoparticles),
- **Innovative technologies in biomedicine: the 3rd international conference**, 22-24.10.2018 Kraków (Polysaccharides-based capsules loaded with magnetic nanoparticles),
- **Dokonania naukowe doktorantów VII**, 30.03.2019 Poznań (Biopolimerowe kapsuły zawierające nanocząstki superparamagnetyczne jako funkcjonalne nośniki przeznaczone do aplikacji biomedycznych)
- **III Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat**, 13-14.06.2019 Łódź (Biopolimerowe nanokapsuły z magnetycznym rdzeniem przeznaczone do aplikacji biomedycznych), - referat
- **XXXVII Reunion Bienal de la Real Sociedad Espanola de Fisica**, 16-17.07.2019 Zaragoza (Magnetically Navigated Polysaccharides-based Capsules as Smart Delivery Systems),
- **InterNanoPoland 2019**, 16-17.10.19 Katowice (Magnetically Navigated Capsules as Smart Delivery Systems Designed for Biomedical Applications),
- **II Sympozjum Biomateriały w medycynie i kosmetologii**, 28.01.2021 konferencja online (Sterowane magnetycznie kapsuły biopolimerowe przeznaczone do celowego i kontrolowanego transportu substancji biologicznie aktywnych).